

Министерство высшего и среднего специального образования РСФСР

Куйбышевский государственный университет

Кафедра биологической химии

Ю.П.Фролов, В.И.Древалъ

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ФИЗИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ АНАЛИЗА
В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Практикум для студентов
3-го курса специальности "Биология"
/специализация "Биохимия"/

Куйбышев 1981

В практикуме отражены теоретические основы и порядок выполнения операций при использовании наиболее распространенных физико-химических и физических методов анализа.

Дается описание конструкции и правила безопасной работы на приборах.

Приводятся сведения о технике взятия биологических проб и о выполнении подготовительных операций (гомогенизация, фракционирование с помощью центрифуг), обычно предшествующих физико-химическому или физическому анализу.

Практикум предназначен для студентов университета, специализирующихся по биохимии.

Отв. ред. проф. М.М. Серых

Предисловие

Для качественного проведения исследований применяются современные приборы и оборудование, являющиеся техническим воплощением различных экспериментальных методов, которые подразделяются на физико-химические и физические методы анализа. Высокая сложность биологических систем и ряд особенностей, присущих им, обуславливают необходимость проведения специальных подготовительных операций, предшествующих физико-химическому или физическому анализу. Эти операции (гомогенизация, центрифугирование), связанные с применением достаточно сложных технических устройств, налагаются в первом разделе.

Общие вопросы техники безопасности и частные требования, связанные с работой на конкретных приборах, являются составной частью в освоении студентами экспериментальных методов исследования. Данные вопросы также нашли отражение в практикуме.

Приводится описание лишь наиболее распространенных, преимущественно отечественных приборов и оборудования. При изучении их необходимо использовать технические описания и инструкции. Это призывает студента к самостоятельной работе с технической документацией, часто являющейся единственным пособием при освоении нового прибора.

Основные работы, в которых нашли отражение наиболее важные физико-химические и физические методы, используемые в биохимии, приводятся в предлагаемом списке литературы.

В заключение следует отметить, что описанные в практикуме инструментальные методы исследования — лишь часть технических средств, непрерывно поступающих на вооружение биохимии. Грамотное овладение ими невозможно без знания основных законов физики. В этом плане освоение физико-химических и физических методов анализа студентами-биологами способствует установлению тесных связей между такими дисциплинами, как биология, химия и физика.

Раздел первый, а также подразделы: хроматография, электрофорез и потенциометрический метод анализа написаны В.И. Древалем, остальные физико-химические и физические методы анализа описаны Ю.П. Фроловым.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Работа в биохимической лаборатории сопряжена с повышенной опасностью для здоровья работающих, поскольку эксперименты проводятся на установках, питающихся электрическим током, часто используются легковоспламеняющиеся вещества и горючие жидкости, кислоты, щелочи, бром, металлический натрий и калий.

Во время работы в лаборатории следует соблюдать тишину и порядок. Черняшность и поспешность часто приводят к повторению работы и даже к несчастным случаям. В лаборатории не следует пить воду или принимать пищу, запрещается курить.

Перед выполнением работы с химическими веществами необходимо ознакомиться с инструкцией по технике безопасности при работе с ними, убедиться в соответствии взятых химических веществ с веществами, указанными в описании работы. Перед началом работы следует тщательно осмотреть аппаратуру и химическую посуду и убедиться в правильности сборки установки или прибора. Нельзя нагревать закупоренными какие-либо сосуды или аппараты, кроме специально предназначенных для этой цели. Во время нагревания в пробирках, колбах жидкостей или твердых веществ не следует направлять устье сосуда на себя или на соседа и заглядывать в пробирки или колбы сверху, т.к. в случае возможного выброса нагретого вещества могут быть несчастные случаи. Нельзя выливать в раковину остатки кислот, щелочей, огнеопасных жидкостей и т.п. Их следует сливать в специально предназначенные емкости.

Перед включением электроустановок необходимо убедиться в правильности их подключения к электросети, в отсутствии оголенных токоведущих проводов и деталей на рабочем месте. При обнаружении неисправности немедленно выключать рубильник электропитания и доложить дежурному лаборанту или преподавателю.

О неисправности в водопроводной сети, лабораторной аппаратуре, приборах, тяге и т.д. немедленно сообщить лаборанту или преподавателю.

Работать в лаборатории одному или в отсутствие лаборанта запрещается.

Кроме соблюдения общих требований техники безопасности, необходимо руководствоваться правилами безопасной работы на конкретных приборах и оборудовании. Эти правила приведены в разделах пособия, где дается описание конструкции приборов и порядок работы на них.

І. ВЗЯТИЕ ПРОБ И ПОДГОТОВКА ИХ К АНАЛИЗУ

Взятие проб для биохимических анализов

Задача биохимика — изучить, по-возможности, ту картину метаболизма, которая имела место при нахождении тканей в составе организма. Но даже при современном уровне техники биохимических исследований это очень сложное дело, так как любое нарушение целостности организма ведет к нарушению обмена веществ. Поэтому надо, чтобы при взятии проб ткани для биохимических анализов эти изменения сводились к минимуму.

Все существующие способы взятия проб можно разделить на две группы: прижизненное взятие проб (биопсии) и у предварительно умерщвленного животного.

Взятие ткани у животного биопсией сохраняет целостность организма, так как происходит в течение короткого промежутка времени и позволяет сохранить животное для дальнейших исследований. Вместе с тем, при биопсии удаление ткани из организма приводит к нарушению ее связи с центральной нервной системой и нарушает кровообращение, что не может не оказать влияния на течение биохимических процессов.

Умерщвление животного осуществляется путем обезглавливания (декапитации), впрыскиванием хлороформа в сердце, обескровливанием, воздействием электрического тока и т.д. Процесс этот сопровождается сильной двигательной активностью и характеризуется сильным стрессом, что может существенно повлиять на результаты при изучении лабильных соединений. В некоторых случаях, во избежание двигательной активности животных, перед умерщвлением используют нарков. Но нарков может способствовать увеличению содержания макроэргических фосфатов, что также отражается на результатах исследования.

В конечном счете, выбор способа взятия пробы определяется целью исследования. При определении содержания субстратов следует быстро затормозить деятельность ферментов. В связи с тем, что снижение температуры в интервале от 0° до 40° приводит к уменьшению

активности ферментов в 2,5-3 раза на каждые 10°C , то широко практикуется замораживание животного или отдельных тканей (при исследовании лабильных фосфорных соединений и молочной кислоты). Кроме того, используется фиксация в охлажденной трихлоруксусной кислоте (фосфокреатин, гексофосфаты и азотистые соединения в мышце), помещение ткани в нагретый на кипящей водяной бане 40% КОН (гликоген). При определении еще менее лабильных соединений совершенно не требуется быстрой фиксации.



Рис. I. Фиксация крысы при декапитации

Задание. Взятие тканей у крыс для биохимических анализов.

В работе используют белых беспородных крыс. Животных декапитируют и вскрывают.

Исследуемые органы (мозг, печень, мышцы, селезенку) быстро отделяют от окружающей ткани и помещают в стаканчик с 0,9% NaCl или 0,25M сахарозой, находящейся на льду. Выделенную ткань сохраняют при $+2-4^{\circ}$ в холодильнике для последующих исследований.

Гомогенизация тканей

Первым этапом фракционирования клеточных оргanelл является гомогенизация - процесс превращения ткани в суспензию субклеточных частиц (гомогенат). Разрушение клеток происходит потому, что давление в гомогенизаторе превосходит силы, соединяющие компоненты клеток. При этом внутриклеточные и внеклеточные компоненты попадают в среду гомогенизации.

При вращении пестика гомогенизатора наряду с разрушением клеток происходит также и трение между различными тканями, между тканью и средой, между тканью и гомогенизатором и частями гомогенизатора, за счет чего повышается температура гомогенизируемого образца. А это является нежелательным явлением из-за температурной инактивации ферментов, так как вызывает необходимость постоянно охлаждать гомогенат в процессе гомогенизации.

Выбор конструкции гомогенизатора определяется характером работы. Наиболее распространенными типами является гомогенизаторы Поттера-Эльвегейма 1 и Даунса 2 (рис. 2).

Использование среды гомогенизации зависит от характера исследования. Объективных критериев для выбора той или иной среды при гомогенизации не существует. Для создания в среде необходимого осмотического давления, предохраняющего частицы от набухания и разрыва, в качестве среды гомогенизации, как правило, используют 0,25М, 0,44М и 0,88М растворы сахарозы. Кроме него используют и другие среды, например, для выделения ядер - раствор лимонной кислоты и этиленгликоля, для выделения хлоропластов - маннита и сорбита.

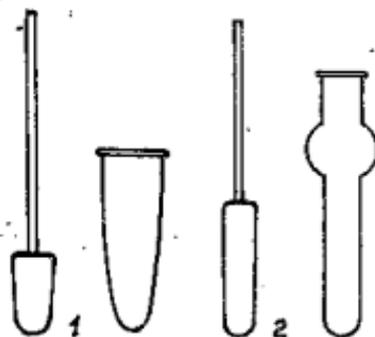


Рис. 2. Наиболее распространенные типы гомогенизаторов

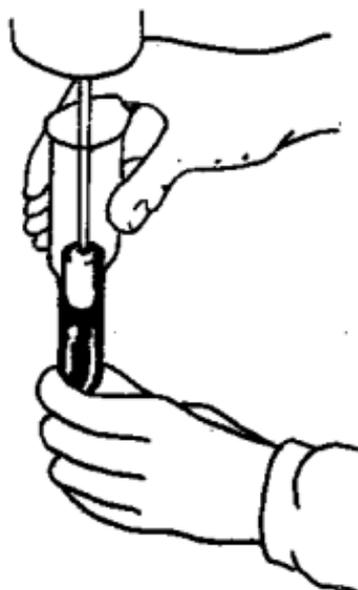
Большое значение при гомогенизации и дальнейшем фракционировании субклеточных структур имеет рН среды гомогенизации. Установлено, что в интервале рН от 7,4 до 7,8 число неразрушенных клеток минимально, а при рН ниже 7 резко возрастает загрязнение гомогената целыми клетками и клеточными агрегатами. В целях забуферения среды гомогенизации применяют буферные растворы, обычно фосфатный или трис-буфер.

Не меньшее значение имеет электролитный состав среды. Установлено, что высокие концентрации солей способны вызывать изменение плотности субклеточных структур и способствовать их агрегации. В некоторых случаях изменение ионного состава среды вызывает благоприятное воздействие на субклеточные фракции. Так, например, наличие ионов K^+ способствует более длительному дыханию митохондрий, а добавление ЭДТА (1-5 мм) сохраняет целостность митохондрий и микросом.

Задание. Гомогенизация животной ткани.

Перед гомогенизацией ткань обсушивают фильтровальной бумагой и взвешивают. Затем ткань измельчают ножницами и помещают в стакан гомогенизатора, куда добавляют 0,35 М раствор сахарозы из расчета 1:9 (по отношению к весу взятой ткани). Гомогенизацию осуществляют при 1000-3000 об/мин (в зависимости от типа ткани) в течение

одной минуты при постоянном движении пестика вверх и вниз (рис.3).



В ходе гомогенизации стакан следует непрерывно охлаждать, поместив его в лед. Приготовленный гомогенат фильтруют через 3-4 слоя марли (или капрона) для удаления неразрушенных клеток и соединительной ткани и хранят в холодильнике при $+2-4^{\circ}\text{C}$ для последующего исследования.

Центрифугирование

Принцип метода разделения веществ с помощью центрифугирования основан на разном поведении частиц в центробежном поле. В процессе центрифугирования гомогенат вносят в пробирку, вставляют ее в ротор центрифуги, разгоняемой до заданной скорости, при которой выдерживают ротор необходимое время, и затем останавливают его либо пассивно, либо тормозом. В результате

Рис.3. Гомогенизация животной ткани

действия центробежных сил частицы, имеющие разную скорость, форму или размеры, осаждаются с разной скоростью. Скорость седиментации прямо пропорциональна величине центробежной силы G , которая определяется по формуле

$$G = \omega^2 R = \frac{4\pi^2 N^2 R}{3600} \quad (1)$$

где ω - угловая скорость, рад/сек; R - расстояние частицы от оси вращения; N - число оборотов ротора центрифуги в минуту. Величина G обычно выражается в единицах g (ускорение силы тяжести, равное 980 см/сек^2) и называется относительным центробежным ускорением $|OCY|$, или фактором разделения

$$OCY = \frac{4\pi^2 N^2 R}{3600 \cdot 980} = 1,11 \cdot 10^{-5} \cdot R \cdot N^2 \quad (2)$$

На практике, для расчетов центробежного ускорения используют номограмму (рис.4).

Скорость седиментации сферических частиц зависит не только от центробежного ускорения, но и от плотности, и от радиуса самих частиц, и от вязкости среды суспендирования. При заданной скорости вращения ротора время, необходимое для осаждения гомогенных

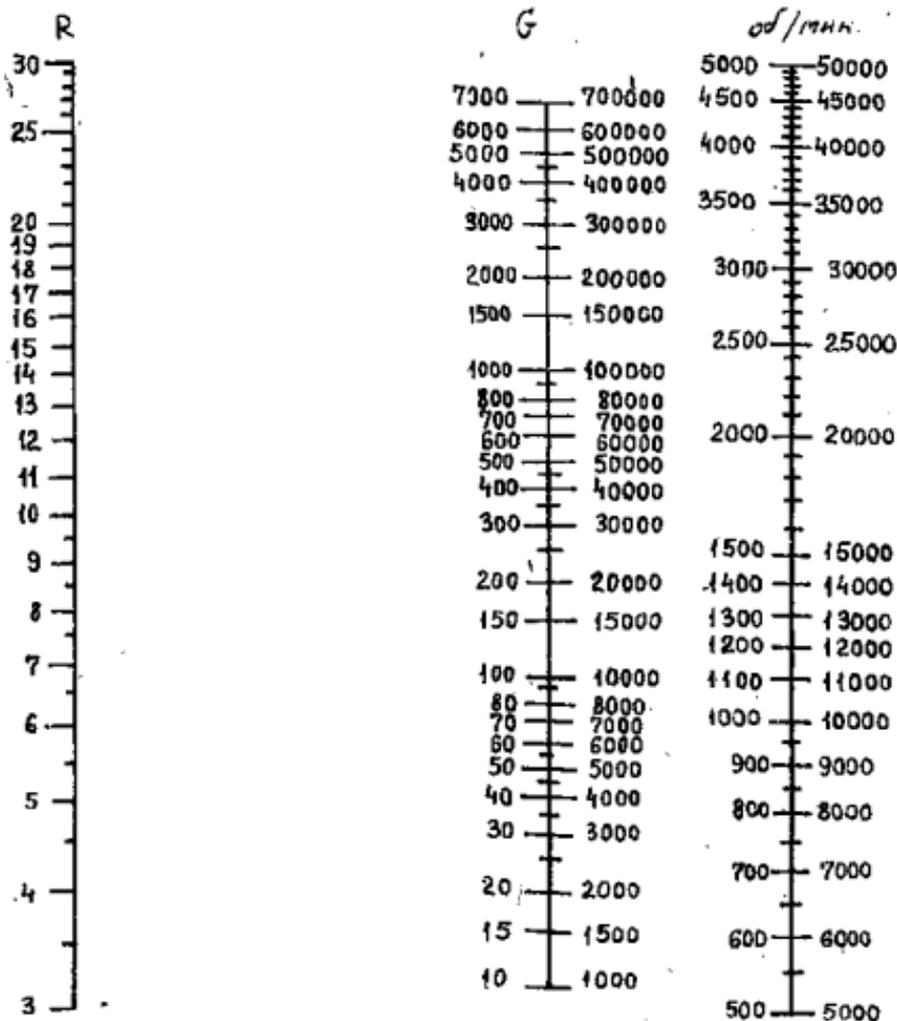


Рис.4. Номограмма для расчета центробежного ускорения

Для расчета G по номограмме соединяют прямой линией величины радиуса R и скорости вращения ротора на крайних шкалах. Число G устанавливают по месту пересечения со средней шкалой. Определение величины числа оборотов по заданной величине G проводят аналогичным образом

сферических частиц, обратно пропорционально квадрату их радиусов и разности плотности частиц и среды, и прямо пропорционально вязкости среды. Поэтому смесь однородных, приблизительно сферических частиц, различающихся по плотности и (или) размерам, можно разделить либо за счет разного времени осаждения их на дно пробирки

при данном ускорении; либо за счет распределения оседающих частиц вдоль пробирки, устанавливающегося через определенный промежуток времени.

По-видимому, наиболее распространенным методом выделения клеточных органелл из гомогенатов тканей является дифференциальное центрифугирование. Метод основан на различиях в скорости оседания частиц, зависящей в основном от их размеров (рис.5); наиболее успешно он применяется для

разделения клеточных органелл, отличающихся друг от друга по размерам и плотности.

Полученные этим методом фракции никогда не бывают абсолютно гомогенными и для их дальнейшей очистки применяются другие методы, основанные на различиях в плотности органелл. При этом широко используется метод зонально-скоростного центрифугирования, при котором

частицы осаждаются в среде с градиентом



плотности до тех пор, пока не попадут в зону, где плотность среды такая же, как у них самих (рис.5).

Используемые градиенты могут быть либо непрерывными, когда плотность постепенно увеличивается от вершины пробирки к ее дну, либо ступенчатыми, когда в пробирку наслаивают один за другим несколько слоев различной плотности.

При изопикническом центрифугировании образец суспендируют в среде с такой же плотностью, как и у фракции, которую хотят выделить, а затем его центрифугируют до тех пор, пока одни частицы (более плотные) не осадят на дно пробирки, а менее плотные не всплывут на поверхность жидкости (рис.5).

При работе на центрифуге ЦР-1 следует:

Подключить центрифугу к источнику питания.

Установить тумблер сети в положение "ВКЛ".

Плавно и медленно повернуть ручку "Регулятор оборотов" по часовой стрелке до загорания сигнальной лампы "Сеть".

