

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского  
Биологический факультет

# **МАЛЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОФИЗИКЕ**

*Издание седьмое*

**06.03.01 – «БИОЛОГИЯ»**

САРАТОВ 2022

УДК 577.3(076.5)  
ББК 28.071 Я 73  
М54

Составители:

М.В. Каневский, Е.С. Тучина, И.К. Миронова

**Малый практикум по биофизике: Учебно-методическое пособие 7-е изд.** / Сост.: М.В. Каневский, Е.С. Тучина, И.К. Миронова – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2022. – 60 с.: ил.

ISBN 5-292-02946-7

В пособии описываются биофизические и физико-химические методы исследования биологических объектов и модельных систем. Практические задания сопровождаются освещением теоретических вопросов, раскрывающих основы каждого метода и особенности их использования в биологических исследованиях.

Для студентов биологического факультета, обучающихся по направлению 06.03.01 – Биология.

Рекомендуют к печати:

Кафедра биохимии и биофизики Саратовского государственного университета  
Научно-методическая комиссия биологического факультета Саратовского государственного университета

Печатается по решению ученого совета биологического факультета  
Саратовского государственного университета

УДК 577.3(076.5)  
ББК 28.071 Я 73

ISBN 5-292-02946-7

© М.В. Каневский, Е.С. Тучина, И.К. Миронова  
составление, 2022

## РАБОТА 1. ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ

На поверхности раздела двух фаз всегда возникает силовое поле. Причиной его возникновения служит нескомпенсированность молекулярных сил в поверхностном слое. Напряженность такого силового поля можно выразить через поверхностное натяжение. Последнее представляет собой избыток свободной энергии, приходящийся на соответствующий  $1 \text{ см}^2$  поверхности раздела фаз.

Наличие поверхностного натяжения становится ясным из сопоставления поведения молекул, расположенных на поверхности раздела, и молекул, находящихся в толще жидкой фазы. Молекулы, находящиеся в толще жидкости, испытывают действие сил взаимного притяжения со стороны соседних молекул. Силы взаимного притяжения, действующие между молекулами, таким образом, уравниваются друг друга. Иначе говоря, равнодействующая этих сил равна нулю.

Совершенно по-другому ведут себя молекулы, находящиеся на поверхности раздела между жидкостью и находящимся с ней в равновесии газом или паром. В этом случае молекулы жидкости испытывают притяжение только со стороны молекул, находящихся под поверхностью раздела. Действием же молекул газообразной фазы ввиду их крайне низкой концентрации можно пренебречь. В итоге равнодействующая межмолекулярных сил на поверхности раздела не равна нулю и оказывается направленной внутрь жидкой фазы. Вот почему для перехода молекул из внутренних слоев жидкости на ее поверхность (т.е. для увеличения поверхности) они должны преодолеть силы взаимного притяжения, действующие и между молекулами поверхностного слоя.

Работа, затрачиваемая на увеличение площади поверхности жидкости, носит название поверхностного натяжения и определяется по формуле

$$A = S \times \sigma, \quad (1.1)$$

где  $S$  – площадь поверхности,  $\text{см}^2$ ;

$\sigma$  – коэффициент поверхностного натяжения.

Коэффициентом поверхностного натяжения называется работа, которую нужно произвести, чтобы увеличить площадь поверхности раздела на единицу площади поверхности. Соответственно коэффициент поверхностного натяжения выражают в  $\text{эрг} \times \text{см}^2$ .

Так как эрг – это дина  $\times$  см, то  $\text{эрг} \times \text{см}^{-2} = \text{дина} \times \text{см}^{-1}$ , т.е. коэффициент поверхностного натяжения можно так же выразить, как силу, которую нужно приложить к периметру поверхности раздела для увеличения длины периметра на единицу длины.

Принято различать статическое и динамическое поверхностные натяжения.

Динамическое поверхностное натяжение ( $\sigma_{\text{дин}}$ ) характеризует только что образованную поверхность раздела, состав которой тождествен всей толще раствора.

Статическое поверхностное натяжение характеризует поверхность раздела при наступившем адсорбционном равновесии.

У абсолютно чистых жидкостей (воды, бензола, абсолютного спирта и т.д.) поверхностный слой и вся толща жидкой фазы вполне равноценны по своему составу. Поверхностное натяжение подобного рода жидкостей с течением времени соответственно не изменяется. Иначе говоря, у таких жидкостей значение  $\sigma_{\text{стат}}$  и  $\sigma_{\text{дин}}$  совпадает. Поверхностно-активным веществом (ПАВ) называют химическое соединение, которое адсорбируется на поверхности раздела фаз, и способно образовывать на данной границе слой повышенной концентрации. У растворов поверхностно активных веществ поверхностный слой имеет свойства, близкие к свойствам всей толщ жидкой фазы только в момент формирования поверхности раздела. Тотчас же после образования поверхности начинается адсорбция поверхностно-активных веществ, заканчивающаяся спустя известный промежуток времени адсорбционным равновесием.

Поскольку поверхностно-активные вещества понижают поверхностное натяжение, постольку в растворах таких веществ  $\sigma_{\text{стат}}$  всегда ниже, чем  $\sigma_{\text{дин}}$ . В некоторых биологических жидкостях существуют особые взаимоотношения между динамическим и статическим поверхностным натяжением. Например, плазма и сыворотка крови обладают свойством восстанавливать исходную величину поверхностного натяжения, уменьшившуюся в результате добавления поверхностно-активных веществ. Такая способность растворов восстанавливать исходную величину поверхностного натяжения называется поверхностной буферностью. Как было показано в экспериментах, поверхностная буферность сыворотки объясняется наличием в ней ионов кальция. Последние, реагируя с поверхностно-активными жирными кислотами, образуют с ними нерастворимые соли, не способные уже изменять величину поверхностного натяжения. Немалую роль в поддержании постоянства поверхностного натяжения плазмы и сыворотки играют содержащиеся в них белки, которые адсорбируют поверхностно активные вещества.

Таким образом, благодаря наличию белков и ионов кальция плазма и сыворотка крови сохраняют относительное постоянство величины поверхностного

натяжения, резко изменяющейся только в случаях тяжелых заболеваний (например, при желтухе вследствие попадания большого количества желчных кислот в кровяное русло).

При изучении поверхностной буферности системы необходимо проследить кинетику перехода динамического поверхностного натяжения в статическое после добавления к раствору поверхностно-активного вещества. Любой раствор, обладающий поверхностной буферностью, должен постепенно восстанавливать исходную величину поверхностного натяжения, понизившегося под влиянием поверхностно-активного вещества. Следовательно, для построения кривой, характеризующей поверхностную буферность раствора, необходимо измерить его поверхностное натяжение до прибавления поверхностно-активного вещества, немедленно после прибавления и через некоторые промежутки времени, вплоть до установления равновесия, т.е. до тех пор, пока значение поверхностного натяжения не перестанет изменяться.

*Методы измерения.* Измерение поверхностного натяжения плазмы, сыворотки, мочи и спинномозговой жидкости имеет существенное значение для диагностики ряда заболеваний. Существует ряд методов определения поверхностного натяжения жидкостей: сталагмометрический метод (метод подсчёта капель), метод капиллярного поднятия жидкостей, метод пульсирующих струй, метод наибольшего давления пузырька (капли), метод отрыва твердого контура и т.д.

В биологии часто применяют метод дю Нуи, основанный на измерении силы, необходимой для отрыва твердого контура (кольца) от поверхностного слоя жидкости. Он отличается простотой и быстротой проведения измерений, не требует больших количеств жидкости и особенно удобен при изучении динамики поверхностного натяжения в растворах, содержащих поверхностно-активные вещества.

Однако метод определения поверхностного натяжения по отрыву кольца обладает известными недостатками. Так, пользуясь этим методом, невозможно учесть влияние смачивания кольца при соприкосновении последнего с растворами белковых и других высокомолекулярных веществ, что влечет за собой появление ошибок.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

**Упражнение 1. Определение коэффициента поверхностного натяжения воды.** При определении поверхностного натяжения воды платиновое кольцо, предварительно очищенное прокаливанием в пламени спиртовки, берут за дужку анатомическим пинцетом и подвешивают на крючок торсионных весов.

Кольцо тщательно взвешивают, после чего весы переводят в положение «закрыто» – арретируют – без возвращения указателя к нулю. Воду в количестве 0,5 – 1 мл наливают на тщательно вымытое и сухое часовое стекло, которое помещают на подъемный столик.

С помощью кремальеры подъемного столика часовое стекло поднимают до тех пор, пока поверхность жидкости не соприкоснется с кольцом (“топить” кольцо в жидкости не следует). После этого освобождают коромысло весов и медленно поворачивают рычаг натяжения, пока кольцо не оторвется от жидкости. Во время этой манипуляции надо все время следить за кольцом и прекратить движение рычага натяжения точно в момент отрыва кольца.

Записав полученные данные, быстро опускают подъемный столик и взвешивают кольцо с прилипшей к нему жидкостью. Истинную силу отрыва кольца определяют по формуле:

$$P = P_1 - p \quad (1.2)$$

где  $P_1$  – сила отрыва, определенная в опыте, мг;

$p$  – вес кольца с прилипшей к нему жидкостью, мг.

