

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

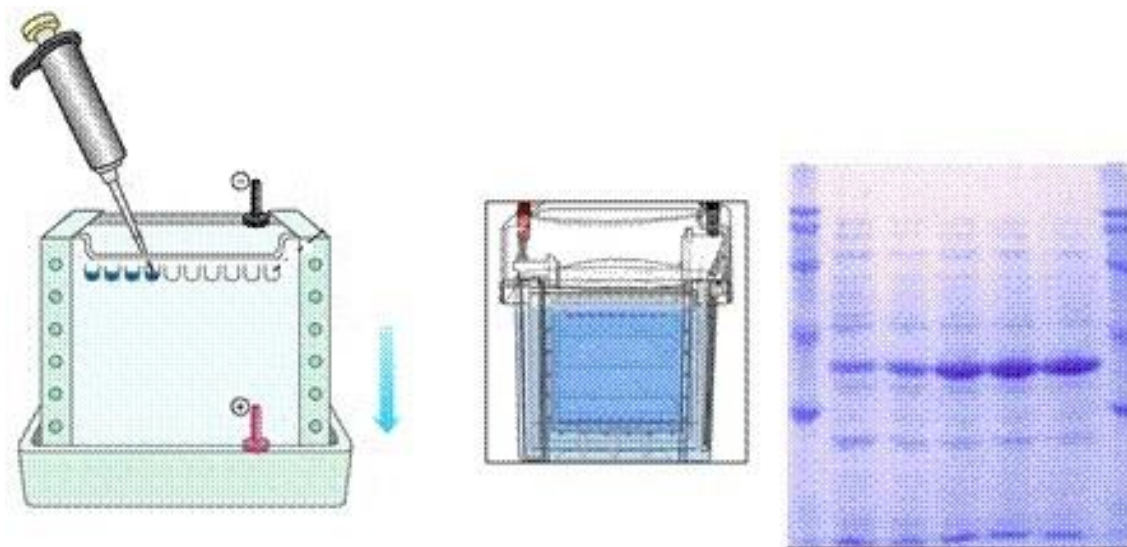
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Методичні рекомендації

для виконання лабораторних робіт для здобувачів вищої освіти
СВО «Бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»



МИКОЛАЇВ

2019

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від 19. 12. 2019 р., протокол № 5.

Укладач:

- Є. В. Баркаръ — канд. с.-г наук, доцент, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

- Т. М. Манушкіна — канд. с.-г наук, доцент, доцент кафедри землеробства, геодезії та землеустрою, Миколаївський національний аграрний університет;
- О. І. Юлевич — канд. техн. наук, доцент, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
Лабораторна робота №1	5
Правила техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії.	
Класифікація методів біотехнологічних досліджень.	
Лабораторна робота №2-3	8
Хроматографічні методи аналізу	
Лабораторна робота №4	13
Рідинна хроматографія	
Лабораторна робота №5-6	16
Технологія тонкошарової хроматографії	
Лабораторна робота №7	18
Фракціонування амінокислот, пептидів та ліпідів бактерій і дріжджів методом тонкошарової хроматографії	
Лабораторна робота №8-9	20
Електрохроматографія	
Лабораторна робота №10	22
Використання в біотехнології різних видів електрофорезу	
Лабораторна робота №11	24
Електрохімічні методи досліджень	
Лабораторна робота №12	26
Спектроскопія	
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	29

ВСТУП

Методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт з дисципліни «Методи біотехнологічних досліджень» підготовлено для здобувачів вищої освіти СВО «Бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія».

Сучасний етап науково-технічного розвитку суспільства висуває нові, набагато вищі вимоги до творчого потенціалу фахівців, що передбачає володіння новими науковими методами, вміння орієнтуватися в потоці наукової інформації, знаходити найраціональніші конструкторські, технологічні й організаційні рішення.

У біотехнологічному виробництві якість і склад сировини, ефективність виробничих процесів, екологічна безпека, відповідність продукції, що випускається, встановленим нормам, дотримання санітарно-гігієнічних вимог мають велике значення. Вирішення усіх цих питань вимагає знання методів дослідження сировини та готових продуктів і передбачає як розробку нових принципів й методів аналізу біотехнологічних систем, так і встановлення будови окремих речовин, їх функцій, взаємозв'язку з іншими компонентами.

Нині відзначається збільшення частки хроматографічних методів і капілярного електрофорезу, що свідчить про першочергову важливість освоєння даних методів для біотехнологічної промисловості. Зростає використання спектральних, атомно-абсорбційних методів та методів капілярного електрофорезу для проведення досліджень якості сировини й готової продукції. Тобто, оволодіння методологією оцінки властивостей сировини й готової продукції для інженерів-біотехнологів має найважливіше значення.

Важливе практичне значення мають методи, основані на дослідженні випромінювання й поглинання електромагнітних хвиль різних областей спектру. До таких методів відносять спектроскопію (наприклад, люмінесцентний та спектральний аналіз), нефелометрію й турбідиметрію та ін. До важливих методів фізико-хімічного аналізу належать електрохімічні, що базуються на вимірюванні електричних властивостей речовини (вольтамперометрія, кондуктометрія, кулонометрія, потенціометрія і т.д.), а також хроматографія (наприклад, газова, рідинна іонообмінна, тонкошарова).

Успішно розвиваються методи, основані на вимірюванні швидкостей реакцій (кінетичні методи аналізу), теплових ефектів реакцій (термометричне титрування, колориметрія), а також – на розподілі іонів у магнітному полі (мас-спектрометрія).

Контроль знань та вмінь здобувачів вищої освіти проводиться шляхом захисту лабораторних та практичних робіт, тестування за програмою самостійної роботи, відпрацювання пропущених занять та складання іспиту.

Лабораторна робота № 1

Тема: Правила техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії. Класифікація методів біотехнологічних досліджень.

Мета: Вивчити правила техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії. Охарактеризувати та вивчити основні методи біотехнологічних досліджень.

Дослідження будь-якого біотехнологічного продукту – складне аналітичне завдання. Через особливості складу й багатокomпонентності продуктів необхідно адаптувати стандартні методи аналізу до особливостей складу й фізико-хімічної структури продукту, тобто в кожному конкретному випадку потрібне проведення тією чи іншою мірою аналітичної дослідницької роботи.

На сьогодні у біотехнологічній промисловості широкого застосування набули такі методи аналізу: газова та рідинна хроматографія, атомно-абсорбційна спектрометрія, фотометрія, люмінесценція, капілярний електрофорез, інфрачервона спектроскопія, електрохімія, класичні методи аналізу (титриметрія, гравіметрія), реологічні методи дослідження.

Завдання 1. Законспекуйте та вивчіть основні правила техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії.

1. До роботи у біотехнологічній лабораторії допускаються особи, які за результатами медичного огляду **не мають протипоказань**, пов'язаних зі станом здоров'я, і **пройшли відповідний інструктаж**.

2. Під час виконання робіт у біотехнологічній лабораторії слід ретельно дотримуватися правил техніки безпеки, які **запобігають впливу** на організм таких **шкідливих факторів**, як: *інфекційні агенти (віруси, бактерії тощо)*, які у разі по-трапляння на шкіру та слизові оболонки можуть спричинити запальні процеси, а у разі проникнення в організм – інфекційні захворювання; *екзогенні ДНК* (деякі з них можуть бути вірулентними); *ультрафіолетове випромінювання*, що може спричинити опіки шкіри та порушення зору; *озон*, що утворюється під дією цього випромінювання, у підвищених концентраціях є токсичним для людини; *їдкі, токсичні, канцерогенні та мутагенні хімічні речовини*; *радіоактивні речовини*, що можуть спричинити зовнішнє, а у разі потрапляння в організм – внутрішнє опромінення; *електричний струм*; *легкозаймисті речовини та природний газ*, що можуть спричинити пожежу або вибух.

3. **Під час проведення робіт** у біотехнологічній лабораторії має бути присутніми не менше двох осіб.

4. **Усі роботи** слід виконувати у **спецодязі** – *халатах* та *змінному взутті*. Волосся необхідно прикрити шапочкою чи косинкою. В разі потреби слід використовувати також *гумові рукавички, гумовані фартухи, маски та окуляри*.