Включить в работу холодильный агрегат, для чего необходимо тумблер "Компрессор" установить в положение "Вкл" и повернуть ручку "Температура - ниже - выше" в сторону "Температура - ниже" до упора, при этом загорится сигнальная лампа "Компрессор".

Установить тумблер "Температура-измерение" в положение "Вкл" и следить за температурой в рабочей камере. Если стрелка указателя температуры после включения тумблера будет зашкаливать, то необходимо тумблер установить в положение "Откл" и повторить включение через 5-7 мин. При последующем включении тумблера стрелка указателя температуры должна плавно смещаться по шкале до заданной температуры, при этом необходимо следить за своевременным переключением ручки диапазонов измерения температуры.

После достижения заданной температуры ручку "Температура - ниже-выше" установить на границе включения и выключения холодильного агрегата. Границу эту находят поворачивая ручку "Температура - ниже-выше" в обе стороны таким образом, чтобы при малейшем движении ее в сторону "Температура-выше" холодильный агрегат отключался. Дальнейшее регулирование температуры осуществляется автоматически.

По окончании центрифугирования нажать на кнопку "Стоп", при этом загорится сигнальная лампа "Тормоз".

Установить ручку "Регулятор оборотов" в исходное положение.

Установить тумблер "Компрессор" в положение "Откл".

Установить тумблер сети в положение "Откл", при этом погаснет контрольная сигнальная лампа "Сеть".

После полной остановки ротора открыть крышку центрифуги.

Отвернуть крышку ротора (если она имеется) и вынуть пробирки.

Задание 1. Приготовить 15, 25, 35 и 50% растворы сахарозы. Сформировать прерывистый градиент, наслаивая растворы, начиная с наиболее концентрированного.

2. Используя номограмму на рис. 4, рассчитать число оборотов для выделения субклеточных частиц (задание 3).

3. Из ранее полученных гомогенатов выделить субклеточные фракции, руководствуясь приведенной схемой фракционирования (рис. 6).

Гомогенат (1:9)

Центрифугирование при 600g 10 мин.

Осадок I
/ядерная фракция/

Супернатант I

центрифугирование при 8 500g 10 мин.

Осадок II
/митохондриальная
фракция/

Супернатант II

центрифугирование при 20 000g 60 мин.

Осадок III
/микросомная фракция/

Супернатант III

Рис.6. Схема фракционирования субклеточных структур печени

Техника безопасности. Категорически запрещается: работать на центрифугах без заземления, с открытой крышкой центрифуги и без крышки ротора с разностью массы диаметральных пробирок более 0,5 г, а также открывать крышку центрифуги до полной остановки ротора.

Хроматография

Эффективным способом разделения веществ является хроматографический метод, с помощью которого можно фракционировать различные количества анализируемого материала. При хроматографическом разделении компоненты смеси распределяются между подвижной и неподвижной фазами системы. Ю.С.Дячиков(1974) хроматографические методы классифицирует в зависимости от агрегатного состояния фаз (табл.1).

Таблица I

Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Наименование метода	Возможные варианты метода
Твердая	Жидкая	Адсорбционная хроматография жидкостей и растворов; ионообменная хроматография; осадочная хроматография	Окислительно-восстановительная хроматография; адсорбционно-комплексобразовательная; тонкослойная, гельфильтрация
Твердая	Газообразная	Газовая адсорбционная хроматография	Хроматермография, теплодинамический метод
Жидкая	Жидкая	Жидкостная распределительная хроматография	Колоночная; бумажная; метод обращенных фаз; электрофоретическая; тонкослойная
Жидкая	Газообразная	Газо-жидкостная распределительная хроматография	Хроматография газов, жидкостей, ступенчатая, капиллярная

Ионообменная хроматография. Метод основан на явлениях притяжения и обмена между растворенными ионами и ионами, адсорбированными твердым носителем. В качестве носителей используются как ионообменные смолы, так и ионообменные целлюлозы. Ионообменные смолы представляют собой производные полистирола или полиметакриловой кислоты. В зависимости от способности поглощать ионы ионообменные смолы делятся на катиониты (поглощают катионы), аниониты (поглощают анионы) или амфолиты (поглощают одновременно катионы и анионы). В катионообменниках полярными группами являются либо $-SO_3H$ (сильнокислые), либо $-COOH$ (слабокислые). В анионообменниках функционально активными группами являются либо $-CH_2N^+R_3$ (сильноосновные), либо $-CH_2NR_2$ (слабоосновные).

Для ионообменной хроматографии белков обычно используют ионообменные целлюлозы. Функциональной группой у этих анионитов является $-N^+(CH_2-CH_2)_2$, а у катионитов $-PO_3H_2$ и $-COOH$. Каждый ионит способен поглощать лишь определенное количество ионов. Эта величина называется емкостью ионита и выражается в миллиграммах или миллиграмм-эквивалентах сорбируемого иона на единицу объема или массы ионита. На емкость ионита влияют pH раствора, размер его зерен, число функциональных групп в каркасе ионита, размер поглощаемых молекул или ионов.

Перед работой ионообменную колонку подвергают регенерации, пропуская HCl (в случае катионообменника) или $NaOH$ (в случае анионообменника). После промывания колонки водой или буфером для удаления регенерирующего раствора в нее вносят анализируемое вещество. Элюирование с колонки катионообменника происходит при увеличении pH буферного раствора, а с колонки анионообменника — при уменьшении pH . В том и другом случае вместе с изменением pH можно увеличивать ионную силу раствора. Порядок элюирования ионов с колонки определяется величиной их зарядов.

Адсорбционная хроматография. В основе метода лежат различия в степени адсорбции разнообразных веществ адсорбентом и их растворимости в соответствующих растворителях. В зависимости от типа подвижной фазы различают газовую и жидкостную хроматографии.

В адсорбционной газовой хроматографии в качестве носителей применяют угли, цеолиты, тонкопористые силикагели и т.д. В качестве газа-носителя используются водород, гелий или двуокись углерода. Компоненты исследуемого вещества удерживаются адсорбентом колонки соответственно их сорбционным свойствам.

В жидкостной адсорбционной хроматографии в качестве адсорбентов применяют силикагель, окись алюминия, кизельгур, крахмал и др. В качестве растворителя используют воду, этиловый и метиловый спирт, ацетон, эфир и ряд других растворителей. При пропускании растворителя через слой адсорбента разделение веществ будет осуществляться в зависимости от их способности удерживаться адсорбентом и растворимости в соответствующем растворителе. Разделение веществ может осуществляться либо путем хроматографии на колонке, либо методом тонкослойной хроматографии.

Распределительная хроматография. Метод основан на различиях в коэффициентах распределения анализируемых веществ между двумя несмешивающимися жидкими фазами. Одна фаза тесно связана с носителем и является неподвижной. Подвижный и неподвижный растворители подбирают в зависимости от природы носителя и его полярности. Если носителем служит гидрофильное вещество, то неподвижным растворителем является вода, а подвижным - органический растворитель. Если носитель - гидрофобное вещество, то в качестве неподвижных растворителей применяют неполярные органические вещества (бензол, хлороформ, керосин), а в качестве подвижных - полярные органические растворители и воду.

Распределительная хроматография может быть использована и в анализе газов. При этом поглощение газов происходит в результате растворения в высококипящей жидкостной пленке на поверхности адсорбента.

В биохимических исследованиях широко применяют бумажную распределительную хроматографию. Подвижной фазой здесь является смешивающийся с водой органический растворитель (бутанол, метанол, муравьиная кислота и др.), а неподвижным растворителем является вода, находящаяся между целлюлозными волокнами.

Проникающая хроматография (гель-фильтрация). Принцип метода основан на способности более низкомолекулярных веществ проникать внутрь частиц наполнителя, тогда как более крупные молекулы проходят мимо гранул геля. Вследствие этого высокомолекулярные вещества будут двигаться на колонке быстрее, чем низкомолекулярные. В качестве наполнителей в биохимических исследованиях используют декстраны с поперечными сшивками (сефадексы), агарозные гели (сефароза, биогель А, сагавак), полиакриламидный гель (биогель Р), стеклянные шарики (биоглас) и пористый кварц (порасил).

Задание. I. Разделение аминокислот методом адсорбционной тонкослойной хроматографии.

В работе используют стеклянные пластинки, предварительно промытые хромовой смесью, водой и высушенные.

Силикагель тщательно перемешивают с двумя-тремя объемами воды, полученную массу выливают на стеклянную пластинку и встряхивая, распределяют равномерно по поверхности. Пластинку высушивают на воздухе 20 минут, а затем активируют в сушильном шкафу при $+110^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут.

На расстоянии 1,5-2 см от края пластинки микропипеткой наносят капли 0,1% раствора аргинина (лизина, гистидина), глутаминовой кислоты (аланина, треонина) и триптофана (фенилаланина, лейцина). Каждая аминокислота наносится в отдельную точку и в одну точку - смесь этих аминокислот, на расстоянии 2-2,5 см друг от друга. В качестве растворителя используют верхний слой смеси бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:5.

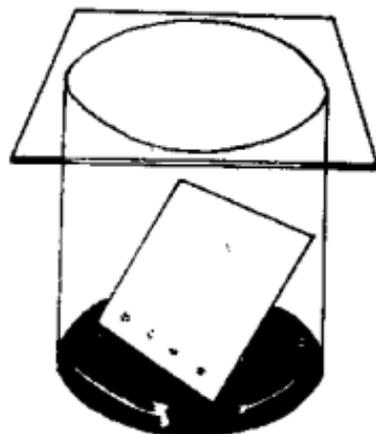


Рис. 7. Общий вид устройства для тонкослойной хроматографии

Пластинку погружают в растворитель на 0,5 см краем с нанесенными аминокислотами и оставляют в закрытой камере пока фронт растворителя не пройдет 8-9 см (рис. 7); затем ее вынимают из камеры, высушивают от растворителя на воздухе и опрыскивают 0,1 раствором нингидрина в ацетоне. Для проявления пятен пластинку помещают не 10 минут в сушильный шкаф при $+110^{\circ}\text{C}$.

Хроматограмму зарисовывают и для обнаруженных аминокислот рассчитывают R_f по формуле

$$R_f = \frac{\text{Расстояние, пройденное аминокислотой}}{\text{Расстояние, пройденное фронтом растворителя}} \quad (3)$$

2. Разделение аминокислот восходящей хроматографией на бумаге.

На лист хроматографической бумаги, отступив на 2,5 см от края, на расстоянии 2 см друг от друга микропипеткой наносят капли 0,5%

растворов лейцина (фенилаланина, метионина), тирозина (пролина, аланина), лизина (цистина, аргинина), а также смесь этих аминокислот. Лист бумаги сворачивают в виде цилиндра и фиксируют скрепками.

Хроматограмму помещают в камеру (рис.8), где находится верхний слой смеси бутанола, уксусной кислоты и воды (4:1:5). Опыт прекращают, когда фронт растворителя проходит 15-25 см. Хроматограмму вынимают, высушивают от растворителя, опрыскивают 0,1% раствором вингидрина в ацетоне и проявляют при +150°C в течение 10 минут.

Хроматограмму зарисовывают и определяют значения R_f обнаруженных аминокислот.

3. Разделение белков методом гель-фильтрации.

Перед работой следует ознакомиться с работой автоматического коллектора и собрать установку согласно рис.9.

Чтобы установить коллектор ? для сбора проб через заданные интервалы времени следует датчиком времени 5 установить необходимый интервал времени (на рис.9: 2 - тумблер "Непрерывн.цикл", 6 - тумблер "Установка коллектора выкл."). Тумблер "Объем-время" 3 устанавливается в положение "Время"; тумблер "Сеть-Выкл." 4 - в положение "Сеть", при этом загорится сигнальная лампа I. После этого можно приступать к отбору проб в пробирки.

Для расчета количества сепадекса Г-50, необходимого для заполнения колонки, объем колонки разде-

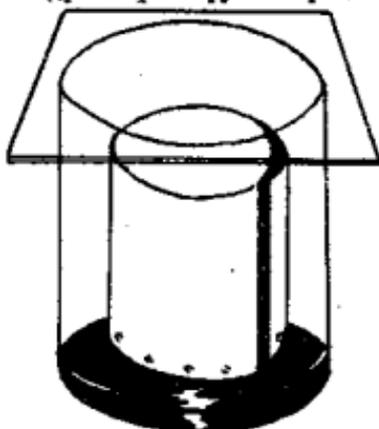


Рис.8.Общий вид устройства для восходящей хроматографии на бумаге

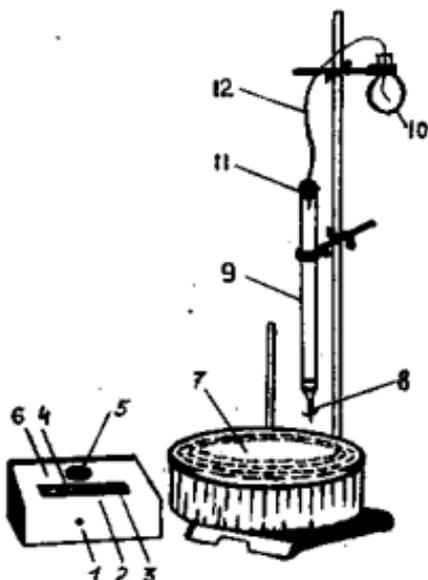


Рис.9.Установка для хроматографии с автоматическим коллектором

лить на IO (I г набухшего сефадекса Г-50 занимает объем IO мл.). Полученная величина будет соответствовать количеству граммов сухого сефадекса, необходимого для заполнения данной колонки. Сефадекс суспендируют в растворе 0,5M NaCl и оставляют на три часа для набухания.

Колонку 9 укрепляют строго вертикально и на стеклянный фильтр помещают кружок из фильтровальной бумаги; колонку заполняют на 1/3 раствором NaCl таким образом, чтобы под стеклянным фильтром отсутствовал воздух. Затем в нее заливают суспензию геля. Когда сформируется слой сефадекса высотой 3-4 см, открывают кран 8 и по мере вытекания растворителя в колонку добавляют гель. Когда столбик геля будет сформирован, кран закрывают и на поверхность геля помещают кружок фильтровальной бумаги. Для анализа используют 2% раствор смеси лизоцима (молекулярный вес 13930), трипсина (23800), пепсина (32700) и сывороточного альбумина (68500) в 0,5M NaCl. Перед нанесением белка слой растворителя из колонки спускают почти полностью. На поверхность геля пипеткой наносят раствор белка, объем которого должен составлять 1% от объема столбика сефадекса; кран 8 открывают и дают возможность раствору белка полностью впитаться.

Затем на поверхность геля настилают раствор 0,5M NaCl толщиной в несколько сантиметров и закрывают резиновой пробкой II со вставленным шлангом I2, выходящим из склянки IO с элюирующим раствором 0,5M NaCl. В пробирки коллектора собирают по 2 мл фракций элюата, начиная с момента внесения образца на колодку. После того, как через колонку будет пропущен элюирующий раствор, в 1,5 - 2 раза превышающий объем столбика геля, элюцию прекращают.

В каждую пробирку к 2 мл элюата добавляют 2 мл 6% раствора NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта.* Через 15 минут интенсивность развившейся окраски измеряют на ФЭКе при длине волны 330 нм (светофильтр № I, ультрафиолетовая лампа).

На основании полученных данных строят график зависимости величины оптической плотности от объема элюата.

*Реактив Бенедикта: 4,33 г цитрата натрия и 2,5 г карбоната натрия растворяют в 12,5 мл воды при подогревании (не доводя до кипения). Затем к раствору при перемешивании добавляют 4,3 г сульфата меди, предварительно растворенного в 5 мл воды. Смесь доводят водой до 25 мл.

Техника безопасности. На автоматическом коллекторе категорически запрещается работать без заземления.

Электрофорез

Многие биологически важные молекулы существуют в растворе в заряженной форме, различаясь между собой как по величине, так и по знаку заряда. Под воздействием электрического поля заряженные молекулы движутся с определенной скоростью к полюсам источника тока в соответствии с величиной их заряда, молекулярного веса и размера. Направление движения частиц определяют изoeлектрическая точка молекулы и pH буфера электрофоретической кюветы.

В качестве носителей при электрофорезе используют бумагу, крахмальный, агаровый и полиакриламидный гели. Общая для всех этих носителей особенность состоит в том, что разделяемые вещества движутся в виде отчетливых зон, которые затем легко обнаружить соответствующими аналитическими методами.

При электрофорезе на бумаге поддерживающей средой служит фильтровальная бумага, что ведет к некоторой адсорции, ухудшающей разделение.

Крахмальные гели готовят путем нагревания и охлаждения смеси частично гидролизованного крахмала с соответствующим буфером. Это приводит к переплетению разветвленных цепей молекул и образованию полужесткой структуры. Присущий крахмальному телу эффект молекулярного сита увеличивает разрешающую способность.

В агаровом геле белки мигрируют почти так же, как при свободном электрофорезе. В качестве поддерживающей среды используется агар — смесь агарозы и агаропектина. По сравнению с бумажным, электрофорез в агаровом геле обеспечивает большую разрешающую способность и более быстрое фракционирование белков. В агаровом геле белковые фракции делятся весьма четко, что позволяет наносить большое количество белка, не снижая четкости разделения.

Полиакриламидный гель /ПААГ/ получают путем сополимеризации акриламида и метилен-бис-акриламида. В связи с тем, что адсорбция и электроосмос в ПААГ низки, размер пор геля можно варьировать в широких пределах, а разделение происходит очень быстро и с большой четкостью, метод электрофореза в ПААГ получил широкое распространение.

Задание. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Приготовить реактивы (на 25 мл раствора): А - трис 1,12 г, рН 8,7; Б - акриламид 7,5 г, метилен-бис-акриламид - 0,2 г; В - тетраметил-этилен-диамин 0,25 мл; Г - аммоний надсернистый 0,1 г; Д - трис 0,2 г, рН 6,7; Е - акриламид 2,5 г, метилен-бис-акриламид - 0,6 г; Ж - сахараза II г.