Поверхностное натяжение воды определяется по формуле:

$$\sigma = \frac{P}{2\pi r} \quad (1.3)$$

где  $P$  – истинная сила отрыва, дин ;

$r$  – наружный радиус платинового кольца, см.

Для того чтобы выразить  $P$  в динах, следует данные, полученные в опыте и рассчитанные по формуле (1.2), разделить на 1000 для перевода миллиграммов в граммы и умножить на 981 ( $1\text{г} = 981$  дин). Поэтому в работе удобно пользоваться формулой (1.3) в несколько измененном виде:

$$\sigma = \frac{P \times 981}{\pi \times D \times 1000} = \frac{P \times 0,981}{\pi \times D} \quad (1.3a)$$

Радиус платинового кольца заменяют его диаметром во избежание лишних арифметических операций, так как непосредственно в опыте приходится измерять именно диаметр кольца. Ввиду того, что маленькие платиновые кольца не

всегда имеют идеальную правильную форму, следует измерять диаметр 3-4 раза в разных направлениях и брать для расчета среднюю величину.

**Упражнение 2. Определение константы платинового кольца.** Определение поверхностного натяжения различных жидкостей. Для определения поверхностного натяжения различных жидкостей опыт проводят тем же порядком, что и при определении поверхностного натяжения воды, однако расчеты при этом имеют значительные отличия.

Уравнения (1.3 и 1.3а) справедливы только для воды. Зависимость между силой отрыва и величиной поверхностного натяжения для других жидкостей, в особенности для плохо смачивающих кольцо, оказывается более сложной.

Для того чтобы определить поверхностное натяжение исследуемой жидкости, прежде всего вычисляют отношение силы отрыва кольца от данной жидкости к силе отрыва кольца от воды при данной температуре:

$$Q_{\text{найден}} = \frac{P_x}{P_{H_2O}} \quad (1.4)$$

где  $P_x$  – сила отрыва от данной жидкости, мГ;  
 $P_{H_2O}$  – сила отрыва от воды, мГ.

$Q_{\text{истин}}$  равно отношению абсолютного поверхностного натяжения данной жидкости к абсолютному поверхностному натяжению воды, т. е.

$$Q_{\text{истин}} = \frac{\sigma_x}{\sigma_{H_2O}} \quad (1.5)$$

где  $\sigma_{H_2O}$  – коэффициент поверхностного натяжения воды, дин/см;  
 $\sigma_x$  – коэффициент поверхностного натяжения исследуемой жидкости.

$Q_{\text{найден}}$  связано с  $Q_{\text{истин}}$  данной жидкости зависимостью, которая выражается уравнением:

$$Q_{\text{истин}} = Q_{\text{найден}} \times K - K + 1 \quad (1.6)$$

где  $K$  – эмпирическая константа, экспериментально определяемая для каждого кольца.

Вынося  $K$  за скобки, получаем:

$$Q_{истин} = K(Q_{найден} - 1) + 1, \quad (1.7)$$

откуда

$$Q_{истин} - 1 = K(Q_{найден} - 1) \quad (1.8)$$

или

$$K = \frac{Q_{истин} - 1}{Q_{найден} - 1} \quad (1.9)$$

Подставляя в уравнение (1.9) значения  $Q_{истин}$  и  $Q_{найден}$  из (1.5) и (1.6), получим:

$$K = \frac{\frac{\sigma_x}{\sigma_{H_2O}} - 1}{\frac{P_x}{P_{H_2O}} - 1} \quad (1.10)$$

Для определения константы платинового кольца экспериментальным методом применяют дистиллированную воду и этиловый 96- градусный спирт. Коэффициент абсолютного поверхностного натяжения спирта ( $\sigma_x$ ) равен 22,3 дин/см.

Измерение силы отрыва кольца от поверхности жидкости (спирта) ( $P_x$ ) проводят, как описано выше в упражнении 1.

**Упражнение 3. Определение коэффициентов поверхностного натяжения различных жидкостей.** Описанным выше способом определяют поверхностное натяжение ацетона, бензола, глицерина.

Для каждого определения следует брать чистые часовые стекла, а платиновое кольцо прокалывать для очистки. Все жидкости, как и воду, можно исследовать в количествах 0,5 – 1 мл.

Пользуясь уравнениями (1.4) и (1.6) получают значения  $Q_{\text{истин}}$  и  $Q_{\text{найден}}$ . Исходя из уравнения (1.5), можно выразить коэффициент поверхностного натяжения исследуемой жидкости:

$$\sigma_x = \sigma_{H_2O} \times Q_{\text{истин}} \quad (1.11)$$

Результаты измерений, относящиеся к упражнениям 1 и 3, заносятся в табл. 4.1.

Таблица 1.1

Жидкость	Сила отрыва кольца	Вес кольца с пленкой жидкости	Истинная сила отрыва	$Q_{\text{найден}}$	$Q_{\text{истин}}$	$\sigma_x$

**Упражнение 4. Влияние поверхностно-активных веществ на поверхностное натяжение физиологического и рингеровского растворов.** На часовое стекло помещают 0,5 мл рингеровского раствора для и определяют его силу отрыва ( $P$ ) описанным выше способом. Расчёт результатов проводят по формуле (1.2). После этого к раствору на часовом стекле добавляют одну каплю 0,1%-ного раствора олеата натрия и тотчас же после добавления определяют силу отрыва кольца ( $P$ ). Следующие определения отрыва кольца ( $P$ ) производят через 1, 3, 5, 10, 15, 20 мин после начала эксперимента.

Аналогичным образом проводят опыт с физиологическим раствором. График строят по изменению истинной силы отрыва в течение времени.

На оси абсцисс откладывают время в минутах, на оси ординат – значения  $P$  силы отрыва в мг.

*По результатам работы сделать выводы:*

О причинах разницы величины поверхностного натяжения различных жидкостей.

О причинах наличия, отсутствия поверхностной буферности физиологического раствора и раствора Рингера.

### *Контрольные вопросы*

1. Дать определение поверхностному натяжению.
2. Дать определение поверхностной буферности. Какие растворы обладают поверхностной буферностью и почему.
3. Для чего можно использовать метод определения поверхностного натяжения растворов в исследовательской практике?
4. Каков принцип действия ПАВ. Как человек применяет ПАВ в быту, хозяйственной и научной сферах деятельности?

## РАБОТА 2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ НА ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГЕ

В настоящее время для разделения белков используется метод электрофореза. Этот метод основан на том, что молекулы белков в растворе несут электрические заряды. Если через раствор пропускать электрический ток, поместив в него электроды, то молекулы в соответствии со своими зарядами будут двигаться к электродам. Под действием электрического тока молекулы различных белков перемещаются с различной скоростью. Пользуясь этим, можно разделять смесь белков на отдельные фракции. Электрофоретическое разделение является более точным по сравнению с химическим, применявшимся ранее.

Явление электрофореза было известно давно. В 1809 г. профессор Московского университета Рейс наблюдал, что частички глины, диспергированной в воде, движутся под действием электрического тока к аноду. Электрофорез или, как его еще называют, катафорез, есть перенос в электрическом поле коллоидных частиц. Передвижение коллоидных частиц под действием тока свидетельствует о том, что они несут определенные электрические заряды. Современная техника электрофореза сложных смесей белков и других веществ была разработана Тизелиусом в 1937 г. В дальнейшем техника электрофореза и сам электрофоретический аппарат все более совершенствовались.

В настоящее время сохранил свою актуальность метод электрофореза на фильтровальной бумаге. На фильтровальную бумагу, смоченную буферным раствором, наносят каплю раствора белка. Затем через эту полоску бумаги пропускают электрический ток. Белки перемещаются в электрическом поле с различной скоростью в зависимости от массы и заряда и распределяются в течение определенного времени на разном расстоянии между полюсами электрического поля. Таким образом, смесь белков разделяется на фракции. Известно несколько таких электрофоретических фракций белков кровяной плазмы. Они получили название альбуминов и глобулинов, причем различают  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулины.  $\alpha$ -,  $\beta$ -глобулины часто разделяются еще на более мелкие фракции  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\alpha_3$ - и  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -глобулины.

Конструкция прибора. Прибор состоит из электрофоретической камеры (ванны) и блока питания. В электрофоретической камере исследуемое вещество разделяется на фракции в электрическом поле, которое создается между угольными электродами, опущенными в буферный раствор.

Электрофоретическая камера представляет собой пластмассовую ванну, в которой имеются кюветы для буферного раствора, с двух сторон ее – контактные планки, на которых установлены угольные электроды и клеммы для под-

ключения ванны к блоку питания. Для соблюдения полярности на штепсельной вилке и штепсельных клеммах поставлены знаки «+» и «-». В ванне есть призмы для поддерживания электрофореграмм. Ванна закрывается пластмассовой крышкой с прозрачными окнами из органического стекла. Для установки ее в горизонтальном положении служат регулировочные винты. Конструкция электрофоретической камеры предусматривает отключение напряжения от ванны до снятия крышки.