5. **Заборонено** заходити до лабораторії без **спецодязу**.

6. У лабораторних приміщеннях **заборонено** *палити, зберігати харчові продукти та вживати їжу, користуватися косметикою*. Особисті речі слід зберігати за межами лабораторії у спеціально відведених та обладнаних місцях.

7. **На робочому місці** мають знаходитися **лише потрібні для виконання конкретної роботи реактиви і матеріали, посуд, інструменти та обладнання**. Посуд, призначений для зберігання реактивів, повинен мати етикетки з чіткими надписами. Заборонено використовувати реактиви без етикеток або з нерозбірливими надписами.

8. Для відмірювання та набирання рідини необхідно користуватися лише відповідними інструментами (піпетками, самплерами тощо). При роботі з піпетками слід користуватися гумовою грушею або відповідним механічним пристроєм. Категорично **не допускається** *всмоктування будь-якої рідини у піпетку ротом*.

9. При випадковому потраплянні на лабораторний стіл чи підлогу інфекційного агента, їдкої чи токсичної речовини їх слід негайно видалити та обробити забруднену поверхню відповідним чином. Аналогічних заходів необхідно вжити і у разі потрапляння шкідливого агента на шкіру чи слизові оболонки. **За потреби** слід, не зволікаючи, *звернутися за медичною допомогою*.

10. **По закінченні роботи** необхідно **прибрати робоче місце**. На ньому **не можна залишати брудний посуд, інструменти та матеріали**. Якщо матеріали забруднені інфекційними агентами, то їх необхідно знезаразити розчином хлораміну. Слід також *ретельно вимити руки* і у разі необхідності обробити їх дезінфікуючим розчином.

Завдання 2. Охарактеризуйте письмово основні методи біотехнологічних досліджень, зазначте особливості фізико-хімічних методів аналізу.

Завдання 3. Дайте визначення та охарактеризуйте основні вимоги до методів аналізу.

Таблиця 1

Основні вимоги до методів аналізу

Вимога	Визначення та характеристика
1	2
Правильність	
Відтворюваність	
Стандартні зразки	

Продовження табл. 1

1	2
Точність	
Межа виявлення	
Чутливість	
Вибірковість (селективність)	

Питання для захисту лабораторної роботи

1. Основні правила техніки безпеки при роботі у біотехнологічній лабораторії.
2. Методи аналізу, які на сьогодні набули широкого застосування у біотехнологічній промисловості.
3. Класифікація методів аналізу за способом виконання.
4. Особливості фізико-хімічних методів аналізу.
5. Основні вимоги до методів аналізу.

Лабораторна робота № 2-3

Тема: Хроматографічні методи аналізу.

Мета: Вивчити основні хроматографічні методи аналізу в біотехнології.

Хроматографія (від грецького *chromatos* – колір) – фізико-хімічний метод розділення та аналізу сумішей, оснований на розподілі їх компонентів між двома фазами – нерухомою та рухомою.

Класифікація видів хроматографії:

✓ **за агрегатним станом фаз** хроматографія буває: *газова; газорідинна; газо-адсорбційна (твердофазна); рідинна; рідинно-рідинна; рідинно-твердофазна; рідинно-гелева; надкритична флюїдна;*

✓ **за механізмом взаємодії:** *розподільна; іонообмінна; адсорбційна; ексклюзійна; гель-хроматографія; осадкова; адсорбційно-комплексоутворююча хроматографія;*

✓ **окремі види хроматографії:** *високоєфективна рідинна; тонкошарова; газова хроматографія з програмуванням температури; газова хроматографія з програмуванням витрати газу-носія; хроматографія з програмуванням тиску газу-носія; хроматобарографія; хроматермографія; хроматофокусування; лігандообмінна; афінна хроматографія;*

✓ **за способом введення проби:** *проявна або елюентна хроматографія (аналізовану суміш вводять порціями в колонку, заповнену сорбентом; у потоці рухомої фази проба переміщується вздовж колонки; швидкість переміщення окремих компонентів суміші обернено пропорційна величині їх констант розподілення); фронтальна хроматографія (суміш безперервно подається у шар сорбенту і, фактично, відіграє роль рухомої фази; одержуємо залежність концентрації компонентів проби від часу); витискувальна хроматографія (переміщення хроматографічних зон досягається шляхом витискування компонентів суміші, що розділяється, речовиною з більшою здатністю до сорбції, ніж кожен з цих компонентів; кожен з компонентів проби витісняє компоненти, які виявляють меншу взаємодію з нерухомою фазою; утворюються зони розділених речовин, що примикають одна до одної);*

✓ **за метою проведення:** *аналітична (призначена для визначення якісного і кількісного складу досліджуваних сумішей); неаналітична (дослідження фізико-хімічних характеристик речовин з використанням хроматографічної апаратури та на основі параметрів хроматографічних зон); препаративна (застосовується для виділення невеликих кількостей індивідуальних компонентів із суміші в чистому виді у лабораторних умовах); промислова хроматографія (використовується для одержання чистих речовин у значних кількостях);*

✓ **площинна та колоночна хроматографія:** *площинна хроматографія відбувається на плоскій поверхні (до неї відноситься паперова та тонкошарова хроматографія); колоночна хроматографія відбувається в колонках (колони для газової та рідинної хроматографії відрізняються за конструкцією).*

Завдання 1. Дайте визначення основним термінам та поняттям в хроматографії.

Таблиця 2

Основні терміни та поняття в хроматографії

Терміни та поняття	Визначення
1	2
Хроматографія	
Нерухома фаза	
Рухома фаза	
Газова хроматографія	
Газо-рідинна хроматографія	
Газо-твердофазна хроматографія	
Рідинна хроматографія	
Високоєфективна рідинна хроматографія	
Рідинно-рідинна хроматографія	
Рідинно-твердофазна хроматографія	
Адсорбційна хроматографія	
Розподільна хроматографія	
Іонообмінна хроматографія	
Гель-проникаюча хроматографія	
Афінна хроматографія	
Осадова хроматографія	
Колонкова хроматографія	
Площинна хроматографія	

Продовження табл. 2

1	2
Капілярна хроматографія	
Фронтальна хроматографія	
Елюентна хроматографія	
Витискувальна хроматографія	
Аналітична хроматографія	
Препаративна хроматографія	
Промислова хроматографія	
Хроматографія з програмуванням температури	
Елюент	
Газ-носії	
Елюат	
Елюювання	
Хроматограма	
Крива елюювання	
Хроматографування	
Хроматограф	

Завдання 2. Опишіть принцип хроматографічного розділення та поясніть ефективність і селективність хроматографічної колонки.

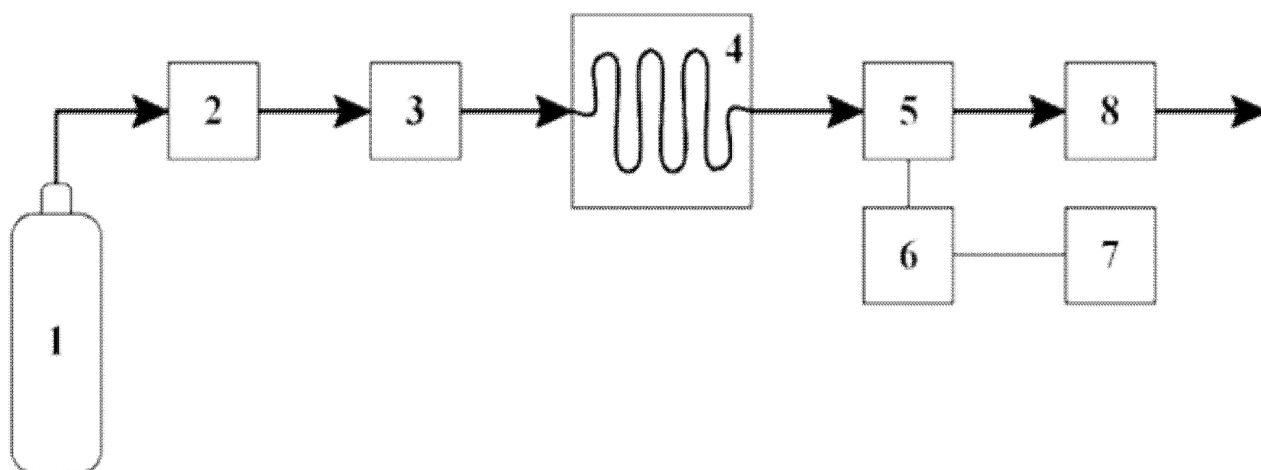
Завдання 3. Заповніть таблицю із класифікацією методів хроматографічного аналізу за природою процесів, що відбуваються при розділенні речовин.