Электродный буфер рН 8,3 - на 200 мл трис 1,2 г, глицин 5,76 г.

Разделяющий ПААГ готовят смешиванием по 8 мл растворов А, Б и воды, и по 4 мл растворов В и Г. В стеклянные трубочки 4 (рис.10) вносят по 2 мл разделяющего геля и на его поверхность наслаивают 0,2-0,3 мл дистиллированной воды для образования ровной поверхности геля. Перемешивание при наслаивании воды с гелем дает неравномерную пористость и плохое разделение. Через 15-20 минут после окончания полимеризации можно заметить по слабому нагреванию трубочек, а также по образованию хорошо видимой границы между гелем и наслаивенной водой. Воду с поверхности геля удаляют с помощью тонких полосок фильтровальной бумаги.

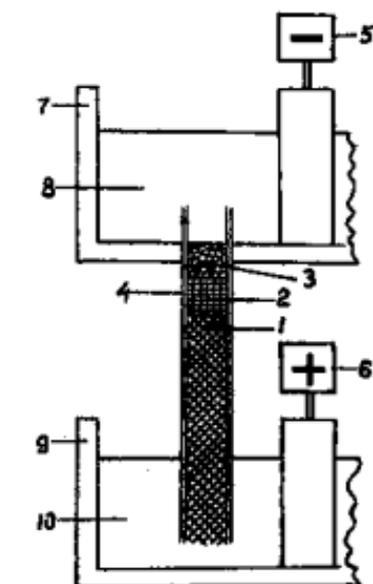


Рис.10. Главные составные части колонки из полиакриламидного геля и электрофоретической установки

Трубки устанавливают в верхний буферный резервуар 7.

Нижний буферный резервуар 9 заполняют 1 л разбавленного в 10 раз анодного буфера 10. Трубочки опускают таким образом, чтобы они были погружены на 5 мм в раствор буфера. Поверх раствора белка наслаивают раствор разбавленного электродного буфера так, чтобы

Концентрирующий гель 2 готовят смешиванием растворов: Д - 1 мл, Е - 4 мл, В - 1 мл, Ж - 7 мл и Г - 2 мл. В каждую трубку вносят по 0,2 мл раствора геля и сверху наслаивают воду. Об окончании процесса полимеризации можно судить по помутнению геля.

Наслоенную воду удаляют и в каждую трубочку вносят по 0,01 - 0,03 мл 0,001% раствора бромтимолового синего. Затем в трубочку вносят по 0,2 мл 0,1% раствора белка 3 в буфере Д с 5% сахарозой.

над краями трубочки наблюдался выпуклый мениск. Верхний резервуар заполняют I и разбавленного в 10 раз катодного буфера 8. Электроды подключают к источнику питания: верхний 5, нижний 6.

Электрофорез проводят при токе 25 мА первые 30 минут, затем повышают до 50 мА. Опыт прекращают, когда окрашенная полоса бромтимолового синего отстоит от конца геля на 5 мм.

Гели из трубочек удаляют обводкой стальной иглы под слоем воды или путем введения шприцем воды между поверхностью геля и трубочкой. Извлеченные гели, обрезают по линии маркерной полосы и для окраски белков помещают на 30 минут в 1% раствор амидочерного, растворенного в 7% уксусной кислоте. Избыток красителя отмывают 7% уксусной кислотой. Гели зарисовывают и рассчитывают относительную электрофоретическую подвижность R_{mf} обнаруженных белковых полос по формуле

$$R_{mf} = \frac{\text{Расстояние, пройденное белком}}{\text{Длина геля}} \quad (4)$$

Техника безопасности. При проведении электрофореза запрещается касаться буферных растворов и электродов. Источник постоянного тока должен быть заземлен.

Потенциометрический анализ

Для характеристики кислотности или щелочности водного раствора использует так называемый водородный показатель $-pH$, который представляет собой отрицательный логарифм концентрации водородных ионов в растворе, выраженной в г-экв/л: $pH = -\lg[H^+]$; $[H^+] = 10^{-pH}$. Из выражения ионного произведения воды $[H^+] \cdot [OH^-] = 10^{-14}$ следует, что $pH + pOH = 14$. Следовательно, для нейтральной среды $pH = 7$, в кислой среде pH меньше 7, а в щелочной среде pH больше 7.

Применяемое для измерения pH оборудование состоит из стеклянного электрода 2, хлорсеребряного электрода сравнения 4 с соевым мостиком 6 и pH -метра (рис. II).

Стеклянный электрод представляет собой небольшой сосуд I из тонкостенного натриевого стекла толщиной 0,05 мм. Внутри находится раствор кислоты с определенной концентрацией ионов водорода и опущена платиновая проволока. Между поверхностью стекла и контролируемым раствором возникает разность потенциалов, величина которой определяется активностью ионов водорода в растворе и его температурой.

Для создания электрической цепи при измерении применяются

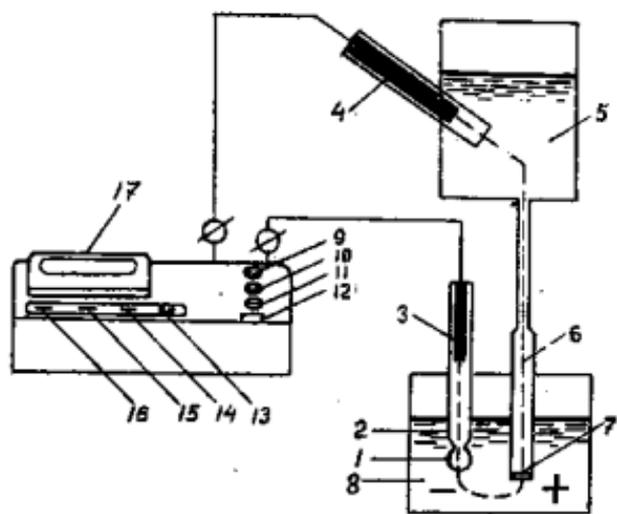


Рис. II. Схема измерения величины pH раствора

температур (при измерении pH растворов, температура которых выше температуры окружающего воздуха) вспомогательный электрод 4 помещают вне контролируемого раствора 8 и связь с ним осуществляется с помощью электролитического ключа 6, трубки, наполненной насыщенным раствором KCl 5 и заканчивающейся пробкой с пористой перегородкой 7. Раствор KCl непрерывно просачивается через стеклянное волокно перегородки, предотвращая проникновение из контролируемого раствора в систему электрода 4 посторонних ионов, которые могли бы изменить величину потенциала электрода.

Измеряя э.д.с. электродной системы с помощью электронного милливольтметра 17, шкала которого градуирована в единицах pH , определяют величину pH контролируемого раствора.

Перед использованием прибора следует убедиться, что pH -метр заземлен. Ручки переключателя рода работы 9 и переключателя размаха шкалы 13 устанавливают соответственно в положение " pH " и " $15pH$ ". Необходимая температурная компенсация устанавливается переключателем 11 в соответствии с температурой измеряемого раствора. Подключенный к сети прибор включают, повернув ручку 14 по часовой стрелке. При этом загорается контрольная лампочка 12.

Перед каждым погружением электродов в контролируемый раствор их следует тщательно промывать дистиллированной водой и удалять с поверхности избыток воды фильтровальной бумагой.

контактные электроды: внутренний контактный электрод 3, осуществляющий контакт с раствором, заполняющим внутреннюю часть стеклянного электрода, и внешний контактный электрод 4 (так называемый вспомогательный электрод), осуществляющий электрический контакт с контролируемым раствором.

Для защиты от воздействия высоких

С целью обеспечения наибольшей точности измерения рекомендуется переключатель 13 устанавливать в положение "ЗрН" только на время отсчета на данном диапазоне, устанавливаемом переключателем 10. Во всех остальных случаях переключатель 13 должен быть установлен в положении "15рН". Отсчет величины рН по шкале прибора 17 следует проводить после уже установившихся показаний. Обычно время установления их не превышает трех минут.

По окончании работы с прибором электроды должны оставаться погруженными в воду. Настройка рН-метра осуществляется с помощью потенциметров 15 и 16.

Большинство биологических жидкостей имеет нейтральную, слабощелочную или слабокислую реакцию среды. Поддержание водородного показателя на определенном уровне имеет большое физиологическое значение, т.к. для течения почти всех биохимических процессов необходимо постоянство реакции среды. В связи с этим многие биологические жидкости обладают буферным действием.

Буферными растворами называются смеси слабой кислоты или слабого основания с собственной солью, обладающие свойством мало изменять рН при разбавлении раствора в пределах 1:100, а также при добавлении к ним небольшого количества свободной кислоты или свободной щелочи.

Величина буферного действия определяется буферной емкостью. Буферная емкость раствора численно равна количеству г-экв (мг экв) сильной кислоты или сильного основания, которое, будучи добавлено к 1 л. раствора, вызывает изменение водородного показателя на единицу. Буферная емкость зависит от концентрации компонентов буферной смеси, в частности, она уменьшается при разведении буферного раствора. Кроме того, буферная емкость зависит от соотношения между концентрациями компонентов и максимальна при равенстве концентраций соли и кислоты.

Буферную емкость можно рассчитать по формуле

$$\beta = \frac{N \cdot V_1}{(pH_1 - pH_0) \cdot V_0} \quad (5)$$

где V_0 - объем буферного раствора, к которому добавлена щелочь или кислота; V_1 - объем добавленной щелочи или кислоты; N - нормальность добавленной щелочи или кислоты; pH_0 - исходный рН буферного раствора; $pH_1 - pH$ буферного раствора при добавлении щелочи или кислоты.

На измерении э.д.с., создаваемой индикаторным электродом, по-

груженным в анализируемый раствор, основан метод потенциометрического титрования. Электродный потенциал зависит от концентрации определяемого иона и титрующего раствора. Преимуществами этого метода является большая точность измерений, хорошая воспроизводимость результатов и резкое изменение потенциала индикаторного электрода вблизи точки эквивалентности.

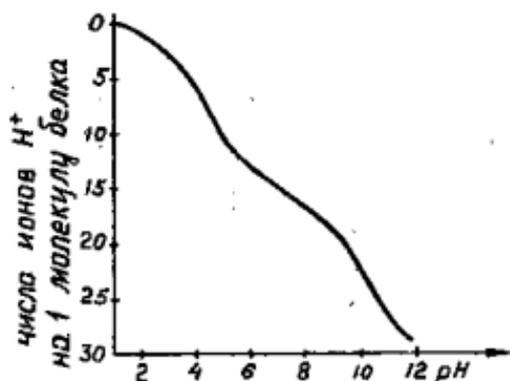


Рис.12.Кривая титрования рибонуклеазы

Потенциометрическое титрование широко используется в биохимии для феноменологического описания свойств белков, определения природы и числа ионогенных групп в молекуле, выявления и оценки степени блокировки групп в структуре белка. Процесс титрования изображается графически в виде так называемых кривых титрования, позволяющих наглядно представить весь процесс титрования (рис.12).

Задание. I. Определение буферной емкости сыворотки крови. Определяют исходное значение pH разбавленной в 10 раз сыворотки крови. Затем в химическом стаканчике к 20 мл раствора сыворотки добавляют 1 мл 0,01 N раствора $NaOH$. После этого определяют pH раствора и по формуле (5) рассчитывают буферную емкость. При очень малых или очень больших сдвигах pH нужно взять новую порцию сыворотки крови и соответственно увеличить или уменьшить количество добавленной щелочи.



Рис.13.График зависимости величины pH раствора белка от количества добавленной кислоты или щелочи. На основании полученных данных строят кривую титрования (рис.13).

2.Потенциометрическое титрование раствора белка. Готовят 50 мл 0,1% раствора белка. Перед титрованием измеряют pH раствора белка. Титруют порции белка по 25мл 0,05N растворами HCl и KOH . К пробе добавляют из микро-бюретки по 1 мл раствора кислот(щелочи), тщательно перемешивают и измеряют pH .

Абсорбционный спектральный анализ

Основан на измерении поглощения (абсорбции) света молекулами твердых, жидких или газообразных веществ. Его подразделяют на два метода: фотометрический и спектрофотометрический. В фотометрическом методе применяют пучок света, содержащий лучи с различной длиной волны. Обычно для этих целей используют видимую область спектра и метод называют колориметрическим, а приборы - колориметрами. В спектрофотометрическом методе применяют монохроматический свет и приборы называют спектрофотометрами.

К о л о р и м е т р и ч е с к и й м е т о д. Обычно применяется для определения концентрации окрашенных растворов. Основан на зависимости оптической плотности раствора от его концентрации и толщины поглощающего слоя. Эта зависимость выражается в форме закона Бугера - Ламберта - Бера (основной закон колориметрии): оптическая плотность растворов при прочих равных условиях прямо пропорциональна концентрации вещества и толщине поглощающего слоя. Аналитически основной закон колориметрии записывается в виде формулы

$$D = \lg(I_0/I) = \epsilon \cdot b \cdot c, \quad (6)$$

где D - оптическая плотность (ее часто называют экстинкцией и обозначают буквой E); I_0 - интенсивность падающего пучка (рис. 14); I - интенсивность пучка, вышедшего из кюветы; ϵ - коэффициент поглощения, зависит от химической природы растворенного вещества и длины волны поглощаемого света; b - толщина поглощающего слоя (длины кюветы); c - концентрация вещества в растворе.

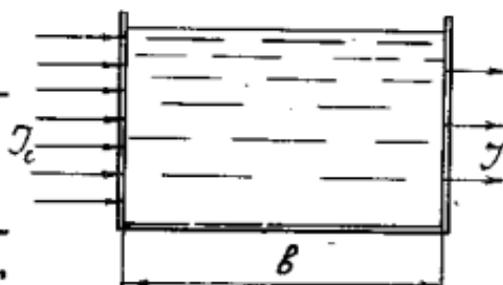


Рис. 14. Прохождение света через раствор

Кроме оптической плотности для характеристики степени поглощения света веществом используется показатель, называемый пропусканием или прозрачностью этого вещества, который вычисляется по формуле

$$T = (I/I_0) \cdot 100\% . \quad (7)$$

Интенсивность окраски используемого раствора можно определить

или путем непосредственного сравнения с раствором известной концентрации, или путем измерения оптической плотности. К приборам непосредственного сравнения относится колориметр погружения Дюбоска.

Устройство колориметра Дюбоска

Массивная стойка с основанием имеет две вертикальные зубчатые рейки, вдоль которых при помощи маховичков перемещают ползуны с поддонами. На поддоны устанавливают стаканчики 1, (рис.15) с

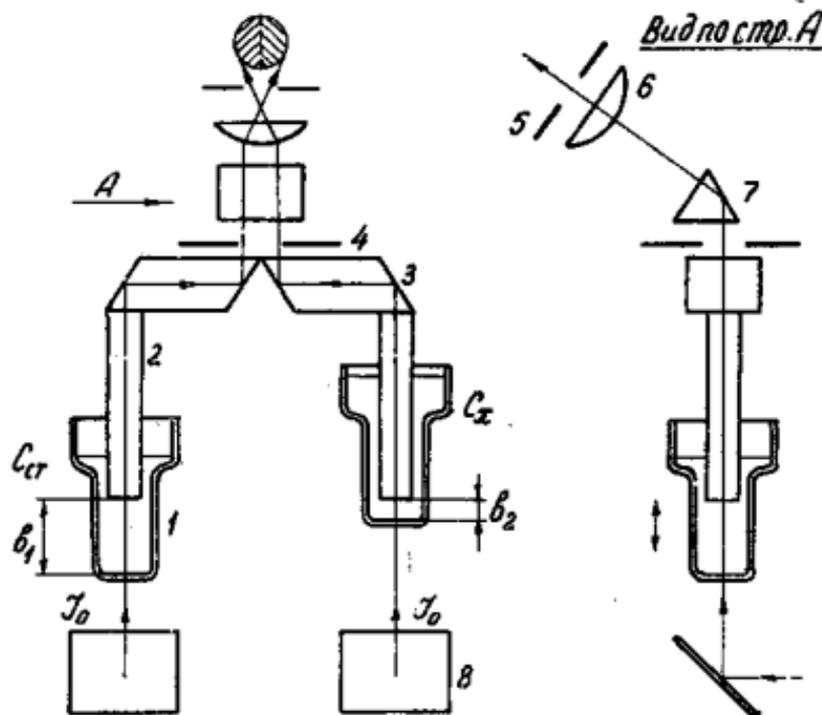


Рис.15. Оптическая схема колориметра Дюбоска

испытуемым и стандартным (известной концентрации) растворами. Положение стаканчиков определяют по шкалам "К", укрепленным на стойке со стороны наблюдателя. Отсчет производится при помощи нониусных линеек, соединенных с ползунами (точность отсчета 0,1 мм). К верхней части крепятся стеклянные цилиндры и головка, в которой смонтированы оптические детали (призмы, окуляр). В нижней части стойки укреплены две поворотные пластинки 8 из матового стекла, наклон

которых можно менять. Стаканчики, содержащие исследуемый и стандартный растворы, освещаются снизу светом, отраженным от пластинок 8. Наблюдение производится сквозь два одинаковых цилиндра 2 из прозрачного стекла. Свет, прошедший через растворы направляется в окулярную часть прибора двумя ромбическими призмами 3, соприкасающиеся части которых образуют поле зрения, ограниченное диафрагмой 4. Глаз наблюдателя, помещенный вблизи выходной диафрагмы 5, видит через окуляр 6 и призму 7 круг, разделенный линией на две части, представляющие собой фотометрические поля. Яркость каждого из полей определяется световым потоком, прошедшим через соответствующую (правую или левую) часть прибора. Перед измерением пластинки 8 устанавливаются так, чтобы левый и правый световые потоки J_0 были одинаковыми. Стаканчики могут независимо друг от друга перемещаться по высоте относительно столбиков, чем и достигается изменение действующей толщины растворов и, следовательно, яркость соответствующей половины поля зрения. Перемещением стаканчиков в процессе измерения добиваются исчезновения границы раздела между половинами поля зрения, что свидетельствует о равной интенсивности правого и левого потоков, выходящих из растворов $J_1 = J_2$. Из уравнения (6) в этом случае следует, что $D_1 = \lg(J_0/J_1) = D_2 = \lg(J_0/J_2)$, значит $\epsilon \cdot b_1 \cdot c_{ст} = \epsilon \cdot b_2 \cdot c_x$.

$$\text{Отсюда } c_x = c_{ст} \cdot b_1 / b_2. \quad (8)$$

Измерение концентрации раствора с помощью колориметра Дюбуа

Прибор устанавливается на столе так, чтобы его две белых пластинки 8 были равномерно освещены естественным дневным светом. Если естественное освещение недостаточно, можно использовать искусственный источник света, который необходимо ориентировать так, чтобы освещались лишь пластинки, а сосуды с растворами и сам наблюдатель оставались в тени. Далее производится уравнивание освещенности обоих стаканчиков. Для этого в них наливают окрашенный раствор какого-либо вещества одной концентрации, а сами стаканчики устанавливают на произвольной, но одинаковой высоте. Совместным поворотом пластинок добиваются высокой освещенности поля зрения, а потом небольшим поворотом пластинок друг относительно друга выравнивают фотометрические поля, наблюдая их в окуляр. Проверка точности уравнивания освещения производится следующим образом. Один из стаканчиков перемещают вверх или вниз, а затем уравнивают им фотометрические поля и берут отсчет. Если среднее значение, вычисленное для

нескольких таких отсчетов, не будет отличаться от установки неподвижного стаканчика более чем на $\pm 0,2$ мм, то уравнивание освещения считается удовлетворительным. В процессе последующих измерений положение пластин, а также всего прибора не должно нарушаться.