Блок питания состоит из двух узлов: шасси и корпуса. На шасси расположены основные элементы электрической схемы прибора. К шасси крепится передняя панель, на которой находятся элементы контроля и регулирования тока и напряжения; миллиамперметр на 10 мА с надписью «mA×4»; вольтметр на 10 В с надписью «V×50»; сигнальная лампочка контроля включения прибора с надписью «Сеть»; выключатель с надписью «Включено» для включения прибора; ручка с надписью «Регулировка напряжения» для установки требуемой величины выходного напряжения.

На задней стенке блока питания установлены: клеммы со знаками «+» и «-» для подключения электрофоретической камеры; клемма «Земля»; держатель предохранителя и шнур с вилкой для включения приборов в сеть. Прибор обязательно нужно заземлить.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Для подготовки электрофоретической камеры к работе необходимо следующее.

1. Установить кюветы по обоим концам ванны и залить буферным раствором (по 50-60 мл в каждое отделение кюветы) так, чтобы угольные электроды были погружены в раствор.

2. Установить призмы в специальные гнезда ванны.

3. От конца хроматографической полоски на расстоянии 65 мм наметить простым карандашом линию старта. Смочить полоски в буферном растворе. Затем положить бумажные полоски (фореграммы) в ванну таким образом, чтобы концы их были погружены в буферный раствор. Рекомендуется фосфатный буферный раствор с рН 8,6.

4. Установить контактные планки в ванне так, чтобы угольные электроды опустились во внешние отделения кювет.

5. На линию старта микропипеткой нанести препарат белка в количестве 20-100 мкл. После внесения белкового раствора ванну плотно закрыть крышкой для сохранения постоянной влажности воздуха. При закрывании крышки проследить, чтобы отрицательный полюс приходился на линию старта.

6. Прибор включить в сеть. Установить напряжение 200-250 В. Электрофорез продолжать в течение 2 ч. После его окончания фореграммы вынуть из ванны и поставить в сушильный шкаф, где держать при температуре 105 - 110°C в течение 10 мин. При этой температуре белки коагулируют и фиксируются на том месте, которого достигли в процессе электрофореза.

7. Окрасить фореграммы бромфеноловым синим красителем. Окрашивать в течение 5 мин, а затем бумажные полоски промыть в растворе 7% уксусной кислоты. После этого полоски залить закрепителем на 1 – 2 мин и просушить в сушильном шкафу.

8. По окончании работы с камерой слить буфер из ванночек, промыть и очистить электроды, затем собрать снова всю камеру и закрыть ее крышкой.

*По результатам работы сделать выводы:*

О причинах разницы подвижности белков на электрофореграммах.

О количестве белковых фракций в исследуемых объектах.

*Контрольные вопросы*

1. В чем заключается принцип метода электрофореза?

2. Как применяется метод электрофореза для фундаментальных исследований?

3. Электрофорез как физиопроцедура. Каковы аспекты применения электрофореза медицине?

### РАБОТА 3. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ

Ферменты – это биологические катализаторы белковой природы, которые образуются в живых клетках и обладают способностью активировать различные химические соединения.

Ферменты активно применяют в фундаментальных и прикладных медицинских исследованиях: от секвенирования (полной расшифровки) ДНК до обнаружения жизненно важных белков в организме человека.

Ферменты в течение многих лет применяются в различных областях практической деятельности человека в кожевенной, пищевой, текстильной, фармацевтической и других отраслях промышленности, а также в медицине, сельском хозяйстве, химическом синтезе. Эффективность действия ферментов многократно выше по сравнению с химическими катализаторами.

Использование ферментов в медицине происходит по четырем направлениям:

1. энзимодиагностика,
2. энзимотерапия,
3. использование ферментов в медицинских технологиях и промышленности,
4. применение ингибиторов ферментов.

**Энзимодиагностика** – это исследование активности ферментов плазмы крови, мочи, слюны с целью диагностики тех или иных заболеваний. В основе энзимодиагностики лежат два факта:

1. Заболевание органа приводит к понижению синтеза ферментов в клетках. Если некоторые ферменты секретируются клетками наружу, то их активность в биологической жидкости снижается. Примером является снижение активности факторов гемостаза, церулоплазмينا и псевдохолинэстеразы в крови при заболеваниях печени.

2. При воспалении или некрозе ткани происходит разрушение клеток, в результате чего внутриклеточные ферменты (органоспецифичные) оказываются в плазме крови или в моче, их активность здесь повышается.

**Энзимотерапия** – это использование ферментов в качестве лекарственных средств.

Самыми распространенными ферментативными препаратами являются многочисленные комплексы пищеварительных ферментов (Ацидин-пепсин, Фестал, Энзистал, Панкреатин, Мезим форте, Воб-энзим, Креон и т.п.), содержащие пепсин, трипсин, амилазу, лактазу, и используемые для заместительной терапии при нарушениях переваривания веществ в желудочно-кишечном тракте.

**Использование ферментов в медицинских технологиях.** Специфичность ферментов к определенным субстратам широко нашла применение в настоящее время в лабораторной диагностике.

1. Многие лабораторные методы основаны на взаимодействии добавляемого извне фермента с определяемым соединением. В результате возникает специфичный продукт реакции, после определения содержания последнего судят о концентрации искомого вещества (глюкозооксидазный, холестеролоксидазный методы),

2. Иммуноферментные методы, основанные на образовании тройного комплекса фермент-антиген-антитело. Определяемое вещество не является субстратом фермента, но является антигеном. Фермент может присоединять этот антиген вблизи от активного центра. Если в среде есть антиген, то при добавлении антител и формировании тройного комплекса активность фермента изменяется. Активность фермента измеряют любым способом, при этом активность фермента зависит от количества антигена (определяемого вещества).

Весьма широко применяются в настоящее время **ингибиторы ферментов**, чтобы остановить биохимический процесс, и этим предотвратить накопление патологических продуктов процесса или способствовать сохранению необходимых веществ.

Характеристикой активности ферментов является скорость, с которой они катализируют ту или иную реакцию. Она измеряется скоростью превращения субстрата или скоростью накопления продуктов реакции. Измерять нужно начальную скорость превращения, а не количество субстрата, превращенного за определенный отрезок времени.

Комиссия по ферментам Международного биохимического союза дает понятие о стандартной единице активности. Единица активности (Е) – это количество фермента, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата за единицу времени при стандартных условиях (в оптимуме рН, температуры, при избытке субстрата).

Для определения ферментативной активности используют следующие методы:

1. Химический метод – количественное определение субстрата или продуктов с помощью химических реагентов (О-гликозилгидролазы – по образованию восстанавливающих сахаров).

2. Спектрофотометрический метод – измерение скорости ферментативной реакции по изменению поглощения субстрата при характеристической длине волны (лиазы – по образованию двойной связи).

3. Манометрический метод – определение количества газа, выделяющегося в процессе реакции (оксидазы – по поглощению  $O_2$ , декарбоксилазы – по выделению  $CO_2$ ).

4. Поляриметрический метод – фиксируется изменение оптического вращения ( $\beta$ -фруктофуранозидаза).

5. Хроматографический – количественное определение субстрата или продуктов с помощью различных видов хроматографии: бумажной (анализ сахаров), тонкослойной (гликозидов со сложными агликонами), ВЭЖХ (аминокислотный анализ и др.).

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

**Упражнение 1. Колориметрический метод определения активности пероксидазы.** Навеску растительного материала массой 200-500 мг тонко растирают в фарфоровой ступке с ацетатным буфером с рН 5,4 и переносят в мерную колбу на 50 мл и доводят до метки ацетатным буфером. После 10 минут настаивания вытяжку центрифугируют при 4000 об/мин.

В контрольную кювету с рабочей длиной 10 мм приливают 1 мл ферментной вытяжки, 1 мл воды, 1 мл буферного раствора и 1 мл бензидина. По ней выставляют 0 на приборе с использованием красного светофильтра (590 нм).

В опытную кварцевую кювету приливают 1 мл ферментной вытяжки, 1 мл буферного раствора и 1 мл бензидина и 1 мл 0,3%-ной перекиси водорода из пипетки с широким отверстием. С внесением перекиси водорода крышку фотоэлектроколориметра закрывают и включают секундомер. Секундомер останавливают, когда стрелка гальванометра достигает показания  $OD_{590nm}=0,25$ .

По найденной скорости реакции вычисляют активность  $A$  фермента (усл. Ед.):

$$A = \frac{D \times X \times 4}{C \times t}$$

где  $D$  - оптическая плотность, равная 0,25;

$X$  – отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, к массе сырой ткани, мл/г;

4 – степень разведения ферментной вытяжки в кювете;

$C$  – толщина слоя (1 см);

$t$  – время, сек.

**Упражнение 2. Определение активности полифенолоксидазы.** Навеску растительного материала массой 100-200 мг растирают в фарфоровой ступке в присутствии буферного раствора, затем переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят буферным раствором до метки. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин.

Устанавливают нулевое значение по контрольной кювете, в которую вносят 0,5 мл ферментной вытяжки, 2,0 мл фосфатного буфера с рН 7,4 и 0,5 мл воды. Оптическую плотность измеряют при 420 нм.