**Класифікація методів хроматографічного аналізу
за природою процесів, що відбуваються при розділенні речовин**

Тип хроматографії	Процес, що відбувається при розділенні речовин
Адсорбційна	
Розподільна	
Іоннообмінна	
Осадова	
Окисно-відновна	
Адсорбційно- комплексоутворювальна	
Гель-проникаюча	

Завдання 4. Дайте письмову характеристику елементам хроматографічної системи та представленню результатів хроматографії.

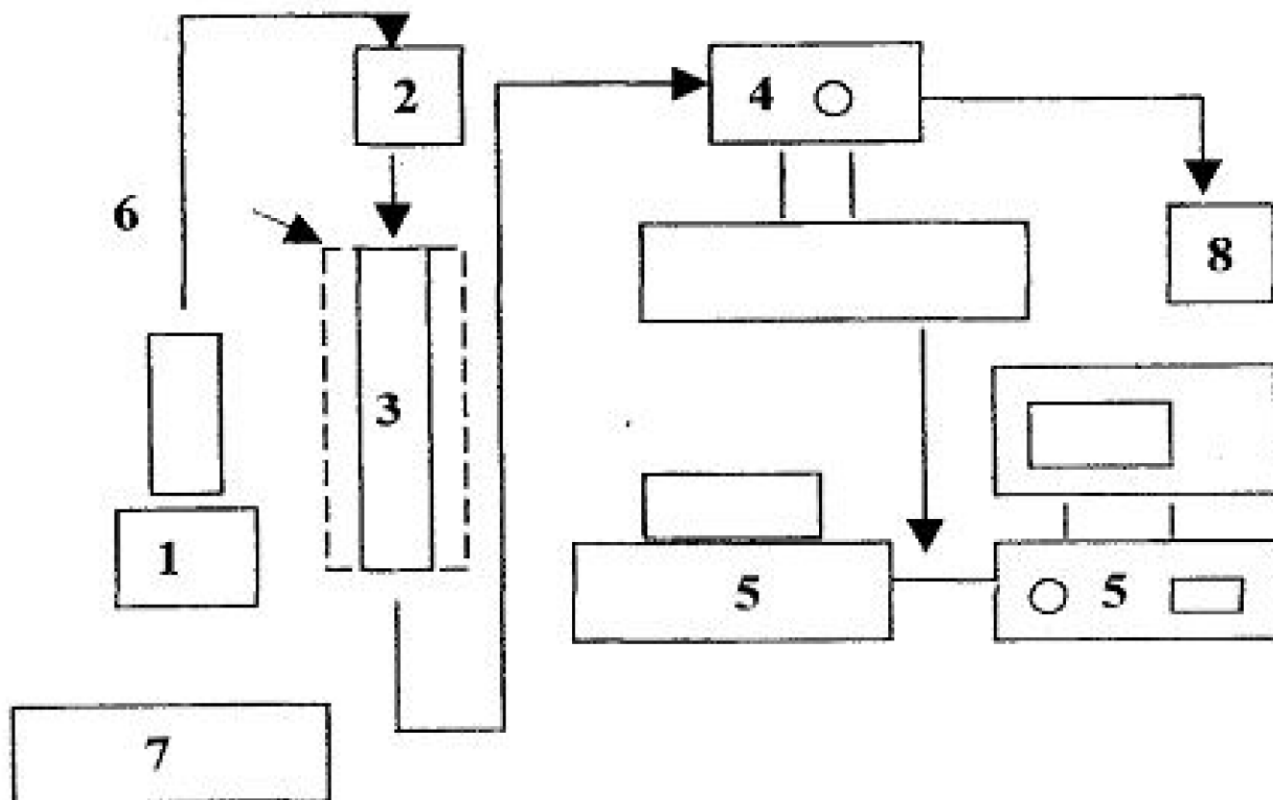
Завдання 5. Зобразіть принципову схему, позначте елементи та опишіть принцип дії газового хроматографа.



1 – джерело газу-носія (рухома фаза); 2 – регулятор витрати газу-носія; 3 – пристрій для введення проби; 4 – хроматографічна колонка в термостаті; 5 – детектор; 6 – електронний підсилювач; 7 – реєструючий пристрій (самописець, комп'ютер); 8 – пристрій для вимірювання витрати газу.

Рис. 1. Принципова схема газового хроматографа

Завдання 6. Зобразіть схему, позначте елементи та опишіть принцип дії рідинного хроматографа.



1 – насос; 2 – вузол для введення проби; 3 – хроматографічна колонка; 4 – детектор; 5 – реєстратор (самописець або комп'ютер); 6 – термостат колонок; 7 – вузол підготовки елюенту з ємностями для елюенту; 8 – злив елюата або колектор фракцій.

Рис. 2. Схема рідинного хроматографа

Питання для захисту лабораторної роботи

1. Історія відкриття та сутність хроматографічного методу.
2. Основні терміни та поняття.
3. Принцип хроматографічного розділення.
4. Ефективність і селективність хроматографічної колонки.
5. Класифікації методів хроматографічного аналізу.
6. Хроматографічна система та представлення результатів хроматографії.
7. Принцип дії газового хроматографа.
8. Принцип дії рідинного хроматографа.

Лабораторна робота № 4

Тема: Рідинна хроматографія.

Мета: Вивчити особливості розділення сумішей в різних видах рідинної хроматографії.

Рідинна хроматографія – це вид хроматографії, у якій *рухомою фазою (елюентом) є рідина. Нерухомою фазою може бути твердий сорбент, твердий носій з нанесеною на його поверхню рідиною або гелем.* Оскільки швидкість дифузії розділюваних речовин у рідині невелика в порівнянні зі швидкістю дифузії в газі, то рідку рухому фазу необхідно пропускати через колонку повільно. Це збільшує тривалість аналізу, дозволяє збільшити діаметр колонки і кількість проби, без втрати ефективності розділення. Принцип рідинної хроматографії полягає у розділенні компонентів суміші, заснований на відмінності урівноваженого розподілу їх між двома фазами, що не змішуються, одна є нерухома, а інша – рухома. При проведенні хроматографії колонка заповнюється твердою фазою – пористим матриксом, розчиненим в елюенті. Резервуар зверху заповнюється рідким елюентом, і на верхню поверхню твердої фази наносять зразок. Суміш компонентів або молекул для розділення, що знаходяться у розчині, пропускають через колонку. У результаті взаємодії з матриксом різні молекули проходять через колонку з різною швидкістю і поступово розділяються. Однорідні компоненти суміші збираються у різних частинах колонки. Після того як вони досягнуть в певній послідовності дна колонки, їх збирають окремими фракціями.

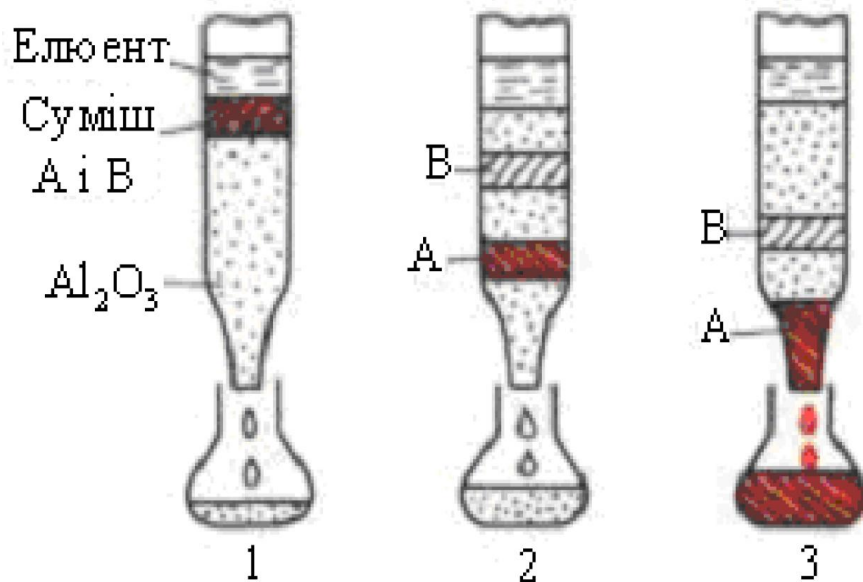
Елюенти для рідинної хроматографії повинні мати низьку в'язкість, забезпечувати необхідний рівень селективності, бути дешевими, нетоксичними, інертними, сумісними з обладнанням для детектування.