Измерения на колориметре производятся только с окрашенными растворами.

Если известно, что исследуемый раствор в диапазоне измеряемых концентраций подчиняется зависимости, выражаемой уравнением (8), то измерения упрощаются и производятся следующим образом. В один из стаканчиков наливают исследуемый раствор, а в другой раствор того же вещества, но известной концентрации (стандартный раствор). Один стаканчик (любой) устанавливают на произвольной высоте. Удобнее, чтобы это положение соответствовало целому числу миллиметров в средней части шкалы "К". Глядя в окуляр и смещая второй стаканчик по высоте, уравнивают яркости обеих половин поля зрения. Взяв несколько отсчетов, определяют толщину жидкости во втором стаканчике и находят искомую концентрацию по формуле (8).

В том случае, когда нет уверенности, что исследуемый раствор подчиняется вышеупомянутой зависимости, измерениям предшествует построение градуировочного графика. Для этого готовят несколько (5-10) вспомогательных растворов с известными концентрациями исследуемого вещества. Концентрации этих растворов должны охватывать область возможных изменений концентраций исследуемых в дальнейшем растворов. Один из вспомогательных растворов, имеющий примерно среднюю концентрацию, принимают за стандартный. В один из стаканчиков наливают вспомогательный раствор наименьшей концентрации и устанавливают его на целый отсчет (например, "15") в средней части шкалы "К". В другой наливают стандартный раствор и, перемещая этот стаканчик, уравнивают фотометрические поля. Получают средний отсчет. Затем заменяют вспомогательный раствор другим, с большей концентрацией, и, не меняя установки стаканчика с вспомогательным раствором, уравнивают поля, также смещая стаканчик со стандартным раствором. Подобным образом колориметрируют все остальные вспомогательные растворы в порядке увеличения их концентрации. Полученные результаты изображают графически, откладывая по горизонтальной оси концентрацию раствора, а по вертикальной соответствующий ей отсчет по шкале "К" стандартного раствора. Полученные точки соединяют плавной кривой, которая может более или ме-

нее приближаться к прямой. На графике обязательно указывают концентрацию стандартного раствора, а также отсчет, на который устанавливался стаканчик с вспомогательными растворами. При наличии градуировочного графика последующее определение неизвестной концентрации раствора того же вещества не представляет затруднений. Для этого стаканчик с исследуемым раствором устанавливают на высоте, указанной при градуировке. Другой стаканчик со стандартным раствором исследуемого вещества помещают в другом пучке и перемещением его уравнивают поля. Получив среднее из нескольких отсчетов, по графику находят неизвестную концентрацию.

Для более точного измерения необходимо брать растворы, отличающиеся по концентрации друг от друга не более, чем в 3-4 раза. Если диапазон измеряемых концентраций выходит за эти пределы, применяют разведение концентрированных растворов, измеряют их концентрацию, а затем производят пересчет с учетом кратности разведения.

Задание. 1. Познакомиться с устройством и работой колориметра Дюбоска.

2. Приготовить серию стандартных окрашенных растворов (например, CuSO_4) равной концентрации и построить по ним градуировочный график.

3. Пользуясь градуировочным графиком определить неизвестную концентрацию раствора, полученного у преподавателя.

4. Определить концентрацию этого же раствора по формуле (8). Результаты, полученные в обоих случаях, сравнить между собой.

Измерение оптической плотности растворе

Производится с помощью фотометра: визуального или фотоэлектрического. Упрощенная оптическая схема визуального фотометра (рис. 16, А) включает следующие элементы: источник света 1, светофильтры 2, кюветы 3, 4, диафрагмы 5, 6 с изменяемой площадью отверстия и окуляр 6, через который видно поле зрения, состоящее из двух половин, как в колориметре Дюбоска. Обе диафрагмы полностью открыты. Интенсивность лучей \mathcal{I}_0 , падающих на кюветы, одинакова. В кювету 3 надвигают раствор, в кювету 4 - растворитель. Луч, выходящий из кюветы 3, имеет интенсивность \mathcal{I}_1 , из кюветы 4 - \mathcal{I}_2 . Разница $\mathcal{I}_2 - \mathcal{I}_1$ дает значение интенсивности света, поглощенной растворенным веществом. Для того, чтобы яркость обоих фотометрических полей, наблюдаемых через окуляр, стала одинаковой, необходимо луч, прошедший через кювету с растворителем, ослабить в $\mathcal{I}_2/\mathcal{I}_1$ раз. Отно-

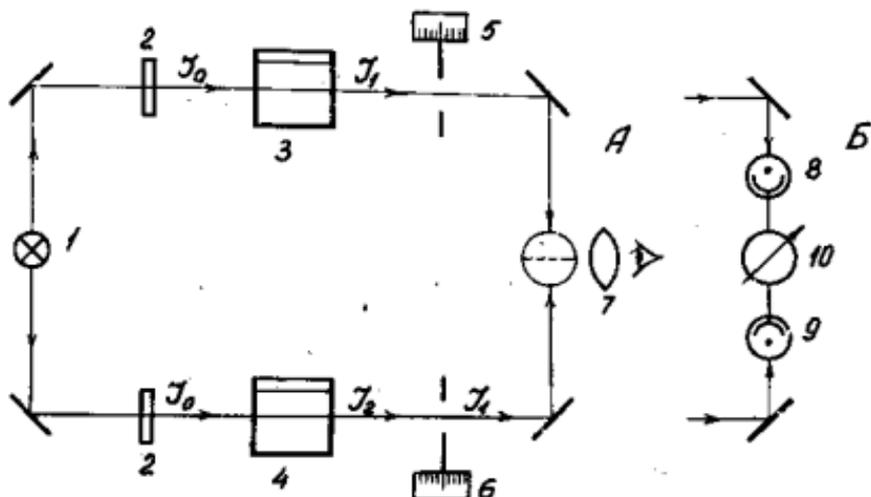


Рис.16. Упрощенная схема фотометра визуального (А) и фотоэлектрического (Б)

отношение J_1/J_2 есть пропускание, или прозрачность T , а $e_d (J_2/J_1)$ — оптическая плотность D раствора (точнее, растворенного вещества). Ослабление потока производят путем уменьшения площади отверстия диафрагмы 6, имеющей барабан со шкалами T (в процентах) и D . Вращение барабана производят до исчезновения границы между фотометрическими полями, после чего берут отсчет значений T или D по соответствующей шкале барабана. Чтобы устранить погрешность измерения, связанную с возможным различием интенсивности световых потоков, падающих на кветы, последние меняют местами и оптическую плотность определяют с помощью диафрагмы 5, которая также имеет барабан со шкалами T и D . Затем вычисляют среднее арифметическое значение из замеров по диафрагмам 5 и 6, которое и принимают за величину оптической плотности раствора.

Для точного уравнивания световых потоков в более совершенных фотометрах — фотоэлектрических (рис.16,Б), используются два фотоэлемента 8,9, подключенных к нуль-гальванометру 10. При достижении равной интенсивности потоков, падающих на фотоэлементы, электрические токи взаимно уравниваются, и стрелка гальванометра устанавливается на нуле.

Рассмотренные фотометры называются двухлучевыми. Наиболее часто в лабораторной практике используются двухлучевые фотометры, снабженные фотоэлементами и работающие в видимой области спектра. Их на-

зывают фотоэлектрическими колориметрами (ФЭКами). С помощью ФЭКа можно определить прозрачность T и оптическую плотность D лишь окрашенного раствора. В отдельных случаях используются однолучевые фотоэлектродколориметры различных конструкций.

Устройство двухлучевого фотоэлектрического колориметра-нефелометра ФЭК - 56М и работа на нем

Предназначен для измерения прозрачности и оптической плотности окрашенных растворов, а также для относительного измерения интенсивности рассеяния взвесей, эмульсий и коллоидных растворов в проходящем свете (при работе прибора в качестве нефелометра).

Прибор состоит из измерительного блока и блока питания.

Оптическая схема (рис.17) смонтирована в измерительном блоке.

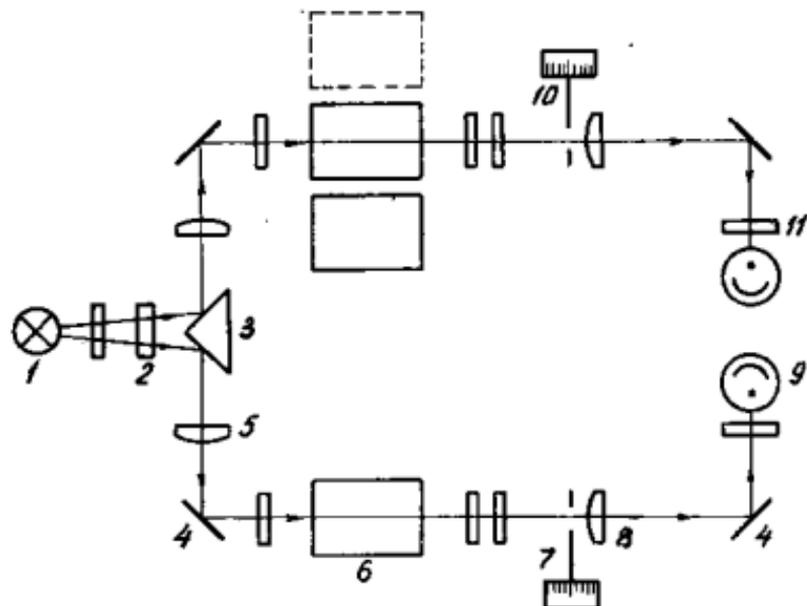


Рис.17. Оптическая схема колориметра-нефелометра ФЭК-56М

Световой пучок от источника 1, пройдя через светофильтр 2, попадает на призму 3, которая делит его на правый и левый. Затем эти пучки проходят через линзы 5, отражаются от зеркала 4, проходят через кюветы 6, диафрагмы 7 и 10, линзы 8, вновь отражаются от зеркал 4 и падают на матовые стекла 11, за которыми располагаются фотоэлементы 9. Правый световой пучок является измерительным, левый - компенсационным. В измерительный пучок вводится последовательно кюветы с

раствором и растворителем. В компенсационный пучок устанавливается кювета с растворителем. Раздвижные диафрагмы 7 и 10 при вращении связанных с ними барабанов меняют свою площадь и, тем самым, интенсивность световых пучков, падающих на фотоэлементы 9. Уравновешивание правого и левого пучков контролируется с помощью нуль-гальванометра, к которому подключены фотоэлементы.

Перед измерением оптической плотности раствора на фотоэлектроколориметре необходимо произвести установку осветителя, выбрать светофильтр и кювету.

Установка осветителя. Чтобы правый и левый пучки света полностью проходили через кюветы и попадали на фотоэлементы, необходимо произвести установку осветителя (лампа накаливания РНВ-35 или ртутно-кварцевая лампа ДРК-120), для чего открывает крышку кюветного отделения и в трубки измерительных диафрагм вставляют пластмассовые пробки, входящие в комплект прибора. С помощью регулировочных винтов передвигают источник света до полного освещения обоих белых кружков на пробках. После этого пробки извлекают из трубок измерительных диафрагм.

Выбор светофильтра. Поглощение веществом энергии, соответствующей видимой и ультрафиолетовой областям спектра, сопровождается переходом электронов из основного состояния в возбужденное. Оптическая плотность, характеризующая эффективность этого поглощения энергии, в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера зависит от концентрации раствора, толщины светопоглощающего слоя (кюветы) и коэффициента поглощения, величина которого, в свою очередь, определяется химической природой раствора и длиной световой волны. Для повышения точности измерения берут длину волны с максимальной оптической плотностью раствора (при прочих равных условиях). Если значение этой длины в методике задано, то устанавливают светофильтр с оптическим диапазоном, включающим указанную длину волны. Если длина волны неизвестна, то необходимо по табл. 2 в зависимости от цвета раствора предварительно выбрать светофильтр, цвет которого является дополнительным по отношению к раствору.

После этого измеряют оптическую плотность раствора для выбранного светофильтра и двух других, расположенных от него с разных сторон. Окончательно устанавливают тот из них, при котором оптическая плотность окажется максимальной.

Область максимального поглощения лучей раствором, нм	Цвет раствора	Цвет светофильтра
400 - 450	Желто-зеленый	Фиолетовый
450 - 480	Желтый	Синий
480 - 490	Оранжевый	Зелено-синий
490-510	Красный	Сине-зеленый
510 - 560	Пурпурный	Зеленый
560 - 575	Фиолетовый	Желто-зеленый
575 - 590	Синий	Желтый
590 - 625	Зелено-синий	Оранжевый
625 - 750	Сине-зеленый	Красный

В прибор ФЭК-56М вмонтированы 9 светофильтров со следующими оптическими характеристиками (табл.3):

Полуширина пропускания светофильтра численно равна диапазону длин волн, в котором пропускание $T \geq 0,5 T_{\text{max}}$. Так, для светофильтра № 4 границы этого диапазона 420 и 460 нм.

Выбор кюветы. При определении концентрации окрашенного раствора по величине его оптической плотности минимальная ошибка будет при значении $D = 0,4$. Поэтому рекомендуется путем соответ-

Таблица 3

№ на ручке прибора	Длина волны, соответствующая максимуму пропускания, нм	Полуширина пропускания, нм
1	315 ± 5	35 ± 15
2	364 ± 5	25 ± 10
3	400 ± 5	45 ± 10
4	440 ± 5	40 ± 15
5	490 ± 10	35 ± 10
6	540 ± 10	25 ± 10
7	582 ± 10	30 ± 10
8	600 ± 10	-
9	630 ± 10	-

ствующего выбора кювет, по возможности, работать вблизи указанного значения оптической плотности. Чем больше отклонение от 0,4, тем больше погрешность в измерении концентрации раствора. В комплект прибора входят кюветы с рабочей длиной 1, 3, 5, 10, 20, 30, 50 мм и соответственно с ориентировочным объемом 0,5; 1, 2, 4, 8,

12, 20 мл. Предварительный выбор кюветы производится визуально, соответственно интенсивности окраски раствора. Если раствор темный, следует пользоваться кюветой с малой рабочей длиной (1 или 3 мм). В случае слабо окрашенных растворов рекомендуется использовать кювету с большей рабочей длиной (30 или 50 мм). При построении градуировочного графика зависимости оптической плотности от концентрации раствора берут раствор со средней концентрацией и для выбранного светофильтра находят кювету, при которой \mathcal{D} лежит в диапазоне 0,3–0,5. С этой кюветой производят все последующие измерения концентраций данного раствора, стремясь существенно не выходить за пределы оптической плотности 0,2–0,6. В противном случае необходимо перейти на работу с другой кюветой (с большей или меньшей рабочей длиной), при этом на градуировочном графике указывается длина кюветы.

Измерение оптической плотности. Подключить с помощью вилки прибор к электрической сети. Переключить тумблер на блоке питания в положение, соответствующее типу установленного осветителя. Включить тумблер сетевого напряжения на блоке питания и дать электрической схеме прогреться в течение 30 минут при закрытой шторке прибора. С помощью рукоятки, расположенной на левой стенке прибора, установить стрелку микроамперметра на "0" (установка "Электрического нуля"). Рукоятку чувствительности прибора поставить в среднее положение. Установить нужный светофильтр (рукоятка слева). Заполнить до метки две кюветы растворителем и одну – окрашенным раствором. Рабочие поверхности кювет должны перед каждым измерением тщательно протираться. Наличие загрязнений или капель раствора на рабочих поверхностях кюветы приводит к получению неверных результатов измерения. При работе с кюветами нельзя касаться пальцами рабочих участков поверхностей (ниже уровня жидкости в них). В кюветодержатель левого луча света поместить кювету с растворителем (или дистиллированной водой, если растворитель не окрашен). В кюветодержатель правого луча света установить кюветы с растворителем и окрашенным раствором. Открыть шторку прибора. В правый пучок света с помощью рукоятки поместить кювету с исследуемым раствором. Правый барабан установить на отсчет "100" по шкале коэффициента пропускания. Вращением левого измерительного барабана установить стрелку микроамперметра на "0". Если это сделать не удается, то в правый световой пучок устанавливают поглотитель

(входит в комплект прибора), который позволяет с помощью левого барабана перевести стрелку микроамперметра на нуль. Поворотом рукоятки заменить в правом лучке квету с раствором на квету с растворителем, при этом происходит смещение стрелки микроамперметра, установленный на "0". Вращением правого измерительного барабана добиться первоначального нулевого положения стрелки и отсчитать по шкале правого барабана величину оптической плотности (или коэффициента пропускания) раствора. Измерение производится несколько раз и берется среднее арифметическое значение. При измерениях барабан измерительной диафрагмы рекомендуется подводить к индексу с одной стороны для исключения погрешности, вызванной люфтом в механизме. После завершения всех измерений отключить прибор от сети, тщательно вымыть кветы и осушить их фильтровальной бумагой.