В опытную кювету спектрофотометра вносят 0,5 мл ферментной вытяжки, 2,0 мл фосфатного буфера с рН 7,4 и 0,5 мл раствора пирокатехина. С первой каплей пирокатехина включают секундомер. Первое измерение проводят через 20 с. Отсчеты снимают несколько раз через 20 с в течение 2 мин.

Активность выражают в относительных единицах на 1 г сырой ткани или на единицу белка за 1 мин.

Расчет производят по формуле:

$$A = \frac{(D_2 - D_1) \times 60 \times V \times V_2}{(t_2 - t_1) \times V_1 \times M}$$

где  $D_1$  - оптическая плотность раствора в начале опыта (первое измерение);

$D_2$  - оптическая плотность раствора в конце опыта;

$t_1$  и  $t_2$  - время в начале и в конце опыта, с;

$M$  - масса навески, г;

$V$  - общий объем ферментной вытяжки, мл;

$V_1$  - объем, взятый для проведения реакции, мл;

$V_2$  - общий объем жидкости в кювете, мл;

60 - коэффициент перевода секунд в минуты.

*По результатам работы сделать выводы:*

Об активности исследуемых ферментов в растительных объектах.

*Контрольные вопросы*

1. Что такое активность фермента?
2. Как проводится измерение активности фермента?
3. Какие Вам известны единицы ферментативной активности?

## РАБОТА 4. НАБУХАНИЕ ТКАНЕЙ

Набуханием называется поглощение жидкости гелем, сопровождающееся увеличением его объема и веса. Различные виды гелей обладают способностью избирательно набухать в определенном для каждого из них растворителе.

Начальная стадия набухания сопряжена с образованием вокруг активных групп сольватной оболочки (активные группы находятся на поверхности коллоидных частиц). Образование такого мономолекулярного слоя растворителя вокруг коллоидной частицы сопровождается заметным выделением тепла. Напротив, последняя стадия набухания связана с проникновением воды в межмицеллярные пространства и в известных случаях – с частичным растворением. Вторая стадия набухания заметным тепловым эффектом не сопровождается.

При набухании гель увеличивается в объеме и производит давление, которое называют давлением набухания; оно наиболее значительно в начальной стадии. Во время этого процесса изменяются и механические свойства гелей: модуль упругости набухающей ткани быстро падает. При исследовании набухания геля необходимо четко разграничить два понятия: степень набухания и скорость набухания.

Степень набухания определяется предельным количеством жидкости, которая поглощается единицей веса или объема коллоида (или ткани). Она зависит от сольватации мицелл, от эластичности геля, его прочности и способности к последующему растворению, а также от температуры.

Скорость набухания определяется количеством жидкости, поглощенной при набухании за единицу времени. Она зависит прежде всего от внутреннего трения поглощенной гелем жидкости и практически очень мало - от температуры. Исследование кинетики набухания указывает, что этот процесс протекает по закону мономолекулярной реакции.

Протоплазма клеток и тканей хорошо набухает в воде и в водных растворах. При исследовании набухания тканей следует, однако, иметь в виду, что они содержат большое количество воды, а не являются сухими гелями. Поэтому приведенные выше закономерности могут быть перенесены на жидкую протоплазму лишь с большими оговорками. К тому же и природа сил, удерживающих воду в живом объекте, еще мало изучена и до настоящего времени служит предметом широких дискуссий. Общие закономерности процесса набухания, его степень и скорость определяются физико-химическими особенностями структуры самих тканей.

В жизнедеятельности организма набухание биокolloидов играет немаловажную роль и служит одним из факторов, регулирующих водный баланс кле-

ток и тканей. Степень набухания тканей зависит от их функционального состояния, но особенно резко меняется при патологических процессах (ожоге, воспалении, злокачественных образованиях). Значительное влияние на процесс набухания оказывает солевой состав среды, концентрация водородных ионов, коллоидно-осмотическое давление и действие многих других физико-химических факторов.

На скорость и на степень набухания гелей и тканей большое влияние оказывают анионы и катионы солей. Решающее значение принадлежит при этом анионам. В зависимости от способности усиливать набухание анионы можно расположить в нижеследующий ряд:  $\text{CNS}^- > \text{J}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{ацетат} > \text{цитрат} > \text{тарtrat} > \text{SO}_4^{2-}$ . Наибольшее набухание вызывают ионы  $\text{CNS}^-$  и наименьшее – ионы  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Концентрация водородных ионов оказывает на набухание тканей очень большое влияние: подкисление или подщелачивание среды (до определенного предела) вызывает увеличение степени набухания, при дальнейшем увеличении кислотности или щелочности среды степень набухания уменьшается. В частности, при воспалительных процессах увеличение концентрации водородных ионов и повышение осмотического давления (происходящее вследствие распада белков и увеличения общего количества молекул) приводят к повышению степени набухания биокolloидов. Наименьшее набухание биологических тканей наблюдается в изоэлектрической и изоколлоидно-осмотической точках.

Степень набухания гелей и биологических тканей измеряется различными методами, основанными на измерении длины, объема и веса набухающего геля или ткани. Применяется и ряд косвенных методов. В биологических исследованиях наибольшее распространение имеют весовые методы.

Весовой метод изучения динамики набухания весьма неточен и в настоящее время уступает место другим методам – объемному методу с применением проекции на экран, титриметрическому методу и др. Однако весовой метод продолжает сохранять свое значение вследствие большой простоты. В частности, он может быть с успехом применен при сравнительном исследовании способности различных тканей к набуханию или для сравнительной оценки действия различных физико-химических агентов на одну и ту же ткань.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

**Упражнение 1. Исследование набухания различных тканей теплокровных.** Для исследования берут кожу, скелетную (икроножную) мышцу и печень. Перед экспериментом взвешивают крючки, чтобы их вес не вносил искажение в результаты эксперимента. В дальнейшем вес крючка вычитают из веса ткани.

Препарированные кусочки ткани вместе с крючком (массой не более 150 мг) помещают в физиологический раствор NaCl (0,9%). Далее проводят взвешивание кусочков тканей через 5, 10, 20 минут от помещения их в раствор. Перед взвешиванием ткань слегка промокают фильтровальной бумагой, чтобы убрать избыточную влагу. Полученные результаты вносят в таблицу 4.1.

**Упражнение 2. Определение влияния pH раствора на величину набухания мышечной ткани.** Используют фосфатный буфер с pH 4,9 и 9,1. Буферные растворы приливают к физиологическому раствору NaCl из расчета 1 мл буферного раствора на 9 мл физиологического. В качестве контрольных значений используют результаты набухания мышечной ткани в физиологическом растворе из упражнения 1.

Ткани готовят в соответствии с указаниями в упражнении 1.

Опыт проводят с двумя кусочками икроножной мышцы, которые помещают соответственно в физиологический раствор с добавлением буферных растворов. Взвешивание тканей производят через 5, 10, 20 минут от помещения их в раствор. Перед взвешиванием ткань слегка промокают фильтровальной бумагой, чтобы убрать избыточную влагу.

В качестве контрольных значений используют результаты набухания мышечной ткани в физиологическом растворе из упражнения 1.

Полученные результаты вносят в таблицу 4.1.

**Упражнение 3. Изучение влияния ионов кальция на величину набухания скелетной мышцы.** Четыре кусочка икроножной мышцы помещают для набухания в бюксы, которые содержат физиологический раствор с добавлением 10%-ного раствора CaCl<sub>2</sub>. Последний добавляют из расчета:

- 1) 0,2 мл на 5 мл физиологического раствора;
- 2) 0,4 мл на 5 мл физиологического раствора;
- 3) 0,6 мл на 5 мл физиологического раствора.

Опыт проводится описанным выше порядком.

В качестве контрольных значений используют результаты набухания мышечной ткани в физиологическом растворе из упражнения 1.

Полученные результаты вносят в таблицу 4.1.

**Упражнение 4. Исследование набухания тканей в гипо- и гипертонических растворах.** Для работы используют два раствора NaCl: 1) гипотонический – 0,2%-ный, 2) гипертонический – 2,0%-ный.

В качестве контрольных значений используют результаты набухания мышечной ткани и печени в физиологическом растворе из упражнения 1.

Прослеживают набухание скелетной мышцы и печени лягушки в этих растворах. Работу ведут описанным выше способом. Полученные в опыте данные записывают в таблицу 4.1.

Таблица 4.1

Ткань	Вес								
	Исходный		Через 5 минут после начала		Через 10 минут после начала		Через 20 минут после начала		
	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	

Кроме того, результаты каждого упражнения оформляются в виде графиков, на которых по оси абсцисс откладывают время, а на оси ординат – вес ткани в процентах по отношению к исходному весу, который принимается за 100%.

*По результатам работы сделать выводы:*

О разнице величины набухания различных тканей в изотоническом растворе.

О влиянии концентрации соли в растворе на величину набухания скелетной мышцы.

О влиянии pH раствора на величину набухания скелетной мышцы.

