

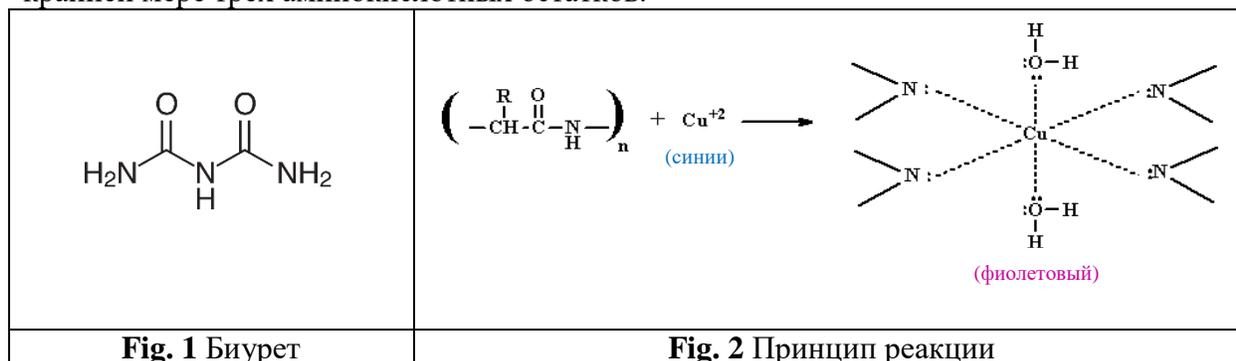
Lucrarea de laborator 3

BIOCHIMIE

Опыт номер 1. Биуретовая реакция.

Принцип реакции:

Название происходит от биурета. Сильно щелочной раствор (NaOH) гидролизует пептиды, до фрагментов, содержащих пептидные связи после чего эти группы взаимодействуют с ионами Cu^{2+} в составе сульфата меди синего цвета, образуя цветные комплексные соединения **красновато-фиолетового** цвета. Реакция требует наличия по крайней мере трех аминокислотных остатков.



Ход работы:

В две пробирки, содержащие по 10 капель раствора I и II содержащего пептиды добавляют по 5 капель раствора NaOH 10% и по 1 капле CuSO_4 1%. Содержание пробирок взбалтывают.

Вывод:

Раствор из пробирки под номером I **окрашивается в _____ цвет/не окрашивается**, и содержит _____, а раствор из пробирки под номером II **окрашивается в _____ цвет / не окрашивается** и содержит _____.

Раствор из пробирки под номером ____ не окрашивается потому что _____

Примером дипептида является: _____.

15p

Опыт номер 2. Реакция Фоля для выявления серосодержащих аминокислот.

Принцип реакции:

Белковые растворы путем нагревания в сильной щелочной среде, содержащей свинец, обретают коричневый или черный цвет. Реакция обусловлена наличием в белке,

аминокислот, содержащих серу, которые разрушаются под действием щелочи с образованием **сульфида натрия**:

$Pb(ONa)_2$ формируется на основе взаимодействия ацетата свинца с щелочью:



Сульфид натрия реагирует с $Pb(ONa)_2$. Наблюдается выпадение серо-черного осадка сульфида свинца(II):



Ход работы:

В две пробирки добавляют по 10 капель раствора: I – яичного белка, II – растительного белка, добавляют 5 капель раствора NaOH 10% и по капле раствора $Pb(CH_3COO)_2$ 0,5%. При длительном нагревании раствор окрашивается в коричневый или черный цвет и наблюдается выпадение осадка сульфида свинца.

Вывод:

Интенсивное окрашивание раствора _____ свидетельствует о том, что, в этом белке **много** / **мало** аминокислот _____ а слабое окрашивание раствора _____ что в этом белке количество этих аминокислот **больше** / **меньше**.

Аминокислотами содержащими серу являются 1. _____ и 2. _____

14р.

Опыт номер 3. Электрофорез ДНК в агарозном геле.

Принцип метода.

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом для анализа нуклеиновых кислот. Мигрирование молекул происходит в присутствии электрического тока. Электрофоретическая подвижность зависит от следующих факторов: концентрации агарозы, конформации молекулы ДНК (одноцепочечная, двухцепочечная или суперспирализованная молекула), молекулярной массы, наличия флуоресцентного соединения в геле, напряжения.

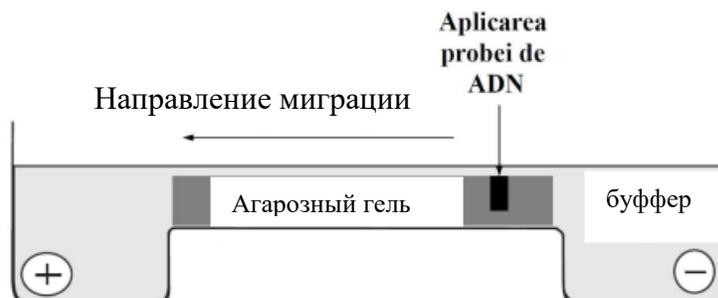


Fig. 3 Методика разделения нуклеиновых кислот методом горизонтального электрофореза

Метод используют для определения чистоты ДНК, проверки продуктов ПЦР, определения длины фрагментов или для анализа результатов после ферментного расщепления ДНК (с использованием рестриктаз).