Как правило, при измерениях пользуются лампой накаливания РН8-35. С ртутно-кварцевой лампой ДРК-120 работают при измерении в ультрафиолетовой области спектра. С этой же лампой можно измерять и в видимой области спектра, если имеется необходимость пользоваться очень узкими линиями спектра.

Задание. 1. Познакомиться с устройством ФЭКа и работой на нем
2. Проверить правильность установки осветителя, при необходимости отъюстировать его.

3. Приготовить 10 стандартных растворов белка возрастающей концентрации от 1 до 10 мг/мл.

4. Приготовить биуретовый реактив. Для этого 0,15 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и 0,6 г $NaKCO_3 \cdot 4H_2O$ (натрий-калий виннокислый) растворяют в 50 мл. воды. При энергичном перемешивании приливают туда 30 мл 10% раствора $NaOH$ (свободного от Na_2CO_3), добавляют 0,2 г KJ для предотвращения самопроизвольного восстановления и раствор доводят водой до 200 мл. Раствор хранят в полиэтиленовой или парафинированной посуде.

5. С приготовленными стандартными растворами белка провести биуретовую реакцию. Для этого к 1 мл раствора добавить 4 мл биуретового реактива, перемешать и оставить при комнатной температуре на 30 минут. Раствор приобретает сине-фиолетовую окраску за счет медных комплексов по месту пептидных связей.

6. На фотоэлектроколориметре при длине волны 540-650 нм. определить оптическую плотность растворов и построить градуировочный график зависимости этого показателя от концентрации раствора, предварительно выбрав квету с соответствующей рабочей длиной.

7. Используя градуировочный график, определить неизвестную концентрацию белкового раствора, полученного у преподавателя.

Техника безопасности. 1. Не располагать вблизи прибора громоздкие изделия, создающие неудобства в работе оператора. 2. Все регулировочные работы, связанные с проникновением за постоянные ограждения к токоведущим частям прибора, смена ламп, замена неисправных деталей, отсоединение кабеля с разъемами производится после отключения вилки прибора от электросети. 3. При эксплуатации прибор должен быть надежно заземлен.

Устройство однолучевого фотоэлектрического колориметра А1 - ЕЦ2 - С и работа на нем

В биохимических лабораториях наряду с двухлучевыми фотоэлектродколориметрами используются и однолучевые, например, прибор марки А1-ЕЦ2-С. Оптическая схема его (рис.16-А) содержит следующие эле-

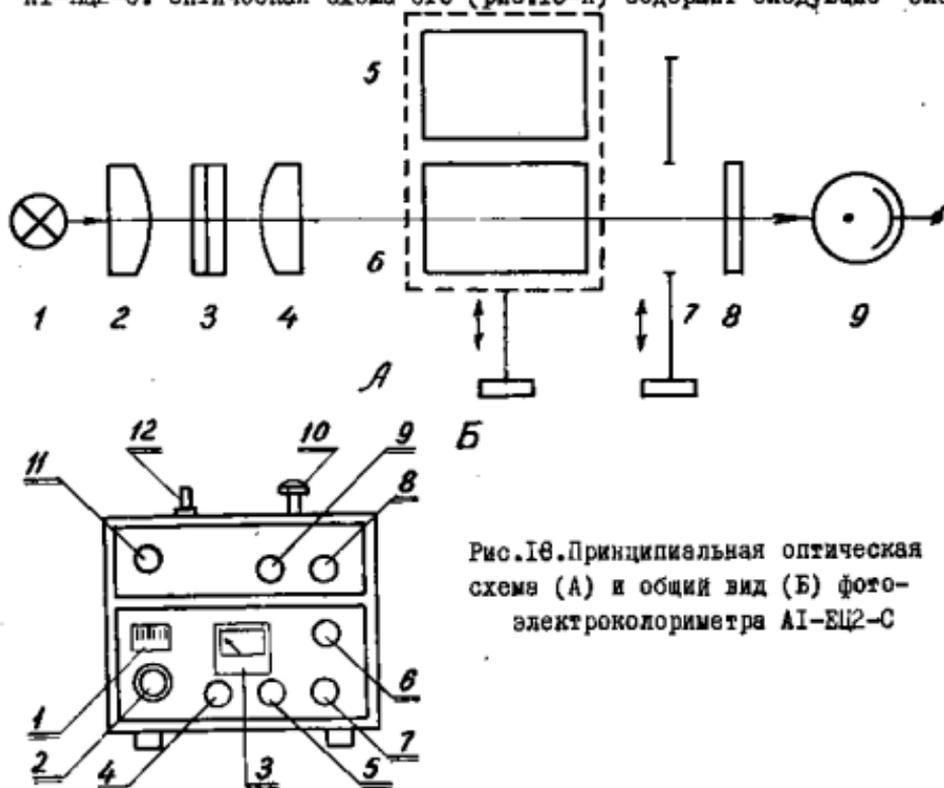


Рис.16. Принципиальная оптическая схема (А) и общий вид (Б) фотоэлектродколориметра А1-ЕЦ2-С

менты: источник света 1, конденсор, 2, интерференционный светофильтр 3, коллимационную линзу 4, кюветы 5 и 6, защитное стекло 8 и фотозлемент 9. Перед защитным стеклом фотозлемента установлена шторка-переключатель 7. На пути светового потока поочередно устанавливаются кюветы с растворителем и испытуемым раствором. Оптическая плотность (или пропускание) раствора определяется по соответствующей шкале отсчетного реохорда.

Подготовка фотоэлектроколориметра к работе выполняется в следующем порядке.

Корректором нуля установить стрелку микроамперметра на нулевую отметку.

Установить интерференционный светофильтр нужной длины волны, предварительно вынув заглушку I2 (рис. I8-Б).

Перекрыть световой поток, поступающий на фотозлемент, шторкой, для чего утопить ось рукоятки 8.

Выключить тумблер 7, подсоединить прибор к сети и вновь включить тумблер 7.

Проверить правильность установки источника света (порядок описан в паспорте на прибор).

Прогреть прибор с открытым фотозлементом в течение 30 минут, для чего ручку 8 выдвинуть на себя до упора, а после прогрева утопить ее до упора.

Проверить установку нуля, для чего необходимо:

ручкой 6 установить стрелку микроамперметра 3 против нулевой отметки; ручкой 2 совместить нулевую отметку шкалы светопропускания с визиром; ручку 9 выдвинуть на себя до упора; ручкой 8 перекрыть световой поток, для чего выдвинуть ее до упора на себя и затем утопить до положения, при котором еще не произошло переключение тумблера, т.е. не было щелчка. Стрелка микроамперметра должна установиться против нулевой отметки (допускается несовпадение стрелки с нулевой отметкой на величину не более ± 1 мм).

Проверить установку 100% пропускания. Для этого ручкой 2 совместить 100% шкалы светопропускания с визиром, ручку 8 выдвинуть на себя до упора; ручками чувствительности "грубо" и "плавно" установить стрелку микроамперметра на нулевую отметку; ручку 9 утопить до упора. Стрелка микроамперметра должна установиться против нулевой отметки (допускается несовпадение ± 1 мм).

Определение оптической плотности (или светопропускания) выполняется в следующем порядке.

В кюветное отделение установить кюветы с растворителем и исследуемым раствором. Последняя устанавливается в отсек каретки, расположенной ближе к задней стенке прибора. Закрывать крышку 10 кюветного отделения.

Ручку 8 утопить до упора, ручкой 6 установить стрелку микроамперметра в нулевое положение.

Установить шторку-переключатель в положение "открыто", выдвинув на себя до упора ручку шторки 8.

Привести стрелку микроамперметра в нулевое положение ручкой "грубо" 4 и более точно ручкой "плавно" 5.

Установить кювету с исследуемым раствором на пути светового потока, выдвинув на себя до упора ручку 9. Длину кюветы нужно выбрать такой, чтобы максимальная оптическая плотность не превышала 0,4.

Вращением ручки 2 привести стрелку микроамперметра в нулевое положение. Величину коэффициента светопропускания или оптической плотности исследуемого раствора считать по шкале I. Измерение каждого раствора рекомендуется производить не менее трех раз, после чего необходимо вычислить среднее арифметическое значение.

По окончании работы необходимо: отключить прибор от сети; утопить ось рукоятки 8; извлечь и убрать светофильтр, а на его место поставить заглушку 12; вымыть и осушить фильтровальной бумагой кюветы, после чего убрать их.

Задание. I. Познакомиться с устройством фотоэлектроколориметра и работой на нем.

2. Для стандартных растворов белка, приготовленных на предыдущем занятии (хранить в холодильнике), используя биуретовый реактив, построить градуировочный график. Сравнить с ранее построенным графиком.

3. Используя градуировочный график, определить неизвестную концентрацию белкового раствора, полученного у преподавателя.

Техника безопасности. 1. При размещении прибора на столе должен быть обеспечен свободный доступ к нему для включения прибора и снятия показаний по шкале. 2. Оператору, обслуживающему прибор, категорически запрещается вскрывать его и производить какие-либо работы в электрической схеме. 3. Перед началом работы необходимо надежно заземлить прибор, используя клемму "земля".

С п е к т р о ф о т о м е т р и я - метод, в котором измеряется поглощение монохроматического (точнее, узкого по спектральному составу) пучка света образцом. Отличительной чертой спектрофотометров по сравнению с фотоэлектрическими колориметрами, является наличие источника монохроматического света (монохроматора). Последний состоит из источника света, диспергирующего устройства (призмы или дифракционной решетки) и щели регулируемой ширины. На образец можно направить монохроматический свет любой длины в пределах оптического диапазона спектрофотометра.

Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой области. Поглощение света обусловлено переходом электронов из их основного состояния в возбужденное. Видимые и ультрафиолетовые спектры поглощения обычно представляют в форме зависимости оптической плотности от длины волны (рис.19). На спектр оказывает влияние применяемый растворитель. По спектру поглощения можно установить химическую природу вещества, т.е. осуществить качественный анализ его, а также определить концентрацию раствора. Для этого, как и при работе на ФЭКе, предварительно строится градуировочный график зависимости оптической плотности для одной из длин волн от концентрации раствора исследуемого вещества.

Максимум поглощения белков лежит при длине волны 280 нм, нуклеиновых кислот - при 260 нм. Из отечественных спектрофотометров, работающих в оптическом и ультрафиолетовом диапазоне, наибольшее распространение в биохимических лабораториях получили приборы следующих марок: СФ-4А (сейчас не выпускается), СФ-16, СФ-26. На рис.20 представлена оптическая схема одного из спектрофотометров.

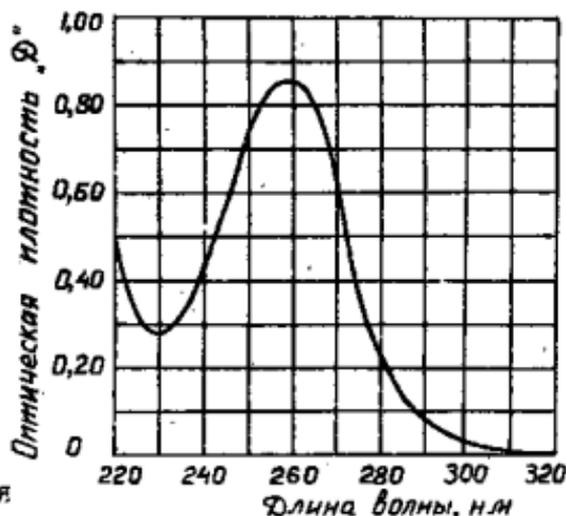


Рис.19. Спектр поглощения аденозин-3ⁱ-фосфата в 0,1 и HCl

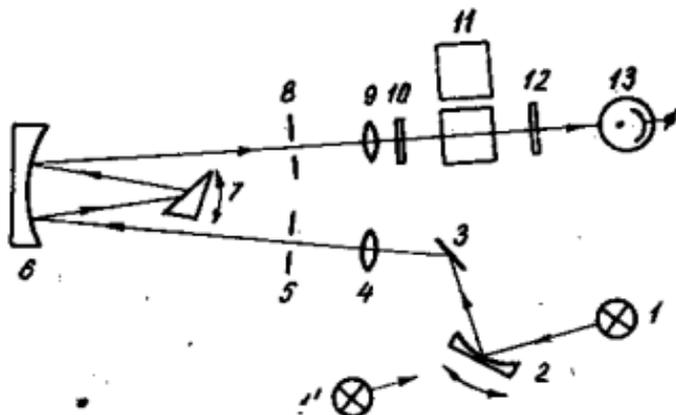


Рис.20. Оптическая схема спектрофотометра СФ-16:
 I, I¹ - источники света (лампа накаливания и дейтериевая лампа); 2 - зеркальный конденсор; 3 - плоское зеркало; 4 - линза; 5 - входная щель; 6 - зеркальный объектив; 7 - диспергирующая призма; 8 - выходная щель; 9 - линза; 10 - светофильтр; II - кюветы; 12 - защитная пластинка; 13 - фотозем-
 элемент

Характерными конструктивными особенностями спектрофотометров, работающих в ультрафиолетовой области, являются: использование кварцевой оптики (включая кюветы), водородной (дейтериевой) лампы и сурьмяно - цезиевого фотоземента.

Задание. I. По техническому описанию и инструкции познакомиться с устройством спектрофотометра, освоить правила работы на нем.

2. Построить спектр поглощения мононуклеотида или нуклеиновой кислоты в оптическом диапазоне 220-320 нм с интервалом 5 нм. Растворитель $O, LiHCO_3$ и O, Li_2CO_3 . Концентрация исследуемого вещества подбирается с таким расчетом, чтобы максимальная оптическая плотность раствора лежала в пределах 0,6 - 0,7.

3. Построить спектр поглощения индивидуального белка.

Растворитель - вода или буферный раствор. Оптический диапазон - 220-320 нм, интервал - 5 нм. Концентрацию раствора белка подобрать аналогично п.2.

При выполнении работ на спектрофотометре необходимо строго соблюдать правила техники безопасности, приводимые в описании прибора.

Спектрофотометрия в инфракрасной области. Происхождение инфракрасных спектров обусловлено главным образом колебаниями атомов в

молекуле. Спектр обычно состоит из большого числа полос (рис.21). Для молекулярного анализа важно, что часть полос связана с колебаниями отдельных атомных группировок, в определенной мере сохраняющих свои свойства в разных молекулах.

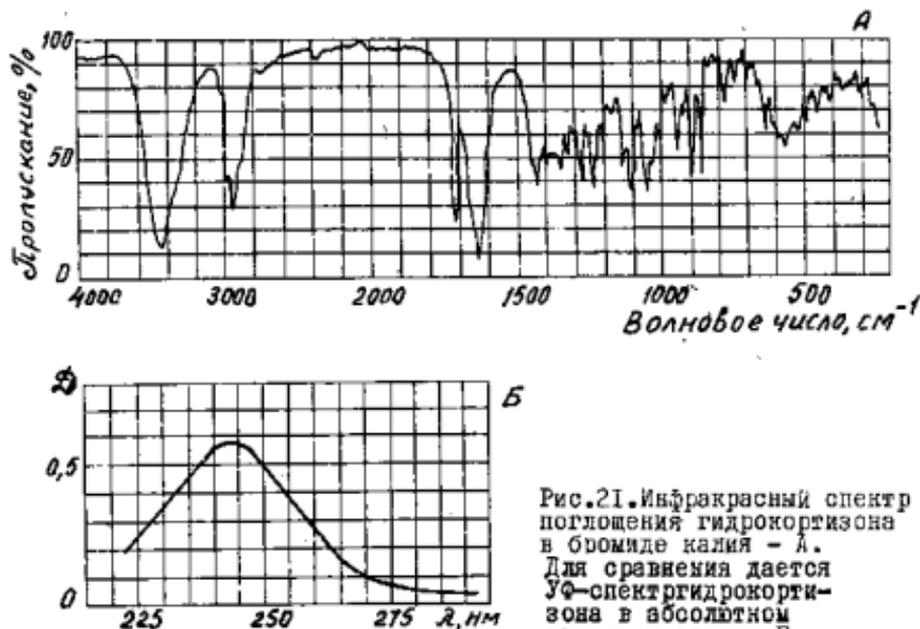


Рис.21. Инфракрасный спектр поглощения гидрокортизона в бромиде калия - А. Для сравнения дается УФ-спектр гидрокортизона в абсолютном этиловом спирте - Б.

Длину волны в инфракрасной (ИК) спектрофотометрии часто вырезают в обратных сантиметрах (см^{-1}), или волновых числах. Волновое число - это число длин волн, уместающихся в одном сантиметре; оно обратно длине волны, выраженной в сантиметрах.

Характерными конструктивными особенностями инфракрасных спектрофотометров являются: использование отражательной оптики и оптических элементов, выполненных из галогенидов щелочных металлов (фтористого лития, хлористого натрия, бромистого калия) и термоэлектрического приемника света (болометра).