О влиянии ионов кальция на величину набухания скелетной мышцы и печени

*Контрольные вопросы*

1. Что понимают под степенью и скоростью набухания.
2. При каких условиях наблюдается наименьшее набухание биологических растворов.
3. Как влияет подкисление и подщелачивание на набухание тканей.
4. Как влияют на набухание тканей двухвалентные ионы.
5. Объяснить, как влияет на набухание изменение концентрации раствора.

## РАБОТА 5. ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Осмотическое давление – это такое давление любого раствора (в том числе и биологической жидкости), которым обладало бы растворенное вещество, если бы, находясь в газообразной фазе при той же температуре, оно занимало тот же объем, который занимает раствор.

Для достаточно разбавленных растворов осмотическое давление при постоянной температуре прямо пропорционально концентрации растворенного вещества и абсолютной температуре:

$$P = C \times R \times T \quad (5.1)$$

где  $P$  – осмотическое давление, атм;

$C$  – его концентрация, моль/л;

$T$  – абсолютная температура, °К;

$R$  – газовая постоянная, равная  $0,82 \text{ л} \times \text{атм.} \times \text{град.} \times \text{моль}^{-1}$ .

Таким образом, из формулы следует, что осмотическое давление разбавленных растворов прямо пропорционально количеству частиц растворенного вещества.

Формула 7.1 приложима к любым достаточно разбавленным растворам, кроме растворов электролитов. В последних вследствие электролитической диссоциации происходит образование большого количества частиц растворенного вещества и соответственно – увеличение осмотического давления по сравнению с тем, какого следовало бы ожидать, исходя из наличной молекулярной концентрации.

Для определения осмотического давления существует ряд косвенных методов, основанных на зависимости между концентрацией раствора и давлением (или упругостью) его насыщенного пара. Под упругостью пара понимают то его давление, при котором пар находится в равновесии с жидкостью.

Наиболее распространенными методами определения осмотического давления являются методы криоскопии и эбуллиоскопии. Первый из них основан на определении понижения точки замерзания раствора чистого растворителя. Во втором исходят из повышения точки кипения раствора по отношению к чистому растворителю. Однако применение метода эбуллиоскопии связано с измерениями при высоких температурах, при которых сохранение биокolloидов невоз-

можно. Поэтому для целей биологического исследования метод эбуллиоскопии не пригоден. Существуют и другие методы, также основанные на понижении упругости пара раствора чистого растворителя.

Измерение величины осмотического давления можно производить и прямым путем при помощи приборов, называемых осмометрами. Принцип работы осмометра основан на измерении гидростатического давления столба жидкости, уравновешивающего осмотическое давление раствора. При этом раствор отделяют от растворителя специальной мембраной, не проницаемой для молекулы растворенного вещества. Определение осмотического давления вещества прямым путем наталкивается на принципиальные трудности, так как в действительности не существует идеальной полупроницаемой мембраны, пропускающей молекулы растворителя, но полностью задерживающей молекулы растворенного вещества. В настоящее время осмометры употребляют только для измерения коллоидно-осмотического давления.

Осмотическое давление водной среды и внутренней среды ряда низших организмов может колебаться в весьма широких пределах. Колебания осмотического давления в жидкостях и тканях низших организмов выражают степень приспособляемости организмов к постоянно меняющимся условиям внешней среды. У ряда высших организмов приспособление к колебаниям осмотического давления внешней среды связано с наличием сложных регуляторных механизмов, обеспечивающих относительное постоянство осмотического давления крови и тканей. Определяющая роль в этой регуляции принадлежит центральной нервной системе. В настоящее время удалось выявить наличие в соединительной ткани человека и животных специализированных нервных окончаний – интерорецепторов, воспринимающих колебания осмотического давления.

Плазмолиз – это отделение пристеночного слоя цитоплазмы от твердой оболочки растительной клетки вследствие утраты ею воды. Данный процесс обратим. Увеличение объема цитоплазмы до исходного уровня называют деплазмолизом.

Для плазмолиза используют гипертонический раствор физиологически безвредного вещества.

Динамика плазмолиза следующая: сначала этим процессом охватываются крайние клетки среза, а затем – остальные, протопласт сжимается и отходит от клеточных стенок.

Причина плазмолиза – диффузия воды через перегородку в сторону раствора с более высокой концентрацией из области раствора с более низкой концентрацией.

В клетках кожицы лука цитоплазма обладает большой вязкостью, поэтому сначала будет наблюдаться вогнутый плазмолиз: цитоплазма отстанет от кле-

точных стенок неравномерно (только в некоторых углах и на некоторых участках), а затем он перейдет в выпуклый плазмолиз. Причем цитоплазма в вытянутых, дифференциальных клетках может распадаться на несколько комочков, часто связанных между собой тяжами цитоплазмы. После слишком длительного (глубокого) плазмолиза деплазмолиз не происходит, т.к. нарушается проницаемость мембран. Для деплазмолиза необходимо заменить гипертонический раствор на гипотонический, или воду.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

**Упражнение 1. Определение осмотического давления методом Барджера-Раста.** Один из контрольных и исследуемый растворы наливают на часовые стекла, а из стекол набирают в капилляр. Делают это следующим образом: капилляр погружают в один из растворов и дают жидкости подняться до середины высоты капилляра; перевернув капилляр, опускают жидкость к другому его концу и, когда между мениском и краем капилляра остается промежуток в несколько миллиметров, погружают этот конец капилляра в другой раствор; последний поднимается по капилляру, и пузырек воздуха оказывается приблизительно в середине капилляра. Для удобства запаивания на обоих концах капилляра можно оставить небольшие участки, не заполненные жидкостью.

Капилляр быстро и тщательно замазывают с обеих сторон менделеевской замазкой, которая должна в течение всего времени наполнения капилляров подогреться на малом пламени газовой горелки или на водяной бане. Для того чтобы замазка плотно пристала к наружным стенкам капилляра, они должны быть совершенно сухими. Поэтому перед запаиванием капилляр необходимо обтирать ватой или фильтровальной бумагой. Следует помнить, что большинство ошибок при работе по методу Барджера и Раста происходит именно из-за плохой запайки капилляров, поэтому к данной части работы нужно отнестись особенно внимательно.

Капилляр кладут на предметное стекло. Стекло с капилляром помещают на предметный столик микроскопа и наводят фокус на один из менисков жидкости или на оба, если пузырек воздуха мал и целиком умещается в поле зрения. Далее наблюдают за движением мениска жидкости в течение нескольких минут. Определив, в каком направлении движется мениск, решают, какой из растворов имеет большую концентрацию.

Результаты наблюдений записывают в таблицу 5.1.

Таблица 5.1

Контрольный раствор, %	Направление движения мениска исследуемого раствора	Исследуемый раствор
0,5	←	-
0,6	←	-
0,7	0	+
0,8	→	-

Растворы в течение всего опыта надо держать в закрытых сосудах и на часовое стекло наливать только непосредственно перед заполнением капилляра во избежание испарения воды и изменения концентрации раствора.

Прежде чем приступить к определению концентрации неизвестного раствора, необходимо хорошо освоиться с методикой, для чего надо сделать ряд проб с растворами известной концентрации и дистиллированной водой. Только убедившись в том, что направление движения мениска во всех пробах соответствует ожидаемому, можно переходить к выполнению лабораторных работ.

Установив концентрацию исследуемого раствора, вычисляют его осмотическое давление по формуле. При этом необходимо предварительно перевести процентную концентрацию раствора в молярную.

Пример расчета. Согласно данным измерений исследуемый раствор имеет осмотическую концентрацию, соответствующую 0,45%-ному раствору NaCl. Температура во время измерений равнялась +37°.

Молярный раствор NaCl содержит 58,5 г этой соли в 1 л воды. Следовательно, 0,45 %-ный раствор NaCl соответствует  $0,45/58,5 = 0,0077$  молярного раствора.

Подставляя вычисленное значение для  $C$  в формулу (5.1) и помня, что каждая молекула NaCl образует два иона, находим

$$P = 2 \times 0,0077 \times 0,82 \times (273,15 + 37) = 3,917 \text{ атм.}$$

**Упражнение 2. Наблюдение за плазмолизом и деплазмолизом в клетках чешуи лука.** Приготовить препарат кожицы чешуи лука. Протереть предметное стекло. Пипеткой на предметное стекло поместить 1-2 капли воды. Снять кожицу с белой чешуи лука и поместить в каплю воды на предметное стекло. Расправить кожицу препаровальной иглой. Накрыть препарат покровным стеклом так, чтобы под ним не осталось пузырьков воздуха. На предметное стекло вплотную к покровному стеклу нанести каплю раствора поваренной соли. С противоположной стороны покровного стекла, также вплотную к нему, поместить полоску фильтрованной бумаги, которой оттягивается вода до тех пор, пока раствор соли, войдя под покровное стекло, полностью не заместит ее. Наблюдать за явлением

плазмолиза в течение 20 минут. Определить время, в течение которого начинает наблюдаться эффект. Провести эксперимент для следующих растворов поваренной соли: 2,5 5,0 10,0% Полученные результаты внести в таблицу 5.2.

Таблица 5.2

Концентрация раствора поваренной соли, %	Время, через которое были зафиксированы первые признаки плазмолиза, мин	Время, через которое были зафиксирован полный деплазмолиз, мин

В тетради зарисовать клетки, в которых прошёл плазмолиз.