У колоночній рідинній хроматографії через колонку, заповнену нерухомою фазою, пропускають порцію суміші речовин у потоці елюенту (під тиском або під дією сили тяжіння), у тонкошаровій рідинній хроматографії елюент переміщається під дією капілярних сил по площині з сорбентом.

У лабораторній практиці для препаративного розділення використовують скляні колонки діаметром 8-15 мм, на яких можна виділити від 100 мг до 10 г індивідуальної речовини. Для збору окремих компонентів (фракцій) використовують спеціальне обладнання. Колонка має внизу кран для регуляції швидкості процесу. У промисловості використовують колонки діаметром до 0,5 м, на яких можливо проводити розділення декількох тонн речовини.

За механізмом утримання розділюваних речовин у нерухомій фазі рідинна хроматографія поділяється на осадкову, адсорбційну, розподільну, іонообмінну, лігандообмінну, ексклюзійну (ситову) та афінну хроматографію. Рідинна хроматографія може бути аналітична і препаративна.

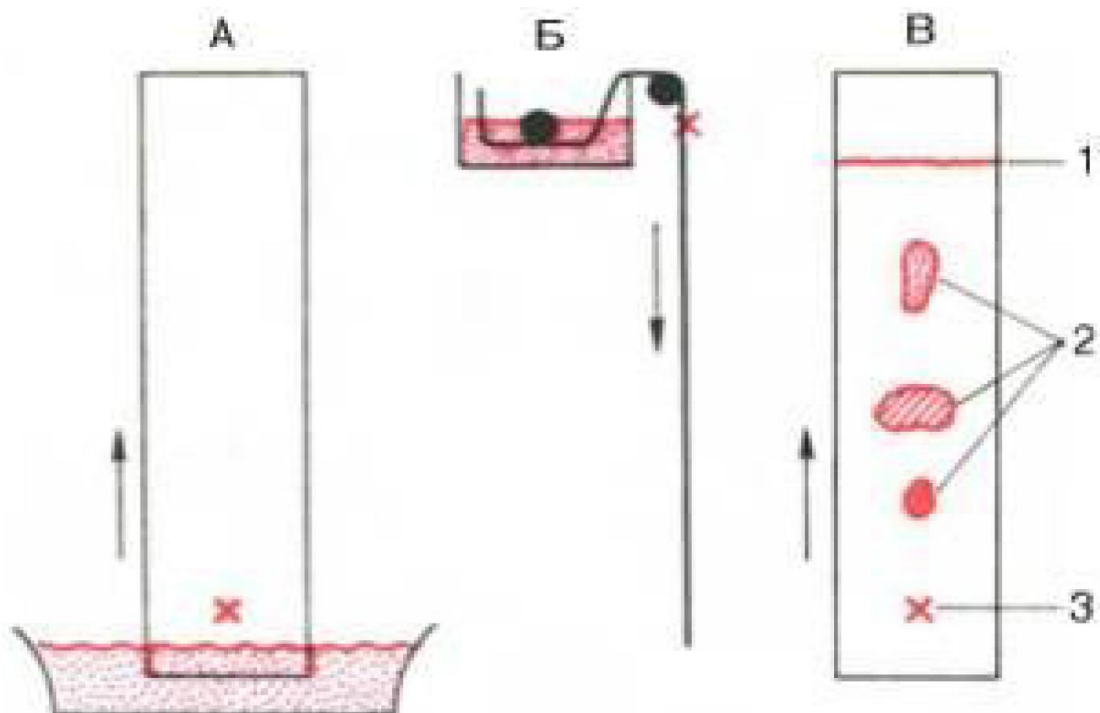
Завдання 1. Зобразіть схему, позначте елементи та опишіть принцип розділення в адсорбційній хроматографії.



1 – нанесення зразка на колонку; 2 – процес розподілу зразка; 3 – кінець розподілу зразка.

Рис. 3. Схеми абсорбційної хроматографії. Розділення двох різних речовин (А і В), що рухаються через колонку з різною швидкістю

Завдання 2. Зобразіть схему, позначте елементи та опишіть принцип розділення в розподільчій хроматографії на папері.



А – висхідна хроматографія; Б – низхідна хроматографія (вид збоку); В – хроматограма з розділеними і зафарбованими речовинами: 1 – фронт розчинника, 2 – розділені речовини, 3 – місце нанесення зразка.

Рис. 4. Схеми хроматографії на папері

Завдання 3. Зобразіть схему, позначте елементи та опишіть принцип гелі-хроматографії.

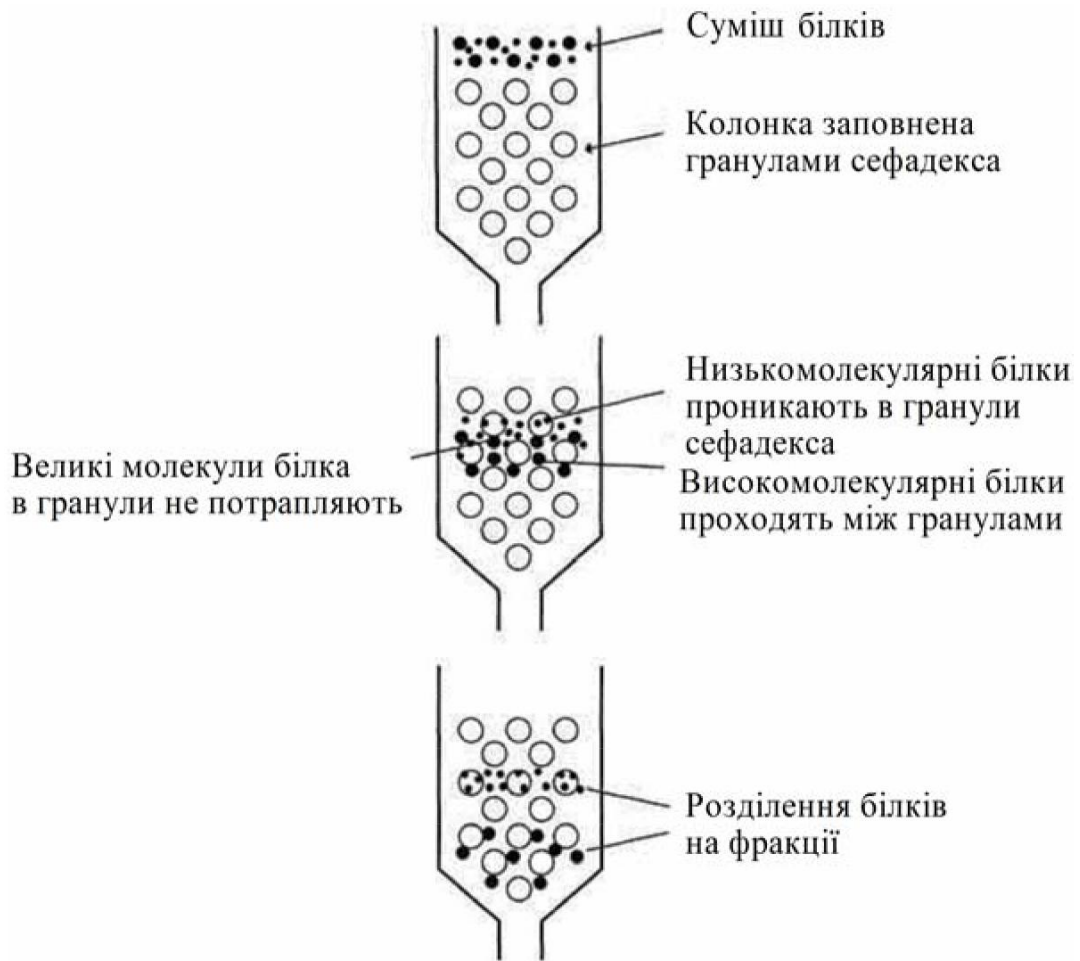


Рис. 5. Принцип гелі-хроматографії

Питання для захисту лабораторної роботи

1. *Сутність методу рідинної хроматографії.*
2. *Рідинна колонкова хроматографія.*
3. *Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ).*
4. *Гелі-хроматографія.*
5. *Площинні варіанти рідинної хроматографії.*