В связи с тем, что инфракрасные лучи поглощаются водой, для получения спектра водные растворы веществ использовать нельзя. Часто используют твердые растворы исследуемых веществ в бромиде калия, который прозрачен в этой области спектра. Для этого 2 мг вещества смешивают с 200 мг бромида калия (категории для инфракрасной спектрометрии) в агатовой ступке в течение 5 мин. Полученную смесь помещают в пресс-форму (рис.22 А), которую ставят

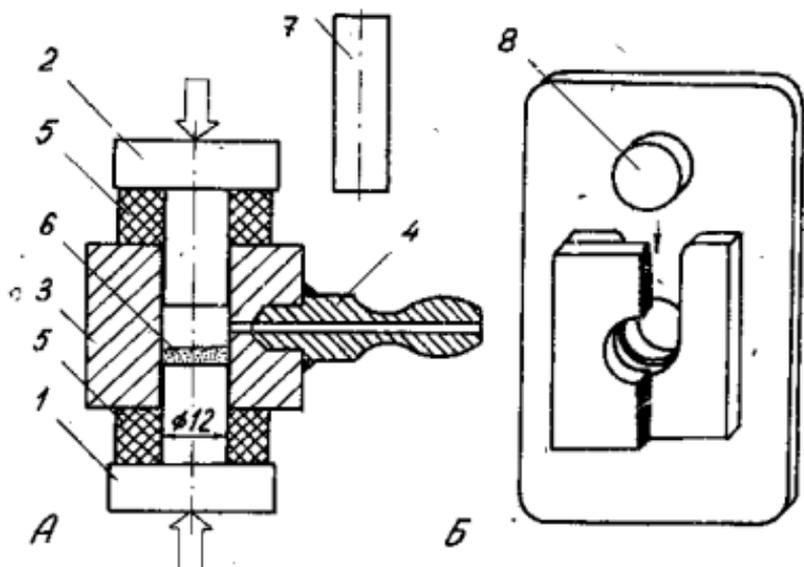


Рис.22. Пресс-форма - А и оправка для таблетки - Б (работаны Ю.П.Фроловым). Пресс-форма изготовлена из нержавеющей стали, оправка - из гекстолита

под пресс и слегка сдавливают. При этом благодаря облатию резиновых шайб 5 создается герметичность внутреннего объема пресс-формы. С помощью вакуум-насоса через патрубок 4 из этого объема откачивают воздух (5 мм рт.ст.) и прессуют под давлением около 1000 кг/см², не прекращая эвакуирования воздуха. Получают прозрачную таблетку, извлекают ее из пресс-формы, для чего снимают пуансоны 1, 2 и резиновые шайбы и с помощью выталкивателя 7 прессом выжимают таблетку из корпуса 3 на лист чистой бумаги. Затем таблетку 8 помещают в оправку. Последнюю вставляют в пазы против одного из лучей двухлучевого спектрофотометра "Спектромом-2000". Против другого луча в такой же оправке помещают таблетку, полученную путем прессования 200 мг бромида калия. Она выполняет роль кюветы с чистым раствором.

В связи с тем, что область валентных колебаний O-H и H-H в материале пробы частично перекрывается полосами поглощения O-H связей воды, необходимо использовать обезвоженный бромид калия и обезвоженную пробу. Удаление влаги достигается путем прокаливания КВз и хранения его, пробы и полученных таблеток в вакуумном эксикаторе (для этой цели удобно использовать микроанаэрозат, запол-

ненный силикагелем). Таблетки можно брать только перчатками.

Задание. 7. Познакомиться с устройством инфракрасного спектрофотометра.

2. Приготовить прессованные таблетки какого-либо органического соединения (дает преподаватель) и бромида калия.

3. Снять спектр (или познакомиться с ранее снятым), найти на нем характерные частоты колебаний атомных группировок, используя для этого справочные данные (даются преподавателем).

Нефелометрический и турбидиметрический методы анализа

При прохождении пучка света через оптически неоднородную среду, содержащую взвесь мельчайших твердых или жидких частиц, имеет место боковое рассеяние света (рис.23).

Нефелометрический анализ основан на зависимости интенсивности рассеянного света \mathcal{I}_p от концентрации частиц, которая для сильно разбавленных суспензий и эмульсий, а также коллоидных растворов, выражается формулой

$$\mathcal{I}_p = k \cdot c, \quad (9)$$

где k — коэффициент пропорциональности, зависящий от размера частиц, длины волны падающего света и других параметров; c — концентрация частиц.

В нефелометрах обычно измеряется интенсивность света, рассеянного в каком-то направлении (рис.23).

Турбидиметрический анализ основан на зависимости интенсивности света, вышедшего из кюветы \mathcal{I} , от концентрации частиц. Зависимость для сильно разбавленных суспензий, эмульсий и коллоидных растворов выражается формулой

$$D = \lg(\mathcal{I}_0/\mathcal{I}) = k \cdot b \cdot c, \quad (10)$$

где k — константа, зависящая от размера частиц, длины волны падающего света и других параметров; b — толщина поглощающего слоя; c — концентрация частиц.

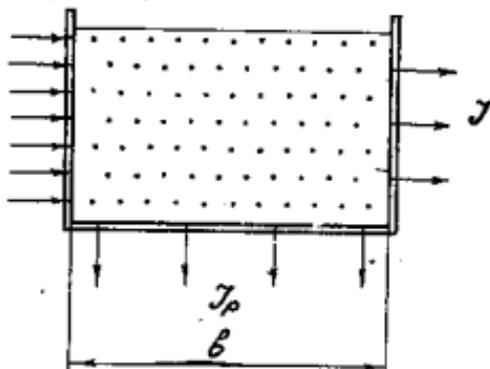


Рис.23. Рассеяние света при прохождении через взвесь частиц в растворителе

В этом уравнении величина \mathcal{D} называется рассеивающей способностью и аналогична оптической плотности для истинных растворов.

Определение концентрации частиц с помощью нефелометра Дюбоска

Рассмотренный ранее колориметр Дюбоска (см. рис. 15) позволяет определять концентрацию не только истинных окрашенных растворов, но и различного рода мутных растворов, содержащих твердые или жидкие частицы. Для этого необходимо использовать кюветы 5 с непрозрачным дном и изменить схему освещения их (рис. 24). Осветитель состоит из лампы накаливания 1, матового стекла 2 и конденсора 3, заключенных в металлический корпус. Световой поток, падающий на кювету, сверху ограничен металлической шторкой 4. При нефелометрических измерениях остается в силе формула (8).

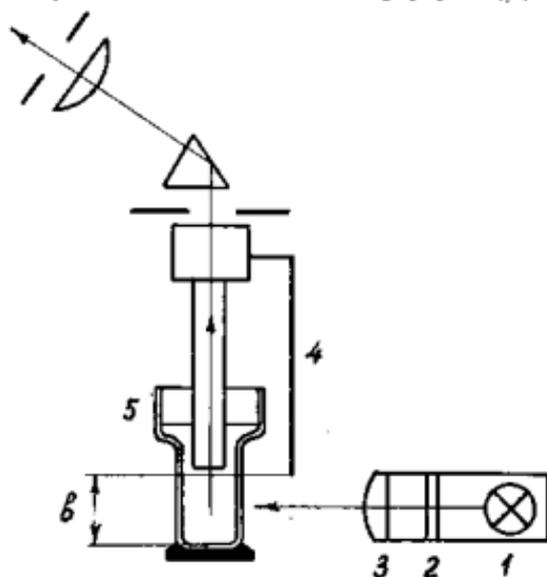


Рис. 24. Оптическая схема нефелометра Дюбоска

Нефелометрические измерения рекомендуется проводить в полностью затемненном помещении, так как посторонний свет мешает работе, в особенности при измерении слабо мутных объектов. Методика работы на нефелометре не отличается от методики, описанной для колориметрических измерений. Цветность объекта в данном случае принципиального значения не имеет. Если мутность измеряемой взвеси невелика и, кроме того, мало отличается от мутности стандартной взвеси, то измерения можно проводить, пользуясь лишь одной взвесью с известной концентрацией (стандартной взвесью). Обе жидкости (испытуемую и стандартную) наливают в нефелометрические стаканчики (с непрозрачным дном). Стаканчики устанавливают на поддоны, а нефелометр — в гнездо осветителя. Включают осветитель. Один из стаканчиков устанавливают на высоте, соответствующей какому-либо целому отсчету в средней части шкалы "Н", а перемещением другого стаканчика уравнивают фотометрические поля по яркости. Взяв несколько отсчетов по шкале "Н" и, получив среднее значение,

определяют неизвестную концентрацию по формуле (8).

При измерении объектов, значительно отличающихся по концентрации, может сказаться поглощение верхними слоями жидкости света, рассеянного нижними слоями. Это поглощение сильно растёт с увеличением концентрации. В таких случаях рекомендуется, для получения более точных результатов, измерения проводить, пользуясь не формулой (8), а предварительно построенным градуировочным графиком. Такой график получают на основании измерений нескольких вспомогательных взвесей с известными концентрациями.

Задание. I. Приготовить серию стандартных коллоидных растворов крахмала (категории "для нефелометрии") или белка с низкой концентрацией (в пределах десятых долей грамма на литр).

2. Построить градуировочный график и, пользуясь им, определить неизвестную концентрацию раствора, полученного у преподавателя.

3. Определить концентрацию этого же раствора по формуле (8). Результаты, полученные в обоих случаях, сравнить между собой.

Определение концентрации частиц турбидиметрическим методом

В связи с тем, что при колориметрических и турбидиметрических измерениях зависимость между степенью ослабления светового потока и концентрацией раствора (взвеси) выражается сходными формулами (6 и 10), колориметр можно использовать для определения концентрации мутных растворов. К числу таких приборов относится ранее рассмотренный ФЭК-56М, который правильнее называть не колориметр-нефелометр, а колориметр-турбидиметр. Порядок работы на приборе при определении концентрации мутных растворов такой же, как и при проведении колориметрических измерений. Шкала \mathcal{D} в этом случае показывает не оптическую плотность, а рассеивающую способность.

Задание. I. Для ранее приготовленных стандартных коллоидных растворов крахмала или белка (см. предыдущее задание) построить градуировочный график зависимости рассеивающей способности \mathcal{D} от концентрации раствора. Кювету брать со средней рабочей длиной. Светофильтр выбрать такой, чтобы для данной кюветы с раствором величина \mathcal{D} была наибольшей.

2. Пользуясь градуировочным графиком, определить неизвестную концентрацию раствора, полученного у преподавателя.

Рефрактометрический метод анализа

Основан на измерении рефракции, или преломления света, под которым понимают изменение направления светового луча при переходе из одной среды в другую. Количественно величина преломления оценивается с помощью показателя преломления. Наиболее часто в практической работе используют показатель преломления, замеренный по отношению к воздуху для желтой линии в спектре натрия ($\lambda_D = 589,3 \text{ нм}$) при температуре 20° . Его значение (n_D^{20}) обычно приводится в таблицах (рис.25).

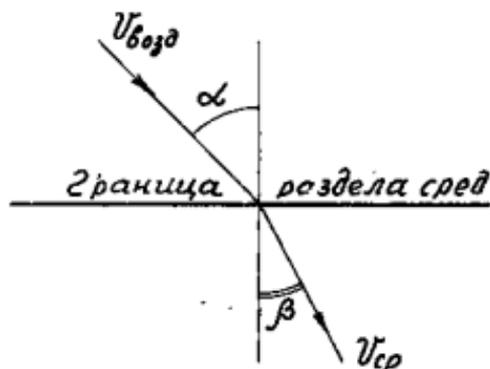


Рис.25. Преломление света на границе раздела двух сред

Величина показателя преломления зависит от концентрации вещества. На этом основано определение концентрации растворов с помощью рефрактометрического анализа.

Для идентификации вещества наряду с показателем преломления используется средняя дисперсия

$$\Delta_{FC} = n_F - n_C, \quad (I2)$$

где n_F и n_C - показатели преломления вещества для синей ($\lambda_F = 486,1 \text{ нм}$) и красной ($\lambda_C = 656,3 \text{ нм}$) линий.

Значение молекулярной рефракции R , которое легко найти экспериментально и достаточно просто вычислить теоретически, позволяет идентификацию вещества произвести с еще большей достоверностью. Величину молекулярной рефракции при экспериментальных определениях рассчитывают по формуле

$$R = (n_D^2 - 1) \cdot M / (n_D^2 + 2) \cdot d, \quad (I3)$$

где M - молекулярный вес вещества; d - плотность вещества.

Показатель преломления n вычисляют по формуле

$$n = v_{\text{возд}} / v_{\text{ср}} = \sin \alpha / \sin \beta, \quad (II)$$

где $v_{\text{возд}}$ и $v_{\text{ср}}$ - соответственно скорость света в воздухе и исследуемой среде (веществе). При этом измеряют предельный угол преломления β_n , под которым распространяется преломленный луч при угле падения $\alpha = 90^\circ$. Для данного случая $n = \frac{1}{\sin \beta_n}$.

Так, для воды
$$R = \frac{(1,33299^2 - 1) \cdot 18,02}{(1,33299^2 + 2) \cdot 0,9977} = 3,715.$$

Пользуясь свойством аддитивности молекулярной рефракции, ее вычисляют как сумму атомных рефракций по формуле

$$R_{C_xH_yO_z} = x \cdot R_C + y \cdot R_H + z \cdot R_O, \quad (14)$$

где R_C, R_H, R_O - атомные рефракции углерода, водорода и кислорода; $R_{C_xH_yO_z}$ - молекулярная рефракция химического соединения $C_xH_yO_z$. Для воды $R = 2R_H + R_O = 2 \cdot 1,100 + 1,525 = 3,725$.

Расхождение с ранее вычисленной величиной невелико, менее 0,3%. Если в молекуле имеются двойные или тройные связи между атомами углерода, в формуле (14) добавляют слагаемые, учитывающие эти связи (инкременты двойных или тройных связей).

Устройство и работа рефрактометров

С помощью рефрактометра измеряется показатель преломления и средняя дисперсия вещества. В некоторых специализированных рефрактометрах имеется дополнительная шкала, с помощью которой непосредственно определяют процентную концентрацию того или иного вещества (часто сахара) в растворе. Существуют два основных вида рефрактометров: типа Аббе и типа Пульфриха. В обоих измерение показателя преломления основано на определении величины предельного угла преломления β_n .

Рефрактометры типа Аббе. Из отечественных рефрактометров к ним относятся: ИРФ-22; РДУ (рефрактометр дисперсионный универсальный); РЛ (рефрактометр лабораторный); его модификация РПЛ-3 (рефрактометр пищевой лабораторный), позволяющий определять содержание сухих веществ по сахарозе в продуктах сахарной промышленности, и другие.

Характерным для рефрактометров типа Аббе является наличие призматического блока, состоящего из осветительной 1, (рис.26) и измерительной 2 призм, между которыми вводится исследуемая жидкость 5. Путем поворота призматического блока или зрительной трубы 3 добиваются, чтобы в поле зрения ее граница света и тени проходила через пересечение двух прямых линий 4. Изображенный на рис.26 луч, выходящий с левого крайнего участка шероховатой поверхности осветительной призмы, падает на измерительную призму под углом α , немного меньшим 90° , т.к. слой жидкости имеет конечную толщину. Поэтому угол β_n будет несколько меньшим, чем предельный угол преломления.

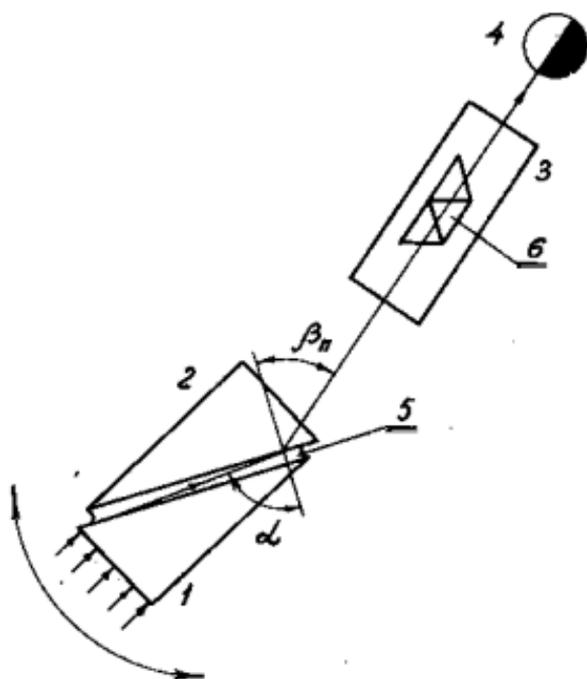


Рис.26. Принципиальная схема рефрактометра типа Аббе

при проведении точных измерений призмы рефрактометра термостатируются путем пропускания через их камеры воды, имеющей постоянную температуру (обычно 20°).

Наиболее часто в лабораторной практике используют рефрактометр ИРФ-22. Измерения на нем производят в такой последовательности:

Соединить верхнюю и нижнюю части измерительной головки (включающие в себя призмы) между собой резиновой трубкой и подключить их к жидкостному термостату, настроенному на температуру 20° .

Откинуть верхнюю часть измерительной головки; с помощью мягкой салфетки, смоченной спиртом, протереть поверхности измерительной и осветительной призм и дать им высохнуть.

На поверхность измерительной призмы стеклянной палочкой нанести несколько капель дистиллированной воды и осторожно закрыть головку. Через окно осветительной призмы проверить, полностью ли вода заполнила зазор между измерительной и осветительной призмами.

Это расхождение невелико и оно определяет погрешность прибора ($\pm 2 \cdot 10^{-4}$). После совмещения границы света и тени с перекрестием в поле зрительной трубы вращением призмы Амичи 6 с помощью специального маховичка устраняют окрашенность этой границы. Значение показателя преломления находят на соответствующей шкале в отсчетной системе прибора, величину средней дисперсии определяют по делениям барабана, связанного с

маховичком, вращающим призмы Амичи. При про-

Осветительное зеркало (справа) установить так, чтобы свет источника через окно осветительной призмы равномерно освещал поле зрения, наблюдаемое через окуляр.

С помощью откидного зеркала (слева) добиться хорошего освещения шкалы показателей преломления.

Наблюдая в окуляр зрительной трубы и вращая маховичок (слева), связанный с измерительной головкой, находят границу раздела света и тени.

Вращением маховичка (справа), связанного с призмами Амичи, устранить окрашенность границы раздела света и тени.

С помощью маховичка, связанного с измерительной головкой, установить значение показателя преломления $n_D^{20} = 1,33299$, которое имеет вода. Если при этом граница раздела не совпадает с перекрестием сетки, с помощью ключа путем поворота калибровочного винта добиваются их совмещения. После этого откидывают верхнюю часть измерительной головки и фильтровальной бумагой просушивают поверхности призм. Прибор подготовлен к работе.