Не снимая покровного стекла, оттянуть фильтрованной бумагой плазмолизирующий раствор и заменить его водой. Наблюдать деплазмолиз. Определить время, через которое происходит полный деплазмолиз.

*По результатам работы сделать выводы:*

- О концентрации соли исследуемого раствора.
- О величии осмотического давления исследуемого раствора.
- О зависимости скорости протекания плазмолиза от концентрации раствора соли.
- О зависимости скорости протекания деплазмолиза от концентрации плазмолизирующего раствора.

*Контрольные вопросы*

1. Что такое осмотическое давление? Понятие гипер-, гипо-, и изотонических растворов для теплокровных и холоднокровных животных.
2. Что такое онкотическое давление раствора? Роль онкотического давления в формировании процесса воспаления.
3. Что такое плазмолиз и деплазмолиз?
4. Принципы определения осмотического давления. Криоскопический метод. Эбулиоскопический метод. Метод Барджера-Раства.

## РАБОТА 6. АНТИМИКРОБНАЯ ФОТОТЕРАПИЯ

Антимикробная фототерапия – метод лечения инфекционных воспалительных заболеваний кожных покровов и слизистых оболочек организма человека и животных.

В настоящее время для инактивации патогенов используются: фотодинамическое воздействие, фотокаталитическое воздействие и фототермическое воздействие, которые отличаются типом используемого светочувствительного агента и оптимальным для него источником излучения.

Основным преимуществом антимикробной фототерапии является то, что микроорганизмы не могут противостоять такому типу воздействия из-за множества и разнообразия мишеней в их клетках. С высокой эффективностью методом антимикробной фототерапии повреждаются и уничтожаются не только бактериальные клетки, но и клетки дрожжеподобных грибов, вирусные частицы. Изучение возможностей антимикробной фототерапии стало приоритетным для расширения противовирусных мер в отношении SARS-Covid-19.

Одним из естественных противомикробных факторов является солнечный свет. Сейчас хорошо известно, что основная роль принадлежит УФ-части видимого спектра. УФ-спектр делят на три области: УФ-А (320–380 нм), УФ-В (290–320 нм) и УФ-С (190–290 нм). Поверхности Земли в составе солнечного света достигает УФ с длинами волн 290–380 нм, что соответствует УФ-А. Лишь небольшая часть солнечного света находится в диапазоне УФ-В, но именно эта область является губительной для большей части живых клеток. УФ-С отсутствует в солнечном свете, но чаще всего используется в лабораторных исследованиях для разработки методов дезинфекции.

В течение нескольких десятилетий ученые пытались определить, как соответствующие компоненты солнечного света (УФ-С, УФ-В, УФ-А и видимый свет > 400 нм) влияют на клетки патогенов. Повреждающее действие УФ и синего излучения на микроорганизмы определяется двумя типами механизмов:

- 1) фотоповреждением нуклеиновых кислот;
- 2) образованием активных форм кислорода и свободных радикалов

Принято считать, что УФ-С и УФ-В являются прямыми мутагенами по отношению к ДНК, тогда как УФ-А и видимый свет вызывают образование свободных радикалов, которые опосредованно приводят к гибели клеток.

ДНК имеет максимум поглощения при 260 нм, что соответствует области УФ-С, но спектр поглощения макромолекулы частично расположен в области УФ-В (до 300 нм). Негативное влияние УФ на ДНК связано с образованием димеров циклобутанпиримидина и фотопродуктов пиримидин-пиримидона. УФ

может возбуждать остатки тиюридина, естественным образом присутствующие в бактериальных тРНК, что приводит к фотоперекрестному связыванию тРНК и, в конечном итоге, к остановке роста клетки. Нарушения в структуре нуклеиновых оснований приводят к мутациям, от незначительных до летальных.

Эволюционно в клетках возникли механизмы, обеспечивающие защиту нуклеиновых кислот от фотоповреждений. Чувствительность к УФ зависит от фазы роста клетки: в фазе покоя выше вероятность сохранения жизнеспособности.

Первая линия защиты представлена пигментами - каротиноидами, меланином, скитонеминном и др. Как акцепторы света они обеспечивают безопасное перераспределение квантовой энергии внутри клетки. Еще один действенный механизм предотвращения повреждений - работа осмопротекторов.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

**Упражнение 1. Определение эффективности УФ-излучения по отношению к тест-культурам.** Для оценки влияния УФ излучения нужно сделать следующее:

1. Разлить в стерильных условиях питательный агар в 4 чашки Петри. Дать застыть.
2. Стерильным физиологическим раствором провести смыв тест культуры с питательной среды.
3. Довести оптическую плотность суспензии бактериальных клеток до  $OD_{600nm} = 0,09-0,11$ .
4. Произвести посев полученной суспензии газоном (50-100 мкл суспензии в чашку) с использованием микробиологического шпателя. Шпатель стерилизовать фламбированием перед каждым использованием.
5. Одну чашку оставить контрольной. Другие держать под источником УФ излучения в течение 2,5 5 и 10 минут без крышки. После воздействия чашки закрыть крышками и убрать в термостат. Через 2 суток произвести подсчет КОЕ по формуле:

$$КОЕ = \frac{Y \times A}{V} \quad (6.1)$$

где Y – количество колоний на чашке;

A – разведение культуры, которое было проведено;

V – объем посевной дозы, мл.

**Упражнение 2. Определение эффективности УФ-излучения по отношению к различным микроорганизмам.** Разлить в стерильных условиях питательный агар в чашки Петри. Дать застыть.

1. После застывания агара произвести посев с интересующего объекта (высев из воздуха, отпечаток кожи, отпечаток купюр/монет, отпечаток телефона) на 2 чашках.

2. Одну из двух чашек поместить под источник УФ-излучения на 10 минут без крышки. Затем обе чашки убрать в термостат. Через 2 суток произвести учёт числа видов на двух чашках.

*По результатам работы сделать выводы:*

Об эффективности антимикробного эффекта УФ излучения по отношению к тест культурам.

Об эффективности антимикробного эффекта УФ излучения по отношению к микроорганизмам, высеваемым из различных мест.

*Контрольные вопросы*

1. Каковы основные механизмы воздействия УФ излучения на бактерии?

2. Каковы основные диапазоны УФ излучения?

3. В чём преимущества и недостатки антимикробной фототерапии?

## РАБОТА 7. БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ

Многие процессы жизнедеятельности, как животных, так и растительных организмов, сопровождаются возникновением электродвижущих сил в клетках и тканях - появлением биоэлектрических потенциалов. Величина биопотенциалов обычно не превышает 50 – 150 мВ. Кажущееся исключение составляют только биопотенциалы электрических органов рыб, разряды которых достигают нескольких сот вольт. Однако разряд электрического органа представляет собой сумму разрядов множества последовательно соединенных элементарных ячеек, тогда как в каждой отдельной ячейке электродвижущая сила не превышает 100 – 150 мВ.

Биопотенциалы сильно отличаются друг от друга по своей продолжительности. Время, за которое амплитуда биопотенциала нарастает от нуля до максимальной величины, колеблется в разных случаях от долей миллисекунды до многих минут и часов. Следовательно, диапазон частотных характеристик биопотенциалов, выраженных в герцах, простирается приблизительно от 0 до 10 кГц.

Многообразие биоэлектрических потенциалов заставляет стремиться к созданию их четкой классификации. Однако создать такую классификацию очень трудно, и в настоящее время единой общепринятой классификации биопотенциалов еще нет.

Более рациональной представляется сейчас классификация, способная отразить связь биопотенциалов с процессами, протекающими в живых организмах. Такая классификация была предложена советским ученым Д.Л. Рубинштейном. Согласно этой классификации различают три основные группы биоэлектрических потенциалов: 1) метаболические; 2) покоя или повреждения (демаркационные); 3) действия. Каждой из этих групп потенциалов присуща определенная связь с конкретными биологическими процессами.

К группе метаболических потенциалов относятся стационарные, постоянные во времени разности потенциалов, которые устанавливаются между участками тканей, характеризующимися различными уровнями интенсивности обмена веществ. Примерами метаболических потенциалов могут служить разности потенциалов между верхушкой стебля и корнем растений, потенциал фотосинтеза и т.д.

К демаркационным потенциалам относятся потенциалы, возникающие между интактным и поврежденным участками клетки или ткани и разности потенциалов между наружной поверхностью и внутренним содержимым клеток. При этом, как правило, поврежденный участок и внутренняя часть клетки оказыва-

ются электроотрицательными по отношению соответственно к неповрежденному участку и наружной поверхности клеток.

Потенциалы действия – это колебания электрической активности, происходящие при возбуждении живой ткани и переходе ее в состояние активной деятельности. При этом разность потенциалов возникает между возбужденным и невозбужденным участками органа или ткани, причем возбужденный участок оказывается электроотрицательным по отношению к невозбужденному. Возникновение потенциала действия всегда сопровождается распространением волны возбуждения и, по представлению ряда авторов, сам потенциал действия служит причиной распространения возбуждения по специализированным возбудимым образованиям – нервам и мышцам.