Полосы содержащие фрагменты ДНК визуализируют при помощи флуоресцирующих соединений (SYBR green или бромистый этидий) при облучении УФ-светом. Для облегчения количественных оценок используют "молекулярные маркеры" содержащие фрагменты ДНК определенной длины.

Задачи:

а) Продукты реакции ПЦР с использованием примеров GSU 1491-1495 были анализированы путем электрофореза в агарозном геле 1,5%. После завершения миграции молекулы ДНК визуализировали с помощью УФ и было получено следующее изображение.

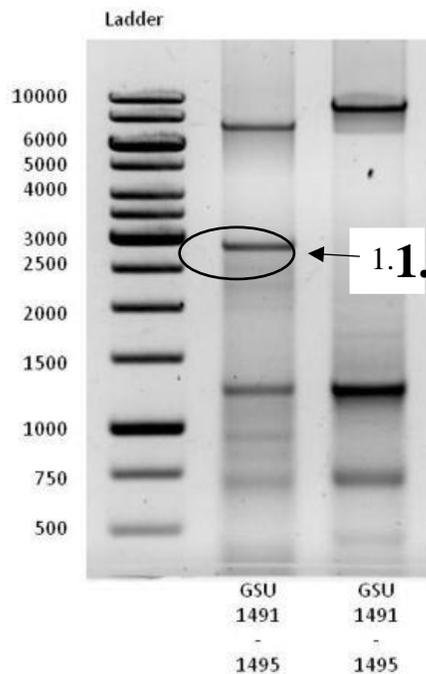


Fig. 4. Изображение агарозного геля

Вывод: Длина фрагмента ДНК под номером 1 _____ пн.

10 р.

б) Были обнаружены 11 генетических вариантов, которые кодируют различные формы белка β -лактоглобулина, их выражение влияет на качество молока: варианты А и В представляют самый большой интерес, потому что они связаны с производительностью производства молока, а также с эффективностью обработки и его качеством. Гомозиготы ВВ дают молоко с высоким содержанием жира и белка, очень ценный для производства творога и сырных продуктов, в то время как гомозиготы АА дают молоко с низким содержанием жира, но в большем количестве.

Для выявления аллелей А и В гена, кодирующего β -лактоглобулина у крупного рогатого скота, было выделено геномное ДНК 4 коров фермы X, продукт ПЦР, 262 пн, был расщеплен с помощью рестриктазы *NotI* распознающую последовательность GG↓CC. Аллель А расщепляется на два фрагмента 153 и 109 пн так как в ее последовательности есть только один сайт для рестриктазы *NotI*. Аллель В расщепляется на три фрагмента 109, 79 и 74 пн благодаря наличию точечной мутации (Т/С) которая генерирует новый сайт для рестрикции. При разделении с помощью стандартного электрофореза в агарозном геле, фрагменты 79 и 74 пн мигрируют вместе и не могут быть разделены визуально.

В результате электрофореза в агарозном геле было получено следующее изображение:

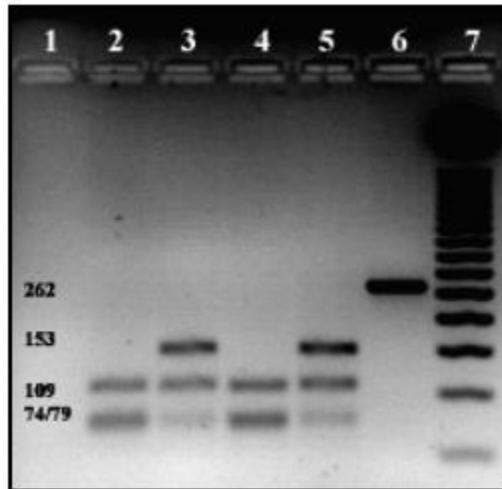


Fig. 5 Электрофорез продуктов рестрикции. 1 – отрицательный контроль; 2-5 – исследуемые образцы; 6 – фрагмент, который не был подвергнут рестрикции; 7 – молекулярный маркер 50 пн (Promega).

На изображении:

генотип AA соответствует образцу под номером _____
 генотип BB соответствует образцу под номером _____
 генотип AB соответствует образцу под номером _____

Какой из генотипов является оптимальным с экономической точки зрения? Почему?

Ответ: _____ потому что _____

Какой совет вы могли бы дать фермеру относительно стратегии размножения скота на ферме X?