Лабораторна робота № 5-6

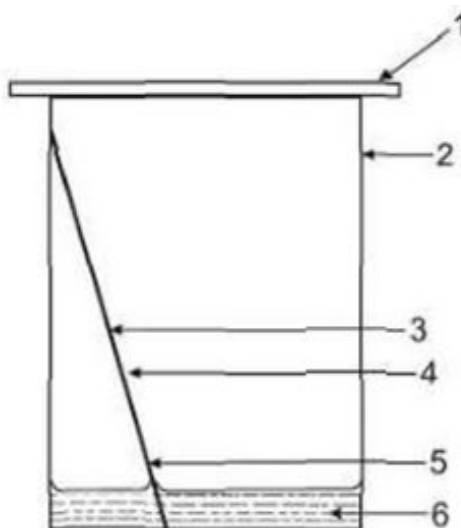
Тема: Технологія тонкошарової хроматографії.

Мета: Вивчити технології приготування пластин для тонкошарової хроматографії (ТШХ) та визначення вмісту вуглеводів методом ТШХ.

Метод хроматографічного аналізу біологічних молекул базується на можливості рідинного розчинника (рідинна фаза) рухатись за рахунок капілярних сил уздовж твердофазного адсорбенту (тверда фаза). При цьому всі біомолекули, які перебувають у розчиннику, також мігрують, але залежно від розмірів молекул та їх електричного заряду швидкість міграції змінюється. З метою сепарації біомолекул методом ТШХ використовують різні типи твердофазних носіїв, найпоширеніші з яких – гіпс, силікагель та оксид алюмінію (Al_2O_3).

Для проведення хроматографічного аналізу вуглеводів методом тонкошарової хроматографії використовують пластини *Sorbfil-UV*, *Silufol*, або власноручно виготовлені пластинки з тонким шаром адсорбенту. Розчини вуглеводів наносять на тестові пластини у відповідних розчинниках. Розчинник мігрує за допомогою капілярних сил, обумовлюючи, таким чином, міграцію вуглеводів. Після закінчення хроматографічного процесу пластинки аналізують з використанням відповідних проявників, які дозволяють виявити фракції вуглеводів та розрахувати відносну молекулярну масу та кількість вуглеводу в розчині, що аналізується.

Завдання 1. Зобразіть схему, позначте елементи та опишіть принцип хроматографічного аналізу речовин у тонкому шарі сорбенту.



1 – кришка; 2 – скляна камера; 3 – пластинка з тонким шаром сорбенту; 4 – сорбент; 5 – місце нанесення проби; 6 – розчинник.

Рис. 6. Камера для хроматографічного аналізу речовин у тонкому шарі сорбенту

Завдання 2. Зазначте матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для приготування пластин для тонкошарової хроматографії.

Завдання 3. Занотуйте та вивчіть порядок виконання роботи при приготуванні силікагель-гіпсових та алюмінієво-гіпсових пластинок для тонкошарової хроматографії.

Завдання 4. Зазначте матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для визначення вмісту вуглеводів методом тонкошарової хроматографії.

Завдання 5. Занотуйте та вивчіть порядок виконання роботи при визначенні вмісту вуглеводів методом тонкошарової хроматографії.

Питання для захисту лабораторної роботи

- 1. Характеристика тонкошарової хроматографії.*
- 2. Матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для приготування пластин для тонкошарової хроматографії.*
- 3. Порядок виконання роботи при приготуванні силікагель-гіпсових та алюмінієво-гіпсових пластинок для тонкошарової хроматографії.*
- 4. Матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для визначення вмісту вуглеводів методом тонкошарової хроматографії.*
- 5. Порядок виконання роботи при визначенні вмісту вуглеводів методом тонкошарової хроматографії.*

Лабораторна робота № 7

Тема: Фракціонування амінокислот, пептидів та ліпідів бактерій і дріжджів методом тонкошарової хроматографії.

Мета: Вивчити технології фракціонування амінокислот, пептидів та ліпідів бактерій і дріжджів методом тонкошарової хроматографії.

Аналіз амінокислотного складу білків та білково-пептидних сумішей проводять тільки після їх попереднього гідролізу кислотою. Гідроліз проводять у запаяних ампулах, з яких відкачують повітря.

Фракціонування амінокислот базується на їх різній розчинності у двох рідинах, що взаємно не змішуються. Однією з рідин є вода, іншою – насичений водою органічний розчинник (наприклад фенол, бутанол та ін.). Водна фаза нерухома, оскільки фіксується на твердофазному адсорбенті – спеціальному хроматографічному папері або тонкошарових пластинах типу «*Sorbfil*». Останній фіксує у нерухомому стані близько 20-22 % води.

Чим краще розчиняється амінокислота у водній фазі і чим менше вона розчиняється в органічній фазі, тим повільніше мігрує амінокислота відносно швидкості міграції фронту органічного розчинника.

Наявність окремих амінокислот на хроматограмі визначають за допомогою кольорового проявника амінокислот – нінгідрину (амінокислоти проявляються у вигляді зон блакитного, фіолетового, жовтого або іншого кольорів залежно від хімічної структури амінокислоти). Ідентифікацію фракціонованих біомолекул проводять за допомогою стандартних розчинів відомих амінокислот.

Завдання 1. Зазначте матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для фракціонування амінокислот та пептидів методом тонкошарової хроматографії.

Завдання 2. Занотуйте та вивчіть порядок виконання роботи при фракціонуванні амінокислот та пептидів методом тонкошарової хроматографії.

Ліпіди – комплексні біомолекули, які є головними компонентами клітинних мембран і значною мірою визначають властивості як самих мембран, так і фізіологічні особливості клітинних штамів бактерій та дріжджів. Ліпіди нерозчинні в воді, але добре розчиняються в органічних розчинниках таких, як хлороформ, ефір, бензол, толуол.

Використання в практичній біотехнології різних штамів, наприклад, дріжджів з різною «спеціалізацією» – спиртових або хлібопекарських, потребує надійного контролю за чистотою посівного матеріалу. Метод тонкошарової хроматографії дозволяє швидко і якісно *ідентифікувати специфічні спектри ліпідів, які відрізняються не лише у різних штамів, а й у одного й того ж штаму, який культивують на різних середовищах.*

Фракціонування ліпідів методом ТШХ базується на міграції рідкої фази

розчинника за рахунок капілярних сил уздовж адсорбенту. Ліпідні компоненти клітинних мембран залежно від будови молекул мігрують із різною швидкістю.

Завдання 3. Зазначте матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для фракціонування ліпідів бактерій і дріжджів методом тонкошарової хроматографії.

Завдання 4. Занотуйте та вивчіть порядок виконання роботи при фракціонуванні ліпідів бактерій і дріжджів методом тонкошарової хроматографії.

Питання для захисту лабораторної роботи

1. Матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для фракціонування амінокислот та пептидів методом тонкошарової хроматографії.

2. Порядок виконання роботи при фракціонуванні амінокислот та пептидів методом тонкошарової хроматографії.

3. Матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для фракціонування ліпідів бактерій і дріжджів методом тонкошарової хроматографії.

4. Порядок виконання роботи при фракціонуванні ліпідів бактерій і дріжджів методом тонкошарової хроматографії.