К биоэлектрическим потенциалам, возникающим в клетках и тканях, относятся потенциалы ионной природы – собственно биоэлектрические потенциалы и окислительно-восстановительные потенциалы. Собственно биоэлектрические потенциалы обусловлены неравномерным распределением ионов в различных участках клеток и тканей, т.е. асимметрией распределения ионов.

Характер асимметрии, обуславливающей появление разности потенциалов в биологических системах, соответствует в основном трем типам неравномерного распределения ионов в физико-химических системах. К первому из них относятся диффузионные потенциалы, возникающие при наличии жидкостного контакта между растворами, отличающимися друг от друга разной подвижностью ионов. Ко второму типу принадлежат мембранные потенциалы, появление которых обусловлено наличием мембраны, ограничивающей подвижность некоторых ионов. Третий тип представлен фазовыми потенциалами, возникающими на границе двух фаз, например: на границе водного раствора электролита и не смешивающегося с водой растворителя.

Другую группу потенциалов, отводимых от клеток и тканей, составляют так называемые окислительно-восстановительные потенциалы. Их возникновение обусловлено неравномерным распределением электронов между участками тканей, отличающихся друг от друга в основном интенсивностью дыхательных и гликолитических процессов, при которых происходит присоединение и отдача электронов молекулами биосубстрата.

Удобным методом определения электродвижущей силы биологических объектов является компенсационный метод. В этом случае ЭДС биологического объекта уравнивается встречной ЭДС какого-либо физического источника – аккумулятора или батареи.

Компенсационная схема для измерения ЭДС состоит из двух цепей: большой цепи – цепи источника, ЭДС которого известна, и малой цепи – цепи исследуемого источника ЭДС. В малую цепь включают гальванометр (нулевой при-

бор). Пользуясь магазином сопротивлений, к которому оба источника ЭДС подключены одноименными полюсами, находят такое положение, при котором ток в малой цепи отсутствует. Об отсутствии тока судят по нулевому положению стрелки гальванометра.

Потенциометр представляет собой набор двух магазинов сопротивлений для компенсации. При работе с компенсационными схемами во время измерения ЭДС необходимо строго соблюдать полярность включения исследуемого объекта.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

**Упражнение 1. Измерение мембранного потенциала кожуры картофеля или яблока.** На дно кристаллизатора наливают раствор  $KCl$  0,01 н. Кожура на погруженной в раствор части картофеля должна быть неповрежденной. Измеряют разность потенциалов в системе и прослеживают в течение 30-40 мин, изменяется ли потенциал во времени или остается стабильным. Измерения проводят каждые 5 минут.

Далее раствор  $KCl$  0,01 н в кристаллизаторе заменяют на раствор  $KCl$  0,001 н. Для того чтобы не разбирать установку, раствор отсасывают из кристаллизатора пипеткой. Определяют величину разности потенциалов в системе сразу после замены раствора, затем через 5 и через 10 минут.

После этого вновь заменяют раствор  $KCl$  0,001 н на раствор  $KCl$  0,01 н и проверяют, вернулась ли величина потенциала к исходному значению.

Результаты опыта наносят на график, откладывая по оси абсцисс время, а по оси ординат – величину потенциала в милливольтгах, и отмечают стрелками моменты смены растворов.

**Упражнение 2. Измерение мембранной разности потенциала кожицы столетника.** Собирают установку, как и в предыдущем упражнении. Лист столетника срезают у основания и помещают в кристаллизатор с раствором  $KCl$  0,01 н. Конец сифончика прикладывают к поперечному срезу листа и слегка вдавливают в мякоть. Определяют величину потенциала и прослеживают ее изменение в течение 10-15 мин, проводя измерение каждые 5 мин. После этого заменяют раствор в кристаллизаторе на раствор  $KCl$  0,001 н (замену раствора производят тем же порядком, что и в предыдущем упражнении) и прослеживают изменение величины потенциала в течение 10 минут. Затем ножницами или скальпелем делают небольшой надрез на кожице той части листа, которая погружена в раствор. Разрез делают быстро, но осторожно, чтобы не нарушить целостность контактов всей системы. Определяют величину потенциала сразу по-

сле нанесения разреза. Далее измеряют величину потенциала каждые 5 мин в течение 30–40 минут

Результаты опыта наносят на график так же, как и в предыдущем упражнении.

*По результатам работы сделать выводы:*

- О причинах возникновения разности потенциалов в исследуемых объектах.
- О причинах изменения биопотенциалов при смене растворов.
- О природе возникающих биопотенциалов.

*Контрольные вопросы*

1. Чем отличаются электрохимические и биопотенциалы.
2. Какова классификация биопотенциалов
3. В чем принцип работы компенсационного метода измерения потенциалов.

## РАБОТА 8. pH-МЕТИЯ

Молекулы воды обладают слабо выраженной способностью к обратимой ионизации, в процессе которой они распадаются на ионы водорода ( $H^+$ ) и ионы гидроксила ( $OH^-$ ). Первичный процесс электролитической диссоциации можно представить уравнением:



Обратимая ионизация воды имеет очень важное значение для понимания её свойств и роли в функционировании живой клетки. Количественно процесс ионизации воды можно представить следующим уравнением:

$$K_{H_2O} = \frac{[H^+] \times [OH^-]}{[H_2O]} = 1,821 \times 10^{-16}, \quad (8.1)$$

где  $K_{H_2O}$  – константа электролитической диссоциации воды при 25°C.

Так как  $K_{H_2O}$  чрезвычайно мала (из 550 миллионов молекул воды диссоциирует только одна), принято считать концентрацию воды постоянной и равной массе 1 л при 25°C (997,07 г), разделённой на её молекулярную массу, т.е.:

$$[H_2O] = \frac{997,07 \text{ г/л}}{18,01 \text{ г/моль}} = 55,35 \text{ моль/л} \quad (8.2)$$

Объединяя две постоянные величины в одну, исходя из уравнения, получим:

$$K_{H_2O} \times [H_2O] = [H^+] \times [OH^-], \quad (8.3)$$

где вода представлена неионизированными молекулами, концентрация которых практически постоянная.

Если произведение  $K_{H_2O} \times [H_2O]$  обозначить через  $K_w$ , то соотношение можно записать в следующем виде:

$$K_w = [H^+] \times [OH^-] = const = 55,35 \frac{\text{моль}}{\text{л}} \times 1,821 \times 10^{-16} = 1 \times 10^{-14} \quad (8.4)$$

Величину  $K_w$  называют ионным произведением воды. Постоянство этой величины означает, что, как бы не менялись молярные концентрации ионов водорода и ионов гидроксила в водном растворе, их произведение при каждой температуре остаётся неизменным. При 25°C в чистой воде

$$[H^+] = [HO^-] = 10^{-7} \text{ моль/л}, \quad (8.5)$$

следовательно,  $K_w = 10^{-7} \times 10^{-7} = 10^{-14}$ . При повышении температуры  $K_w$  быстро увеличивается.

Добавление к чистой воде кислоты приведёт к увеличению концентрации ионов  $H^+$ , и она будет больше  $10^{-7}$  моль/л (при 25°C), при этом концентрация ионов  $HO^-$  уменьшится во столько же раз и будет меньше  $10^{-7}$  моль/л, то есть в растворе с кислой реакцией:

$$[H^+] > 10^{-7} \text{ моль/л} > [HO^-]. \quad (8.6)$$

При добавлении основания наблюдается обратный процесс – увеличивается концентрация гидроксил-ионов и уменьшается концентрация ионов  $H^+$ :

$$[HO^-] > 10^{-7} \text{ моль/л} > [H^+] \quad (8.7)$$

раствор даёт щелочную реакцию.

В нейтральных растворах  $[H^+] = [HO^-] = 10^{-7}$  моль/л (при 25°C). Следовательно, любой водный раствор независимо от того, какова его реакция (т.е. значение рН), должен содержать как ионы  $H^+$ , так и ионы  $HO^-$ ; произведение их концентраций должно быть постоянной величиной,  $K_w$  равной  $10^{-14}$  моль/л.

Вместо молярной концентрации ионов водорода реакцию среды в водных растворах принято характеризовать отрицательным десятичным логарифмом этой величины, что позволяет пользоваться небольшими безразмерными числами от 1 до 14.

Десятичный логарифм молярной концентрации ионов водорода в водном растворе, взятый с обратным знаком, называют водородным показателем – рН:

$$pH = \lg \frac{1}{[H^+]} = -\lg [H^+] \quad (8.8)$$

В строго нейтральном растворе, в котором концентрация ионов  $H^+$  составляет  $1 \times 10^{-7}$  моль/л, величина рН при 25°C равна 7, т.е:

$$pH = \lg \frac{1}{1 \times 10^{-7}} = -\lg 10^{-7} = 7 \quad (8.9)$$

следовательно, в кислых растворах  $pH < 7$ , а в растворах оснований  $pH > 7$ .