Для измерения показателя преломления исследуемой прозрачной жидкости ее аналогичным образом наносят на измерительную призму и закрывают головку. Найдя границу раздела света и тени и устранив окрашенность ее с помощью маховичка, связанного с измерительной головкой, точно совмещают границу раздела света и тени с перекрестием сетки и снимают отсчет по шкале показателей преломления. Индексом для отсчета служит неподвижный горизонтальный штрих сетки. Целые, десятые, сотые и тысячные доли значения показателя преломления отсчитывают по шкале, десятичные доли оценивают на глаз. Шкала показателей преломления приведена для температуры 20° . Величину средней дисперсии $n_F - n_C$ находят следующим образом. После определения по шкале показателей преломления вращают маховичок, связанный с призмами Амичи, в одном направлении, при этом получают десять положений его, когда в поле зрения окуляра наблюдается четкая, неокрашенная граница раздела света и тени. Записывают количество делений по дисперсионному лимбу, соответствующее каждому из этих десяти положений маховичка, вычисляют среднее арифметическое значение \bar{z} для них. По таблице, прилагаемой к описанию на прибор, для измеренного n_D находят величины A и B а для \bar{z} — значение σ . Среднюю дисперсию вычисляют по формуле

$$n_F - n_C = A + B \cdot \sigma . \quad (15)$$

Рефрактометры типа Пульфриха имеют только одну призму - измерительную. На верхнюю грань - катет (рис.27) призмы I наклеивают цилиндрический стаканчик 2 с исследуемой жидкостью. Предельный угол преломления β_n определяют путем поворота зрительной трубы 3 до совмещения границы между светом и тенью с перекрестием прямых линий. В связи с тем, что в этом рефрактометре можно получить угол падения строго равный 90° , величину n_D находят с точностью $1 \div 2 \cdot 10^{-5}$. Из отечественных приборов этого типа наибольшее распространение получил рефрактометр ИРФ-23. С устройством его и порядком работы по определению показателя преломления студентам предлагается познакомиться по описанию на прибор.

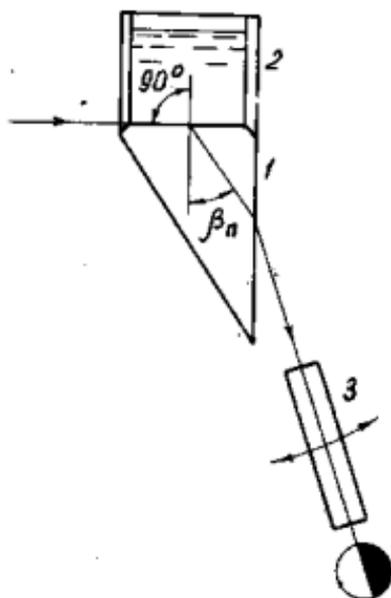


Рис.27. Принципиальная схема рефрактометра типа Пульфриха

2. Построить график зависимости показателя преломления раствора какого-либо вещества (сахарозы, хлорида натрия или калия и др., по заданию преподавателя) от концентрации. Пользуясь этим графиком определить неизвестную концентрацию данного вещества.

3. Пользуясь значениями атомных рефракций и инкрементов двойных и тройных связей (табл.4), вычислить величину молекулярной рефракции R для предложенного преподавателем соединения (глицерин, этанол, пропанол, бензол и др.).

4. Для этого же соединения определить с помощью рефрактометра значение n_D и среднюю дисперсию. Затем с помощью пикнометра и аналитических весов определить относительную плотность данного соединения по формуле

$$\alpha = (g_B - g_0) / (g_{H_2O} - g_0), \quad (16)$$

где g_B - вес пикнометра с исследуемым веществом и пробкой;

g_{H_2O} - вес пикнометра с дистиллированной водой и пробкой; g_0 - вес пустого, хорошо просушенного пикнометра с пробкой.

Таблица значений атомных рефракций и инкрементов связей

Атом(связь)	R	Атом(связь)	R
H	1,100	N (в первичных аминах)	2,322
F	0,997	N (во вторичных аминах)	2,502
Cl	5,967	N (в третичных аминах)	2,840
Br	8,865	S (в меркаптанах)	7,810
I	13,900	S (в алкилсульфидах)	8,000
C	2,418	S (в тиофенах)	7,260
Двойная углеродная связь	1,733	O (гидроксильный)	1,525
Тройная углеродная связь	2,398	O (эфирный)	1,643
		O (карбонильный)	2,211

Затем по формуле (13) вычислить значение R и сравнить с ранее найденным (см. п.3).

5. Познакомиться с устройством рефрактометра типа Пульфриха (ИРФ-23) и работой на нем.

Поляриметрический метод анализа

Основан на зависимости угла вращения плоскости поляризации плоскополяризованного света от концентрации оптически активного вещества в растворе. Для растворов оптически активных веществ эта зависимость выражается в следующем виде:

$$\beta = \alpha_0 \cdot C \cdot \ell \quad (17)$$

Здесь C - концентрация оптически активного вещества; α_0 - удельное вращение, зависит от химической природы вещества, растворителя и длины волны света; ℓ - толщина слоя раствора.

Таким образом зависимость между углом поворота β и концентрацией раствора C линейная, что позволяет достаточно просто определять величину последней.

Круговой поляриметр типа СМ дает возможность определять углы вращения в пределах $\pm 360^\circ$. Состоит из осветителя 1 (рис.28), светофильтра 2, конденсора 3, посылающего параллельный пучок неполяризованного света на поляризатор 4. Из поляризатора плоскополяризованный луч падает на кювету 6 с исследуемым веществом, которое вызывает поворот плоскости поляризации на угол β . Анализатор 7 делит

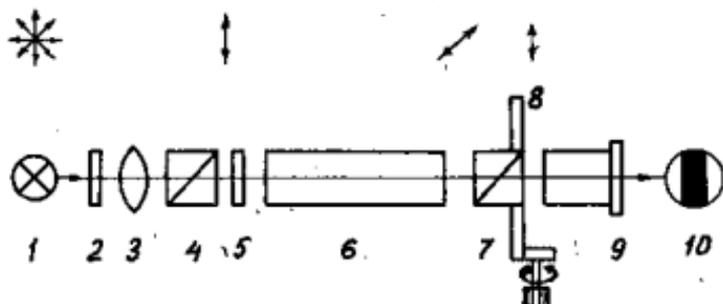


Рис.28. Оптическая схема кругового поляриметра

луч, вышедший из кюветы, на обыкновенный и необыкновенный, причем обыкновенный луч он задерживает, а необыкновенный — пропускает. Это ведет к снижению яркости поля, наблюдаемого через окуляр 9. Чтобы вновь получить исходную яркость, необходимо повернуть анализатор на такой угол, на какой исследуемое вещество повернуло поляризованный луч. Величину этого угла находят на лимбе 8. Для более точного поворота анализатора в поисках плоскости поляризации вышедшего из кюветы пучка, в оптическую схему введена диафрагма с кварцевой пластинкой 5, расположенной так, чтобы через нее проходили только лучи средней части пучка. Пластинка отклоняет плоскость поляризации света, вышедшего из поляризатора, на $5-7^{\circ}$. Благодаря этому зрительное поле 10 состоит из трех частей. При правильной установке анализатора границы между частями исчезают. В круговом поляриметре поляризатор и анализатор изготовлены из герпатита, обладающего дихроизмом, т.е. избирательным поглощением обыкновенного и необыкновенного лучей.

Перед работой проверяют установку прибора. Для этого в кювету наливают дистиллированную воду и анализатор устанавливают в нулевое положение (по лимбу). Поле зрения должно быть равномерно затемнено, линии раздела частей почти не видны.

Затем в кювету наливают раствор оптически активного вещества известной концентрации, поворачивают анализатор в положение равномерного затемнения и отсчитывают по лимбу (и кониусу) угол вращения плоскости поляризации β . Прделав указанную операцию для ряда растворов с известной концентрацией, строят график зависимости угла вращения плоскости поляризации от концентраций. С помощью этого графика можно определить неизвестную концентрацию данного вещества по замеренному значению угла β .

Задание.1. Для 8-10 растворов оптически активного вещества (сахарозы, глюкозы, фруктозы и др., по указанию преподавателя) определить величину угла вращения плоскости поляризации. Определение угла производить по результатам пяти замеров путем нахождения средней арифметической.

2. Построить график зависимости угла вращения от концентрации вещества.

3. С помощью графика по замеренному углу вращения определить неизвестную концентрацию раствора.

Люминесцентный метод анализа

Основан на использовании холодного свечения веществ, которое называется люминесценцией. Различают несколько видов люминесценции: фотолюминесценцию, катодолюминесценцию, триболюминесценцию, электролюминесценцию, хемолюминесценцию, рентгенолюминесценцию.

При люминесцентном анализе наиболее часто используют фотолюминесценцию, т.е. свечение вещества, вызываемое падающей на него лучистой энергией. Спектр фотолюминесценции и его максимум всегда сдвинуты относительно спектра поглощения (возбуждающего свечение) и его максимума в сторону длинных волн. На этом законе Стокса-Ломмеля основано широкое использование ультрафиолетовых лучей в люминесцентном анализе. При облучении многих веществ невидимым ультрафиолетовым светом имеет место свечение веществ видимым светом. После прекращения облучения свечение прекращается. Такая разновидность фотолюминесценции называется флуоресценцией.

Для разбавленных растворов интенсивность фотолюминесценции прямо пропорциональна концентрации раствора. На этой закономерности основано использование фотолюминесценции для определения концентрации растворов. Однако при дальнейшем увеличении концентрации раствора интенсивность люминесценции снижается и при высоких концентрациях наступает полное тушение люминесценции. Такое тушение называется концентрационным. Для измерения интенсивности свечения применяют специальные приборы - флуориметры. Для определения концентрации раствора с помощью флуориметра предварительно строят график зависимости интенсивности свечения от концентрации и по нему определяют неизвестную концентрацию раствора. При отсутствии флуориметра концентрацию раствора определяют следующим образом. Приготавливают ряд пробирок с растворами исследуемого вещества возрастающей концентрации. Затем

в темном помещении сравнивают интенсивность свечения раствора с неизвестной концентрацией и приготовленных растворов. Среди последних находят пробирку, интенсивность свечения которой близка к интенсивности свечения пробирки с исследуемым раствором.

Задание. I. Приготовить 15-20 пробирок с водным раствором рибофлавина (витамин B_2) возрастающей концентрации.

2. В темном помещении в ультрафиолетовых лучах аппарата для определения витаминов визуально наблюдать зависимость интенсивности свечения от концентрации рибофлавина и концентрационное тушение флуоресценции.

3. Путем сравнения интенсивности свечения исследуемого раствора со свечением приготовленных растворов с известной концентрацией определить неизвестную концентрацию исследуемого раствора.

Техника безопасности. При работе с газоразрядными лампами ультрафиолетового света необходимо пользоваться очками с бесцветными или желтыми стеклами и работать в отдельном затемненном помещении с хорошей вентиляцией, так как в воздухе образуется озон.

Из большого количества физических методов анализа, применяемых в биохимии, в настоящем пособии кратко рассмотрены лишь две: электронная микроскопия и вискозиметрия. Кроме них в биохимических исследованиях используют эмиссионный спектральный анализ, масспектроскопию, рентгеноструктурный анализ, электронный парамагнитный резонанс (ЭПР), ядерный магнитный резонанс (ЯМР), метод ультрацентрифугирования, двойное лучепреломление в потоке, активационный анализ, метод меченых атомов и многие другие.

Электронная микроскопия

Широкое применение электронной микроскопии в биологии, прежде всего, обусловлено высоким разрешением, позволяющим исследовать тонкие детали строения клеточных структур.

Применение специфических контрастирующих веществ, избирательно связывающихся с определенными химическими компонентами клеточных структур, позволяет с помощью электронного микроскопа выявить локализацию этих химических соединений в клетке, исследовать структурно-функциональные особенности органоидов клетки. Этот раздел электронной микроскопии, возникший на стыке морфологии и биохимии, называется электронной гистохимией.

Еще большие возможности в изучении внутриклеточного метаболизма открывает сочетание электронной микроскопии с автордиографией, так называемый метод электронно-микроскопической автордиографии.

Электронная микроскопия позволяет исследовать не только субклеточные структуры, но и отдельные крупные биологические молекулы (нуклеиновые кислоты, белки).

Работа на электронном микроскопе требует специальной подготовки. Получение срезов для световой и электронной микроскопии имеет принципиальное сходство и включает фиксацию, обезвоживание,

заливку, получение срезов (резку на ультрамикротоме), контрастирование. При исследовании макромолекул применяются свои специфические приемы подготовки объекта к электронному микрофотографированию (изготовление пленок-подложек, отенение в вакууме, получение реплик и др.) Все эти операции достаточно трудоемки и требуют выработки определенных навыков работы.

Для предварительного ознакомления с методом электронной микроскопии студентам предлагается кратко изучить устройство и работу электронного микроскопа УЭМВ-100К и ультрамикротоме УМТП-3.

Назначение и технические данные электронного микроскопа УЭМВ-100 К

Универсальный электронный микроскоп УЭМВ-100К предназначен для визуального и фотографического исследования объектов. Он позволяет: а) исследовать объекты на просвет в широком диапазоне увеличений; б) получать стереоскопические снимки с объекта при работе на просвет; в) получать светлопольные и темнопольные изображения; г) производить дифракционные исследования избранного участка на просвет; д) производить микродифракционные исследования участков объектов с локальностью 1-2 мкм; е) исследовать объекты, в том числе, живые, в газовой среде (при использовании специальной приставки), а также выполнять ряд других операций.

Электронно-оптическая система прибора обеспечивает регулируемое увеличение прибора от 300 до 200000 крат. Разрешаемое расстояние при работе с объективным наконечником высокого разрешения 9 \AA . Максимальное значение ускоряющего напряжения 100 кв, потребляемая мощность 4 ква. Съемка изображения производится на фотопластинке размером 6,5x9,0 см. Рабочий вакуум в колонне $1 \div 2 \times 10^{-4}$ мм рт.ст. Расход воды для охлаждения микроскопа 5л/мин. Общий вес микроскопа 950 кг.

Устройство электронного микроскопа УЭМВ-100К и назначение основных частей

Электронный микроскоп состоит из колонны, стенда, вакуумной системы, пультов управления и системы питания. Конструктивно колонна, вакуумная система и пульты управления расположены на столе стенда микроскопа. Система питания состоит из двух отдельных блоков: шкафа низковольтного питающего устройства и высоковольтного выпрямителя. Колонна микроскопа включает в себя всю электроннооп-

тическую систему, состоящую из осветителя (электронная пушка и блок конденсоров), объектива, проекционного блока и фотокамеры, соединенных между собой жестко, что делает прибор более виброустойчивым. Оптическая схема микроскопа представлена на рис.29.

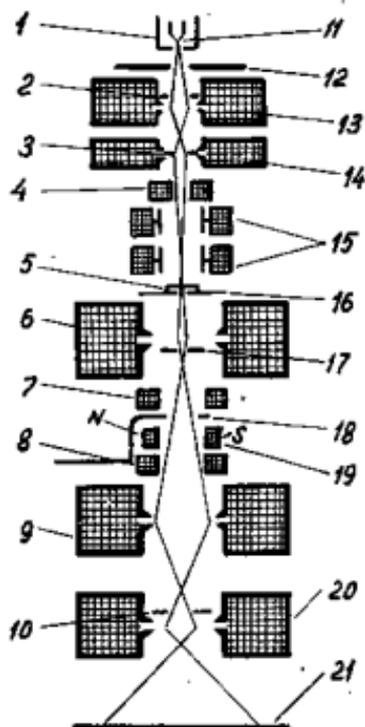


Рис.29. Оптическая схема микроскопа: 1 - фокусирующий электрод; 2 - диафрагма первого конденсора; 3 - диафрагма второго конденсора; 4 - стигматор второго конденсора; 5 - объект; 6 - объективная линза; 7 - стигматор объективной линзы; 8 - стигматор промежуточной линзы; 9 - промежуточная линза; 10 - диафрагма поля зрения; 11 - катод; 12 - анод; 13 - первый конденсор; 14 - второй конденсор; 15 - катушка для юстировки осветителя; 16 - столик объектов; 17 - апертурная диафрагма; 18 - селекторная диафрагма; 19 - механизм юстировки объектива; 20 - проекционная линза; 21 - экран

Назначение колонны — получение увеличенного изображения объекта на экране микроскопа и фотоснимков этого изображения, а также дифракционной картины объекта (электронограммы).

Вакуумная система состоит из одного механического и двух диффузионных насосов, вакуумных ловушек, баллона предварительного разрежения, вакуумных клапанов, реле, трубопроводов и других элементов. Назначение вакуумной системы — создать и поддерживать вакуум $1 \div 2 \times 10^{-4}$ мм рт.ст. в колонне микроскопа в процессе работы микроскопа, а также после шлюзования камеры объекта и фотокамеры при замене объекта и фотопластинок.

На двух пультах управления находятся ручки управления линзами, стигматорами, напряжением накала нити, ускоряющим напряжением.

Здесь же находятся лампочки, сигнализирующие о плохом вакууме и включении ускоряющего напряжения, а также ряд других элементов управления и контроля. Кроме пультов управления на стенде, который представляет собой механически прочное основание микроскопа, крепится распределительный щит. На его панели выведены все вспомогательные ручки управления, которыми оператор пользуется редко; выключатель напряжения сети, выключатели форвакуумного и диффузионных насосов, выключатели низкого напряжения, комнатного освещения и др.

Блоки питания обеспечивают электрическое питание всех узлов электронного микроскопа от сети трехфазного переменного тока с напряжением 220 или 380 в. Электропитание состоит из канала питания электронной пушки, пяти каналов питания электромагнитных линз, канала питания стигматоров и юстировочных катушек и некоторых других каналов.

Работа на электронном микроскопе УЭМБ-100К

Электронный микроскоп представляет собой сложный прибор, нормальная эксплуатация которого требует квалифицированного обслуживания.