Лабораторна робота № 8-9

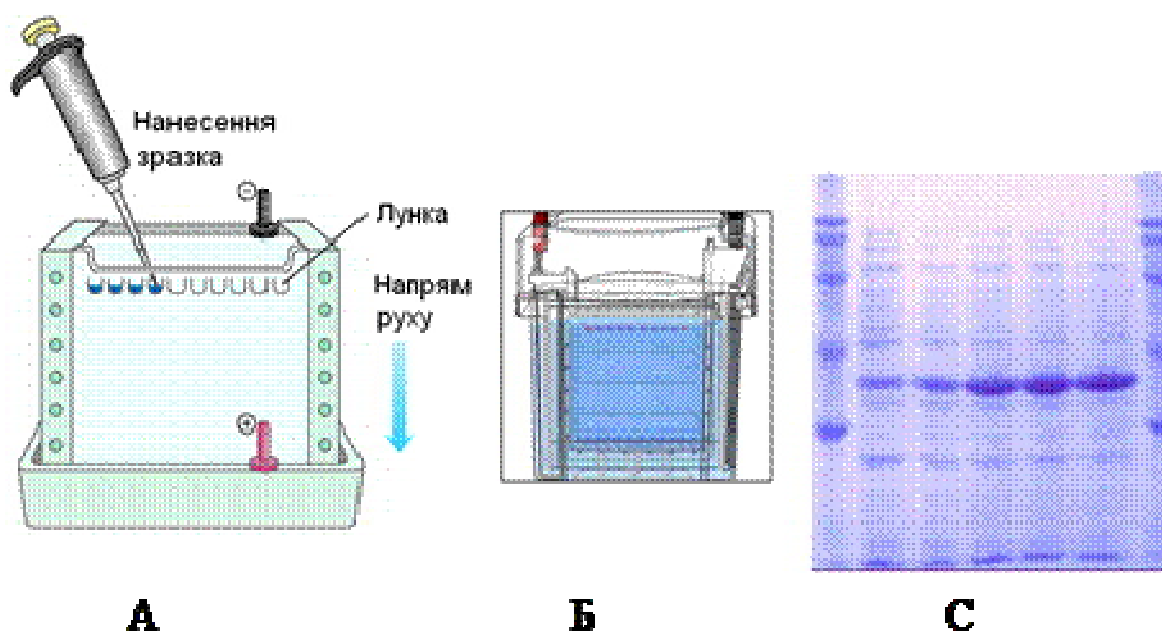
Тема: Електрохроматографія.

Мета: Вивчити технології приготування пластин поліакриламідного гелю та електрофоретичного аналізу біомолекул.

***Метод електрофоретичного аналізу біологічних молекул** базується на можливості біомолекул рухатись у рідинному середовищі за рахунок сил електричного поля вздовж твердофазного носія (гелю). При цьому, всі біомолекули, які перебувають у розчині та мають власний електричний потенціал, мігрують у напрямках, адекватних їхньому заряду. Позитивно заряджені молекули мігрують до катода («мінус»-електрод), а негативно заряджені – до анода («плюс»-електрод). Але залежно від розмірів молекул та їх електричного заряду швидкість міграції біомолекул у гелевому середовищі різна. З метою сепарації біополімерів методом електрофорезу використовують різні типи носіїв, які створюють гель але найбільш поширені – поліакриламід, агароза та гідролізований картопляний крохмаль.*

Метод електрофоретичного аналізу біологічних молекул дозволяє аналізувати склад індивідуальних білків, ензимів, пептидів, присутніх як в складових компонентах клітин про- та еукаріотів, так і в культуральній рідині ферментерів і біореакторів, в яких відбуваються процеси культивування та біоконверсії.

Завдання 1. Зобразить схему, позначте елементи та опишіть принцип розділення білків методом гел-електрофорезу.



А – нанесення зразків у гель; Б – камера для електрофорезу; В – електрофореграма білків.

Рис. 7. Схема розділення білків методом гел-електрофорезу

Завдання 2. Зазначте матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для приготування пластин поліакриламідного гелю для електрофоретичного аналізу білків та поліпептидів.

Завдання 3. Занотуйте та вивчіть технологію приготування пластин поліакриламідного гелю для електрофоретичного аналізу білків та поліпептидів.

Завдання 4. Зазначте матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для електрофоретичного аналізу біомолекул у пластині поліакриламідного гелю.

Завдання 5. Занотуйте та вивчіть порядок роботи при електрофоретичному аналізі біомолекул у пластині поліакриламідного гелю.

Питання для захисту лабораторної роботи

- 1. Характеристика електрохроматографії.*
- 2. Принцип розділення білків методом гель-електрофорезу.*
- 3. Матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для приготування пластин поліакриламідного гелю для електрофоретичного аналізу білків та поліпептидів.*
- 4. Технологія приготування пластин поліакриламідного гелю для електрофоретичного аналізу білків та поліпептидів.*
- 5. Матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для електрофоретичного аналізу біомолекул у пластині поліакриламідного гелю.*
- 6. Порядок роботи при електрофоретичному аналізі біомолекул у пластині поліакриламідного гелю.*

Лабораторна робота № 10

Тема: Використання в біотехнології різних видів електрофорезу.

Мета: Вивчити технології ізоелектрофокусування (ІЕФ) біополімерів у пластині поліакриламідного гелю, пульс-електрофорезу та кометного електрофорезу.

Метод аналізу біологічних молекул ізоелектричним фокусуванням базується на тому, що фракціонування проводять методом електрофорезу в поліакриламідному гелі, в якому попередньо створено стабільний градієнт pH . У даному випадку принципова різниця між методом ІЕФ та традиційним електрофорезом полягає в тому, що розділення відбувається не за розміром молекул чи їх заряду, а за різницею ізоелектричних точок.

Метод ІЕФ дозволяє надійно розділяти молекули, які відрізняються на 0,01 одиниці pH , що значно збільшує аналітичні можливості методу електрофорезу і розширює **сфери його використання** в біотехнології. А саме: *аналіз гетерогенності біополімерів, виокремлення та очистка білків, визначення їх ізоелектричних точок, отримання кривих кислотно-лужного титрування та наступний розрахунок значень pK (константи дисоціації) різних іоногенних груп.*

Використання даного методу має практичне значення для отримання в промислових умовах функціонально активних ензимів, а також для дослідження гетерогенності біополімерів за різних умов біоконверсії сировини.

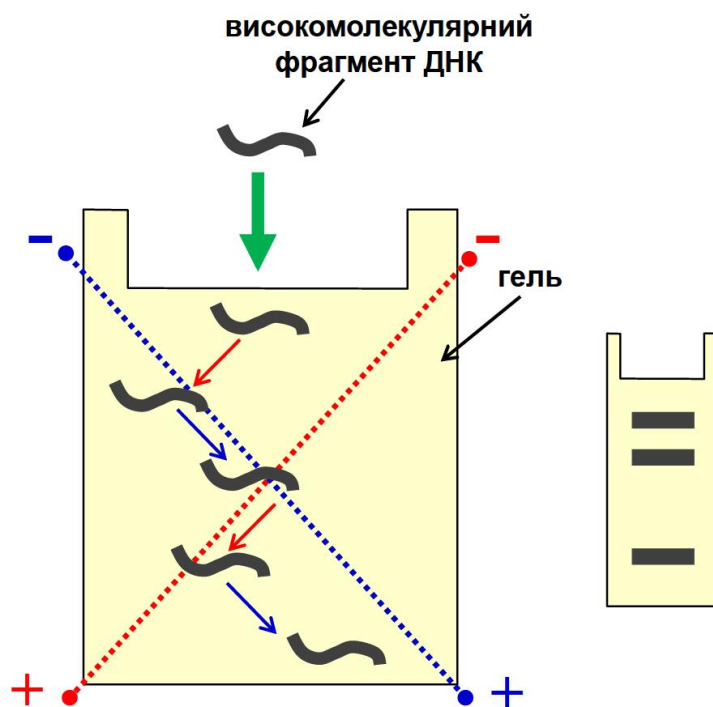
Завдання 1. Зазначте матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для проведення ізоелектрофокусування (ІЕФ) біополімерів у пластині поліакриламідного гелю.

Завдання 2. Занотуйте та вивчіть технологію ізоелектрофокусування (ІЕФ) біополімерів у пластині поліакриламідного гелю.

Для розділення молекул ДНК більш великого розміру (від 10 тис. до 1 млн. пар основ) використовують **електрофорез у пульсуючому полі (пульс-електрофорез)**. Суть методу полягає у тому, що електрофорез проводять не у постійному, а у імпульсному полі – найпростіша схема полягає у вмиканні/вимиканні поля на невеликий проміжок часу. Під час подачі напруги (час імпульсу) молекули ДНК витягуються уздовж поля, а між імпульсами вони релаксують (фактично, із витягнутих лінійних полінуклеотидів починає утворюватися неупорядкований клубок). В залежності від довжини молекули вони встигають релаксувати у різній мірі, що зумовлює різницю у їх рухливості.

Особливим варіантом електрофорезу є **електрофорез ДНК ізольованих клітин (кометний електрофорез)**. У цьому методі електрофорезу піддають не фрагменти ДНК або окремі хромосоми, а тотальну ДНК еукаріотичних інтерфазних ядер.

Завдання 3. Зобразіть схему, позначте елементи та опишіть принцип розділення фрагментів ДНК за допомогою пульс-електрофорезу.



Праворуч – схема окремих зон гелю, що містять розділені фрагменти.

Рис. 8. Розділення фрагментів ДНК за допомогою пульс-електрофорезу із зміною кута подачі поля

Завдання 4. Занотуйте та вивчіть особливості використання електрофорезу ДНК ізольованих клітин (кометного електрофорезу).

Питання для захисту лабораторної роботи

1. *Матеріали, реактиви та обладнання, які необхідні для проведення ізоелектрофокусування (ІЕФ) біополімерів у пластині поліакриламідного гелю.*
2. *Технологія ізоелектрофокусування (ІЕФ) біополімерів у пластині поліакриламідного гелю.*
3. *Принцип розділення фрагментів ДНК за допомогою пульс-електрофорезу.*
4. *Особливості використання електрофорезу ДНК ізольованих клітин (кометного електрофорезу).*

Лабораторна робота № 11

Тема: Електрохімічні методи досліджень.

Мета: Вивчити основні електрохімічні методи досліджень в біотехнології.

Електрохімічні методи аналізу засновані на використанні електрохімічних властивостей аналізованих речовин. До них відносяться: **електрогравіметрія, вольтамперометрія, кулонометрія, потенціометрія, кондуктометрія та полярографія.**

Електрохімічні методи аналізу засновані на використанні електрохімічних процесів, що відбуваються всередині *електролітичної комірки* (являє собою електрохімічну систему, що складається з електродів, поміщених у розчини електролітів) і, *залежно від процесів*, що відбуваються в ній, може бути або *електрохімічною ванною або гальванічним елементом.*

Електрохімічною ванною називається система, у якій за рахунок прикладеного ззовні електричного струму відбуваються хімічні перетворення речовин на електродах. В електрохімічній ванні проводиться процес електролізу. Отже, *електролізом* називаються хімічні перетворення речовин під дією електричного струму.

Гальванічним елементом називається система, у якій за рахунок хімічних перетворень речовин на електродах електролітичної комірки у зовнішньому ланцюзі виникає електричний струм.

Електричні параметри електролітичної комірки (сила струму, напруга, опір і т.п.) можуть слугувати аналітичними сигналами при проведенні аналізів, якщо ці сигнали вимірюються з достатньою точністю. Тому електрохімічні методи аналізу засновані на використанні залежності електричних параметрів комірки від концентрації, природи і структури речовини, що бере участь в електродній реакції або в електрохімічному процесі перенесення електричних зарядів між електродами.

Завдання . Дайте визначення та охарактеризуйте основні електрохімічні методи досліджень.

Таблиця 4

Основні вимоги до методів аналізу

Електрохімічні методи досліджень	Визначення та характеристика
1	2
Електрогравіметрія	
Вольтамперометрія	

Продовження табл. 4

Кулонометрія		
Потенціометрія		
Кондуктометрія		
Полярографія		

Завдання 2. Занотуйте та вивчіть особливості вольтамперометрії.

Завдання 3. Занотуйте та вивчіть особливості потенціометрії.

Питання для захисту лабораторної роботи

- 1. Електрохімічні методи аналізу.*
- 2. Електрогравіметрія та вольтамперометрія.*
- 3. Кулонометрія та потенціометрія.*
- 4. Кондуктометрія та полярографія.*

Лабораторна робота № 12

Тема: Спектроскопія.

Мета: Вивчити основні спектроскопічні методи досліджень в біотехнології.

Спектральний аналіз – це сукупність методів визначення елементного і молекулярного складу та будови речовин за їх спектрами. За допомогою спектрального аналізу визначають як основні компоненти, що становлять 50-60% речовини аналізованого об'єкту, так і незначні компоненти. Це розповсюджений аналітичний метод, що застосовується у багатьох галузях промисловості.

Спектральний аналіз класифікують за метою аналізу і типами спектрів. В *атомному спектральному аналізі (АСА)* визначають елементний склад зразка за атомними (іонними) спектрами випускання і поглинання. В *молекулярному спектральному аналізі (МСА)* – молекулярний склад речовини за молекулярними спектрами поглинання, випускання, відбиття, люмінесценції і комбінаційного розсіювання світла. Емісійний спектральний аналіз проводять за спектрами випускання збуджених атомів, іонів і молекул. Абсорбційний спектральний аналіз здійснюють за спектрами поглинання аналізованих об'єктів.

Розрізняють два основних *варіанти атомного спектрального аналізу* – *атомно-емісійний (АЕСА)* і *атомно-абсорбційний (ААА)*. Атомно-емісійний спектральний аналіз заснований на залежності інтенсивності спектральної лінії випускання (емісії) певного елемента від його концентрації в аналізованому об'єкті. Атомно-абсорбційний аналіз (ААА) заснований на залежності аналітичного сигналу від концентрації. Абсорбційний спектральний аналіз – вивчення спектрів поглинання досліджуваної речовини. Розрізняють дослідження в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній областях спектра. Абсорбційний спектральний аналіз включає методи: спектрофотометричний та колориметричний.

За допомогою *молекулярного спектрального аналізу (МСА)* здійснюють якісне (ідентифікація) та кількісне визначення індивідуальних речовин або речовини в сумішах.

Молекулярний спектр є однозначною характеристикою молекули, визначається її властивостями в цілому, її структурою та властивостями атомів, що входять до складу молекули. У МСА використовують електронні спектри (спектри поглинання в УФ-й, видимій областях, спектри люмінесценції), коливальні спектри (ІЧ-спектри поглинання і випускання, спектри рентгенівські, спектри ядерного магнітного резонансу (ЯМР), електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) та інші види спектрів.

Люмінесцентний МСА – методи дослідження об'єктів, при яких реєструється або власне світіння досліджуваного об'єкта, або світіння люмінофорів, якими обробляється досліджуваний об'єкт.

Флуоресцентний МСА заснований на порівнянні спектрів світіння

розчину досліджуваної речовини зі світінням еталонних розчинів близької концентрації. Метод має високу чутливість.

Спектрофотометрія – фізико-хімічний метод дослідження властивостей речовин на основі аналізу спектрів поглинання у видимій та ультрафіолетовій області. Даний метод широко використовується у молекулярній біології, генетиці, біохімії, біофізиці та інших біологічних дисциплінах з різною метою: від ультра-точного визначення концентрацій речовин у розчині до аналізу ряду фізико-хімічних властивостей різноманітних органічних речовин та біополімерів, структурних переходів у біополімерах, реєстрації деяких хімічних реакцій.

Молекула або її частина, яка здатна ефективно поглинати світло в діапазоні видимого чи ближнього ультрафіолетового випромінювання, називається *хромофором*. Основними хромофорами білків є пептидні групи, крім того три ароматичні амінокислоти – триптофан, тирозин та фенілаланін. У нуклеїнових кислотах хромофорами є азотисті основи.