Персонал, обслуживающий микроскоп, должен быть обучен правилам технической эксплуатации и техники безопасности при работе на установках с высоким напряжением.

Подготовка электронного микроскопа и работа на нем осуществляются последовательно:

Включить сеть. Включить форвакуумный насос и откачать вакуумную систему до давления 5×10^{-2} мм.рт.ст. Включить диффузионный насос и подать воду для охлаждения вакуумной системы прибора. Откачать колонну до давления $6 \div 8 \times 10^{-2}$ мм.рт.ст. ("Предварительный вакуум"). Произвести переключение вакуумной системы на режим "Откачка микроскопа на высокий вакуум". Залить жидкий азот в высоковакуумную ловушку. Рабочий вакуум в колонне должен быть равен $1 \div 2 \times 10^{-4}$ мм.рт.ст. Его величину измеряют с помощью вакуумметра, индикаторная часть которого находится на стенде микроскопа. Включить низкое напряжение и дать возможность прогреться блокам питания. Включить высокое (ускоряющее) напряжение. Пустить воду в систему охлаждения электромагнитных линз. Произвести юстировку микроскопа. Ввести исследуемый объект в прибор. Сфокусировать изображение реостатами объективной линзы. Выбрать интере-

сущий участок изображения и вывести его на середину экрана ручками управления. Установить необходимое увеличение с помощью реостатов промежуточной линзы, фокусируя изображение реостатами грубой и точкой регулировки объективной линзы.

Перечень этих операций, данный в укрупненном, недетализированном виде, свидетельствует о необходимости выработки ряда специальных навыков, не встречающихся при работе на световых микроскопах.

Задание. I. Познакомиться с устройством электронного микроскопа и назначением его основных частей.

2. Познакомиться с порядком работы на электронном микроскопе.

Устройство ультрамикротомы УМТП-3

При работе на электронном микроскопе используют срезы толщиной 500 - 1000 Å. Достижимое разрешение частично зависит от толщины среза и обычно равно примерно одной десятой этой величины. Поэтому желательно получать по-возможности более тонкие срезы. Срезы для электронной микроскопии изготавливают на ультрамикротоме, различающихся, прежде всего, по способу подачи объекта (заточенного блока) на стеклянный или алмазный нож во время резки.

В пьезоэлектрическом ультрамикротоме УМТП-3 для подачи объекта на нож, плавного подвода объекта к ножу (до получения первого среза) и образования зазора между ножом и объектом во время обратного хода коромысла, используются склеенные в столбик специальные керамические элементы, к которым подведено электрическое напряжение. Удлинение этих пьезострикционных элементов пропорционально приложенному к ним электрическому напряжению, что позволяет плавно регулировать толщину среза.

В состав ультрамикротомы входят режущий блок с бинокулярным микроскопом и блок управления, смонтированные на столе. Вес ультрамикротомы 210 кг, питание от сети переменного тока напряжением 220 в. Усилие резания создается силой тяжести коромысла 2 (рис.30), а скорость резания регулируется изменением сечения передускного отверстия гидравлического регулятора скорости 7. Подъем коромысла осуществляется фигурным кулачком 8, насаженным на вал электродвигателя. Усилие от кулачка 8 на коромысло 2 передается через рычаг подъема коромысла 9 с роликом. Микроперемещение объекта 4 на нож 5 осуществляется с помощью пьезокерамического блока I, на который подается электрическое напряжение. Нож крепится на суппорте 6, ко-

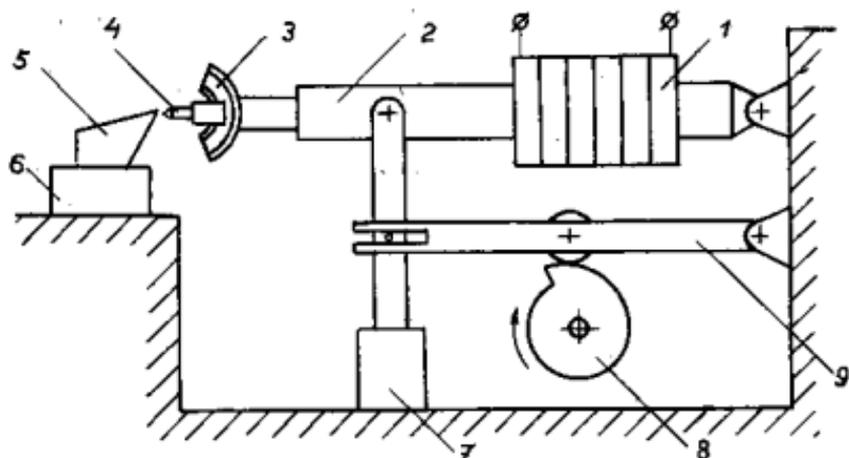


Рис.30. Принципиальная схема режущего блока

торый с помощью винтового привода можно перемещать в продольном направлении вручную. Ориентацию объекта (заточенного блока) по отношению к ножу можно изменять с помощью гониометра 3. Объект и нож освещаются миниатюрной лампой дневного света, наблюдение за подводкой объекта к ножу и процессом резания производится через бинокулярный микроскоп.

Величина подачи объекта на нож (толщина среза) регулируется плавно в пределах от 50 до 1000Å, линейная скорость резания - от 1 до 12 мм/сек.

Изготовление стеклянных ножей

При изготовлении ножей из зеркального стекла толщиной 5-8 мм алмазом или стеклорезом вырезать полоску шириной 28-29 мм (рис.31).

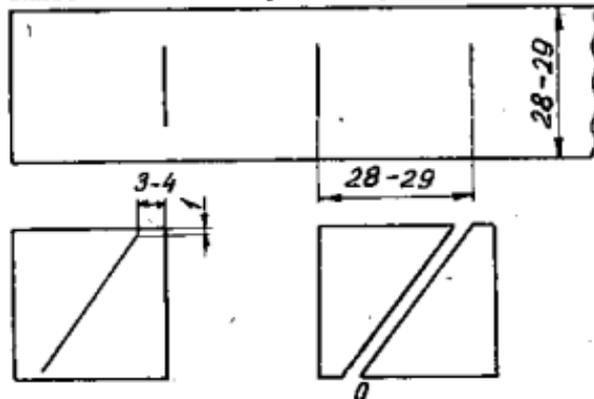


Рис.31. Раскрой стеклянной полоски при изготовлении ножей

На ней с шагом 28-29 мм сделать поперечные надрезы длиной 10-15 мм. Положить стекло надрезом кверху на ровную поверхность, подложить под него против надреза спичку, накрыть стекло мягкой салфеткой (фланелью), и одновременным нажимом на края обеих половин разломать заготовку. На полученном

квадрате сделать диагональный надрез (см. рис. 31). С обеих сторон от линии надреза зажать стекло плоскопараллельными плоскогубцами и усилием на разрыв отделить обе части стекла друг от друга. Для резки выбирается нож, лезвие которого (грань 0, рис. 31) не имеет трещин, сколов и острых выступов. Качество ножа оценивается с помощью бинокулярного микроскопа. Нельзя касаться режущей кромки ножа руками. Ножи хранятся в стеклянной банке со спиртом.

Перед установкой ножа на суппорт ультрамикротоме к нему сзади режущей кромки приклеивают ванночку из клейкой ленты ПВХ, лейкопластыря или мягкого тонколистового металла (алюминия, латуни). Края ванночки герметизируются расплавленным парафином.

Работа на ультрамикротоме УМТ-3

Заземлить прибор. Нажать кнопку "Сеть" и дать возможность ультрамикротому в течение 7-10 мин прогреться. Установить ручку потенциометра "Подвод объекта" на блоке управления в крайнее левое положение. Кнопки "Автомат" и "Подача" должны быть в выключенном положении. Нажать кнопку "Сброс", при этом все сигнальные лампочки, за исключением правой крайней, погаснут.

Установить требуемую толщину срезов ручкой с надписью "Величина подач" по шкале, отградуированной в мкм ($1 \text{ мкм} = 10000 \text{ \AA}$). При включенной кнопке переключателя с надписью "Количество срезов" - 256 ультрамикротом позволяет установить величину подач в пределах 0,005 - 0,05 мкм, а при включенной кнопке 128 - в пределах 0,01 - 0,1 мкм.

Нажать кнопку "Вкл.", затем кнопку "Пуск", при этом загорится лампа дневного света.

Патрон с закрепленным в нем заточенным блоком из полимеризованной эпоксидной смолы, содержащим кусочек животной или растительной ткани, вставить в отверстие гониометрической головки. Наблюдая через бинокулярный микроскоп, сориентировать блок таким образом, чтобы одна из граней пирамидки была параллельна режущей кромке ножа, после чего закрепить патрон и гониометрическую головку специальными зажимами.

Стеклянный нож с ванночкой зажать винтами в держателе ножа и установить таким образом, чтобы передняя грань отклонилась от вертикали на $3-6^\circ$. Угол наклона ножа устанавливается по шкале, нанесенной на держателе ножа. Режущая кромка ножа должна быть на 2-3 мм выше нижнего конца участка резания.

С помощью шприца заполнить ванночку, укрепленную на ноже, 10% -ным водным раствором ацетона или этилового спирта. Мениск жидкости должен быть строго горизонтальным и смачивать лезвие ножа.

Ручками грубого и плавного перемещения ножа создать зазор 0,3 - 0,5 мм между объектом и режущей кромкой ножа и произвести ориентировку лезвия ножа по отношению к пирамидке блока. Наблюдая в бинокулярный микроскоп, выбрать участок режущей кромки ножа, не имеющий дефектов, и установить его против вершины пирамидки блока.

Включить кнопку "Автомат" и вращением ручки плавной подачи суппорта подводить режущую кромку ножа к вершине пирамидки блока до тех пор, пока не срежется первый тонкий срез. Более плавно подводить объект к ножу (в пределах 0 - 9 мкм) можно с помощью ручки "Подвод объекта" на пульте управления, вращая ее по часовой стрелке.

С помощью ручки гидравлического регулятора, расположенной снизу на правой стороне режущего блока, установить необходимую скорость резания. Затем включить кнопку "Подача", при этом на керамические пьезоэлементы коромысла подается электрическое напряжение, ступенчато возрастающее на величину, которая соответствует заданной толщине среза. Одновременно включается счетчик произведенных срезов. Подсчитать произведенное количество срезов можно, суммируя все светящиеся цифры на табло.

Во время резания нельзя переключать кнопки "Количество срезов", охлаждать или нагревать отдельные части режущего блока. Весь процесс резания наблюдается через бинокулярный микроскоп.

Полученную серию срезов извлечь из ванночки. Одним из распространенных методов извлечения является прикосновение поверхности сетки к серии срезов, плавающих на поверхности раствора в ванночке. Для этого сетку взять за самый край пинцетом с очень острыми ножками и слегка прикоснуться к срезам, в результате чего они оказываются прикрепленными к сетке. После высушивания сетка со срезами готова к электронно-микроскопическому исследованию.

После завершения работы путем нажатия на кнопку "Сеть: обесточить прибор и извлечь вилку из электрической розетки.

Задание 1. Познакомиться с устройством ультрамикротоме.

2. Изготовить стеклянные ножи для резки.

3. Познакомиться с порядком работы на ультрамикротоме.

Техника безопасности. 1. Напряжение, применяемое на ультрамикротоме (1500в), опасно для жизни. Запрещается включать в сеть и работать на ультрамикротоме без заземления.

2. Производство ревизии, чистка или ремонт ультрамикротомы допускаются только при полном отключении от питающей сети с соблюдением правил высоковольтной техники безопасности.

3. При изготовлении стеклянных ножей работать в защитных очках.

Вискозиметрия

Вязкость растворов зависит от температуры, концентрации, размера, формы, жесткости растворенных молекул и ряда других факторов. Вязкость жидкости определяют с помощью вискозиметров, которые по принципу работы подразделяются на капиллярные и ротационные.

Вискозиметрический метод (вискозиметрия), будучи технически доступным и относительно простым в интерпретации результатов, позволяет по величине вязкости растворов делать заключение об изменениях размера, конформации и жесткости молекул.

Устройство и принцип работы вискозиметра типа ВПК - 2

Вискозиметр капиллярный стеклянный типа ВПК - 2 (рис.32) представляет собой U -образную трубку, в колено I которой впаив капилляр 7. Измерение вязкости при помощи капиллярного вискозиметра основано на определении времени истечения через капилляр определенного объема жидкости из измерительного резервуара 4 в нижний резервуар 6. Время истечения замеряется с помощью секундметра. Определение кинематической вязкости производится по формуле

$$V = g \cdot T \cdot \alpha / 980,7, \quad (18)$$

где V - кинематическая вязкость, сантистоксы;
 T - время истечения жидкости, сек.; g - ускорение силы тяжести в месте измерения, см/сек²;

α - постоянная для каждого вискозиметра величина (указывается в паспорте на прибор, зависит от диаметра и длины капилляра).

Подготовка к работе. Перед определением вязкости жидкости вискозиметр вначале необходимо промыть несколько раз органическими растворителями (бензином, затем петролейным эфиром), потом водой и залить на несколько часов хромовой смесью. Затем вискозиметр промь-

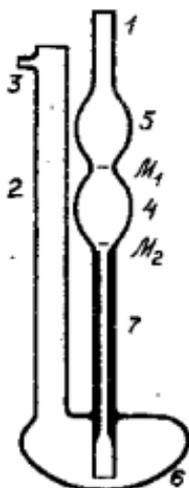


Рис.32. Вискозиметр типа ВПК-2

вайт дистиллированной водой и сушат. Для ускорения сушки вискозиметр можно промыть спиртом-ректификатом или ацетоном.

Порядок работы. Для измерения времени истечения жидкости на отводную трубку 3 надевают резиновый шланг, соединенный с резиновой грушей. Далее, зажав пальцем колено 2 и перевернув вискозиметр, опускают колено 1 в сосуд с испытуемой жидкостью и засасывают ее грушей до отметки М - 2, следя за тем, чтобы в жидкости не образовывалось пузырьков воздуха.

В тот момент, когда уровень жидкости достигает отметки М-2, вискозиметр вынимают из сосуда и быстро перевертывают в нормальное положение. Удаляют с внешней стороны конца колена 1 избыток жидкости и надевают на него резиновую трубку.

Вискозиметр устанавливают в жидкостный термостат так, чтобы расширение было ниже уровня жидкости в термостате. После выдерживания в термостате не менее 15 минут при заданной температуре засасывают жидкость в колено до одной трети высоты расширителя 5. Спускают колено 1 с атмосферой и определяют время опускания мениска жидкости от отметки M_1 до M_2 .

Вязкость вычисляют по формуле (18) для среднего из нескольких измерений времени истечения жидкости.

Задание. 1. Приготовить ряд растворов крахмала с концентрациями 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0% (по 50 - 100 мл).

2. Ознакомиться с работой жидкостного ультратермостата (по инструкции и техническому описанию прибора).

3. С помощью капиллярного вискозиметра типа ВПЖ - 2 для воды и приготовленных растворов крахмала определить кинематическую вязкость при определенной температуре, которую задают с помощью жидкостного ультратермостата (в диапазоне 30 - 50°). Определение вязкости начинают с дистиллированной воды и проводят в порядке возрастания концентрации растворов.

4. На миллиметровой бумаге построить график зависимости величины кинематической вязкости от концентрации раствора.

Литература

Методы практической биохимии (ред. Б. Уильямс, К. Уилсон). М., "Мир", 1978.

Барковский В.Ф., Горелик С.М., Городенцева Т.Б. Физико-химические методы анализа. М., "Высшая школа", 1972.

- Ляликов Ю.С. Физико-химические методы анализа. М., "Химия", 1974.
- Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. М., "Мир", 1980.
- Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров (ред. Г.В. Самсонов). М. -Л., "Наука", 1966.
- Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот (ред. Ю.С. Лазуркин). М., "Наука", 1967.
- Мешкова Н.П. Физико-химические методы исследования в биологии. М., изд. МГУ, 1975.
- Современные методы в биохимии (под ред. В.Н. Ореховича). М., "Медицина", т.1-1964, т.2-1968, т.3-1977.
- Методы современной биохимии (отв. ред. В.Л. Кретович, К.Ф. Шольц). М., "Наука", 1975.
- Кац А.М., Канторович А.С. Руководство по приборам и оборудованию для медико-биологических исследований. Л., "Медицина", 1976.
- Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., "Мир", 1976.
- Аналитические методы белковой химии (сборник статей). М., "Иностранная литература", 1963.
- Перри С., Амос Р., Эрвер П. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. М., "Мир", 1974.
- Новицкая Г.В. Методическое руководство по тонкослойной хроматографии фосфолипидов. М., "Наука", 1972.
- Маурер Г. Диск-электрофорез. М., "Мир", 1971.
- Ларский Э.Г. Методы зонального электрофореза. М., "Медицина", 1971.
- Шишловский А.А. Прикладная физическая оптика. М., Физматгиз, 1961.
- Уилки Б. Электронная микроскопия для начинающих. М., "Мир", 1975.
- Кречкова Г.М., Любина А.Я. и др. Руководство к практическим занятиям по технике лабораторных работ. М., "Медицина", 1977.
- Журнал "Лабораторное дело". М., "Медицина" (выходит ежемесячно с 1955 г.).

О Г Л А В Л Е Н И Е

Предисловие.	3
Правила техники безопасности при работе в биохимической лаборатории.	4
I. Взятие проб и подготовка их к анализу.	5
Взятие проб для биохимических анализов.	5
Гомогенизация тканей.	6
Центрифугирование	8
II. Физико-химические методы анализа.	13
Хроматография.	13
Электрофорез	19
Потенциометрический анализ.	21
Абсорбционный спектральный анализ	25
Нефелометрический и турбидиметрический методы анализа	43
Рефрактометрический метод анализа	46
Поляриметрический метод анализа	51
Люминесцентный метод анализа	53
III. Физические методы анализа.	59
Электронная микроскопия	55
Вискозиметрия.	63
Литература.	64