Флуоресцентні методи – велика група різноманітних підходів, заснованих на детекції випромінювання світла молекулами після їхнього збудження за рахунок поглинання фотону. Підходи, що передбачають аналіз спектральних характеристик флуоресценції, об'єднують під назвою флуоресцентної спектроскопії. Молекули, які здатні випромінювати світло після поглинання, називають *флуорофорами*, і ця властивість обумовлена структурою молекули.

Завдання 1. Зобразіть загальну схему будови, позначте елементи і опишіть принцип роботи спектрофотометра та занотуйте і вивчіть використання спектрофотометрії в біотехнології.

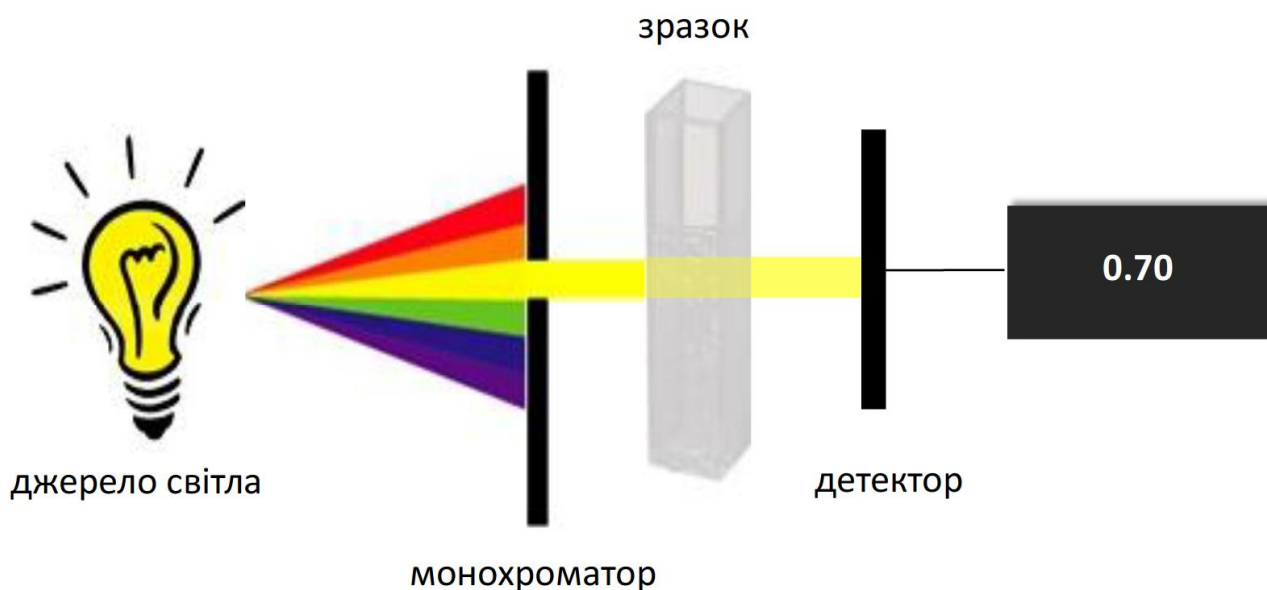
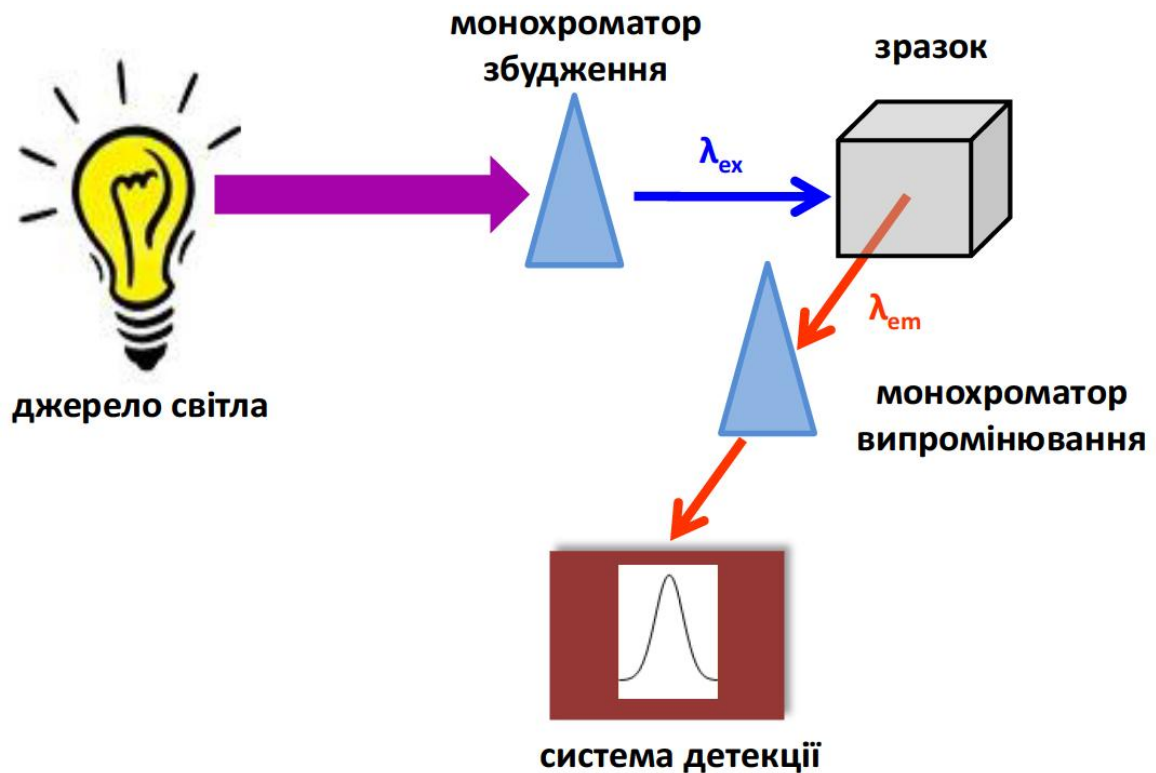


Рис. 9. Загальна схема будови спектрофотометра

Завдання 2. Зобразіть загальну схему будови, позначте елементи і опишіть принцип роботи спектрофлуориметра та занотуйте і вивчіть використання флуоресцентних методів в біотехнології.



λ_{ex} — довжина хвилі збуджуючого світла, λ_{em} — довжина хвилі світла, яке випромінюється.

Рис. 10. Загальна схема будови спектрофлуориметра

Питання для захисту лабораторної роботи

1. Спектральний аналіз, характеристика та класифікація.
2. Спектрофотометрія та її використання в біотехнології.
3. Флуоресцентні методи в біотехнології.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Афанасьєва К. С. Фізичні методи в молекулярній генетиці : навч. посіб. / К. С. Афанасьєва ; Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – К. : Київський університет, 2016. – 127 с.
2. Волошина О. С. Методи досліджень в біотехнології : конспект лекцій для студ. напрям 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / О. С. Волошина, М. М. Антонюк – К. : НУХТ, 2012. – 157 с.
3. Гуськова В. П. Хроматографические методы разделения и анализа : учеб. пособие / В. П. Гуськова, Л. С. Сизова ; Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет). – 2-е изд., испр. и доп. – Кемерово, 2015. – 158 с.
4. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології : лаборат. практик. / О. І. Мартиненко ; наук. ред. Д. М. Говорун. – Київ : Академперіодика, 2010. – 231 с.
5. Мінаєва В. О. Хроматографічний аналіз : підручник для студ. вищ. навч. закл. / В. О. Мінаєва. – Черкаси : Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 284 с.
6. Федорченко С. В. Хроматографічні методи аналізу : навч. посіб. / С. В. Федорченко, С. А Курта. – Івано-Франківськ : Прикарп. нац. ун-т ім. В. Стефаника, 2012. – 146 с.
7. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу біологічних макромолекул : метод. вказівки до викон. лаборатор. робіт з курсу «Методи аналізу в біотехнології» для студ. спец. 8.091607 «Біотехнологія» / уклад. : В. Ю. Черненко, Ж. М. Івахненко. – К. : ІВЦ «Видавництво «Політехніка», 2005. – 48 с.

Навчальне видання

МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Методичні рекомендації

Укладач: **Баркарь Євген Володимирович**

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 2,0.

Тираж 15 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.