Иногда для промежуточных расчётов, связанных с определением рН среды, используют гидроксильный показатель рОН, представляющий собой десятичный логарифм молярной концентрации ионов гидроксила, взятый с обратным знаком:

$$pOH = -\lg [OH^-] \quad (8.10)$$

При увеличении концентрации сильных кислот или оснований межйонные взаимодействия возрастают, а коэффициент активности ( $\gamma$ ) уменьшается, следовательно для растворов электролитов с повышенной концентрацией ионов при расчётах рН и рОН следует использовать значения *активности* ионов  $H^+$  и  $OH^-$ :

$$pH = -\lg a_{H^+} \quad (8.11)$$

$$pOH = -\lg a_{OH^-} \quad (8.12)$$

где  $a$  – активность ионов.

Кроме водородного и гидроксильного показателей рН и рОН, при расчётах нередко используют и показатель ионного произведения воды  $pK_W$ :

$$pK_W = -\lg K_W \quad (8.13)$$

Суммируя (8.4), (8.8) и (8.9), получим:

$$pK_W = pH + pOH \quad (8.14)$$

Поскольку  $pK_W = 14$  (при  $t = 25$  °C), то  $pH = 14 - pOH$ , а  $pOH = 14 - pH$ .

Если измерения проводят при температуре человеческого тела, то:

$$pH + pOH = \lg 2,325 \cdot 10^{-14} \approx 13,6$$

(так как  $K_w = 2,325 \cdot 10^{-14}$  при  $t = 37$  °C), и кислыми будут считаться растворы, для которых значение  $pH < 6,8$ , а щелочными с  $pH > 6,8$ .

При количественной оценке кислотности среды с помощью водородного показателя  $pH$  принято указывать значение этой величины с точностью не более чем до двух цифр после запятой (например,  $pH$  3,58 или  $pH$  6,84). Биологические жидкости, как известно, являются растворами неорганических солей, кислот, оснований и полиэлектролитов с кислой или щелочной реакцией. Измерение  $pH$  является одной из наиболее важных и часто используемых в биологических и клинических исследованиях процедур. Это обусловлено тем, что от величины  $pH$  зависят очень многие существенные структурные особенности и активность макромолекул, каталитическая функция ферментов и т.п.

Расчет активности ионов  $H^+$  по величине  $pH$ . Измерение с помощью стеклянного  $H^+$ -электрода значения  $pH$  водных растворов позволяет оценить концентрацию ионов водорода лишь косвенно, что обусловлено самим определением  $pH$ ; из уравнения 8.11 следует:

$$[a_{H^+}] = 10^{-pH} \quad (8.15)$$

Расчет активности  $H^+$ -ионов рассмотрим на следующем примере. Пусть при исследовании кислотности биологической жидкости потенциометрическим методом получили величину  $pH = 6,84$ . Согласно (8.11) и (8.15):

$$-\lg(a_{H^+}) = 6,84 \quad 10^{-6,84} \text{ моль/л}$$

Следует помнить, что активность ионов  $H^+$  в растворе (т.е. кислотность и щелочность) так же, как и концентрацию, принято выражать в молях кислоты или основания на 1 л.

**Упражнение 1. Исследование прямолинейности изменения ЭДС  $H^+$ -электрода от величины рН раствора.** В крайних пределах рН щелочных и кислых растворов электродная функция становится нелинейной и измерения рН растворов могут быть менее точными. Величина ошибки растёт в большей мере при увеличении рН и концентрации солей щелочных металлов ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  и др.) в растворе.

1. Подготовить прибор к работе, настроить его по буферным растворам и после этого тщательно промыть электроды несколькими порциями дистиллированной воды.

2. Приготовить по 25-30 мл буферных растворов с рН при 25°C, равными 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10, а также стандарт-титры кислоты и щелочи 1 моль/л (HCl и NaOH).

3. Переключить рН-метр (или иономер) в режим измерения ЭДС с размахом +100 ÷ -1400 мВ (в случае необходимости переключить на диапазон -100 ÷ +1400 мВ).

4. Провести измерения ЭДС электрода путём замены стаканчиков с последовательным увеличением рН буферных растворов. В последнюю очередь провести измерения рН сильной кислоты и сильного основания известной концентрации.

5. Результаты измерения ЭДС, переведенные в мВ, следует занести в таблицу 8.1.

Таблица 8.1.

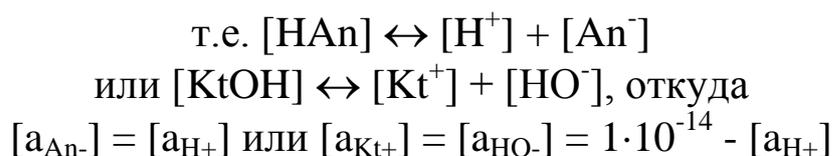
Исследуемые растворы	Значения рН			Среднее значение рН	Значения ЭДС, мВ			Среднее значение ЭДС, мВ
	Измерения				Измерения			
	1	2	3		1	2	3	
Буферные растворы								
HCl 1 М								
NaOH 1 М								

6. По результатам измерений построить градуировочный график зависимости ЭДС цепи с  $H^+$ - электродом от величины рН растворов.

7. После построения графика провести определение ЭДС неизвестного раствора. Используя градуировочный график, определить величину рН раствора. Затем измерить рН при помощи рН метра и определить в процентах величину ошибки.

## **Упражнение 2. Измерение рН водных растворов электролитов и расчёт активности ионов водорода по измеренным величинам рН**

Метод прямой потенциометрии позволяет измерять показатели активностей определяемых ионов. Например, изменение рН позволяет найти величину показателя степени с основанием 10, т.е.  $a_{\text{H}^+} = 10^{\text{pH}}$ . В то же время активную концентрацию иона в растворе (а) можно определить, лишь исходя из уравнения диссоциации кислоты или щелочи по величине  $[a_{\text{H}^+}]$ ,



1. Подготовить прибор и электродную ячейку для измерения рН в соответствии с инструкцией.

2. Получить у преподавателя или лаборанта по 25-30 мл водных растворов для измерения значения их рН. Например, кислый, щелочной растворы, фруктовый сок, молоко, белковый раствор и т.п. Некоторые растворы приготовить самостоятельно.

3. В произвольном порядке провести 3-6 измерений рН каждого из анализируемых растворов.

Очень важным моментом при проведении этой операции является тщательная подготовка электродов к очередному измерению (см. инструкцию). Перед снятием показаний прибора следует помнить, что для установления равновесного электродного потенциала в нейтральной и щелочной областях рН требуется до 10 минут времени.

4. После проведения измерений рН полученных растворов разбавить в 10 и раз биологические жидкости и провести определение рН этих растворов в соответствии с п.3.

5. Полученные результаты занести в таблицу 8.2.

6. Рассчитать активность ионов водорода по уравнению 8.15.

Таблица 8.2

Исследуемый раствор	Величина рН			Среднее значение рН	Активная концентрация $a_{H^+}$ , моль/л
	Измерения				
	1	2	3		
H <sub>2</sub> O					
Сок					
Сок (1:10)					
Молочная сыворотка					
Молочная сыворотка (1:10)					
HCl 1 М					
NaOH 1 М					

*По результатам работы сделать выводы:*

О зависимости значений рН и ЭДС раствора.

О зависимости активности концентрации протонов водорода от рН раствора.

*Контрольные вопросы:*

1. Константа электролитической диссоциации воды при 25°C составляет  $1,821 \times 10^{-16}$ . Определить активность (концентрацию) ионов водорода в чистой воде.

2. В результате прямого потенциометрирования величина рН раствора составила 3,25. Определите  $a_{H^+}$  в этом растворе при 25°C.

3. К чистой воде добавлена сильная кислота (например, HCl), активная концентрация которой в растворе составила 0,01 н. Определить активность ионов  $HO^-$  и  $рОН$  в растворе при 25°C.

4. К чистой воде добавлено сильное основание (например, NaOH), активная концентрация которого в растворе составляет 0,02 н при 25°C. Определить активную концентрацию ионов  $H^+$  и рН раствора.

## РАБОТА 9. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

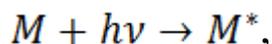
Спектрофотометрический анализ является одним из наиболее распространенных методов исследования. Применение этого метода в биологии позволяет судить о качественном составе и количественном содержании веществ, об их состоянии в биологических структурах, о строении молекул. Принцип спектрофотометрии основан на свойстве веществ поглощать свет. Свет как электромагнитное излучение характеризуется тремя основными параметрами: длиной волны ( $\lambda$ ), частотой ( $\nu$ ) и скоростью распространения ( $c$ ). Между этими параметрами существует взаимосвязь:

$$c = \nu\lambda$$

Поглощение света веществом — внутримолекулярный физический процесс. Свет поглощается молекулами (их комплексами, атомами, радикалами, ионами), а не сложными биологическими структурами, такими, например, как ядра, митохондрии, клетки.

Во взаимодействии вещества со светом, связанном с поглощением, проявляются как квантовые (корпускулярные), так и волновые свойства света. Квантовая природа света выражается в том, что вся энергия, заключенная в кванте света, поглощается молекулой сразу (за время порядка  $10^{-14}$  секунд) и без остатка. Следовательно, поглощение света веществом представляет собой дискретный, а не непрерывный процесс. Волновая природа света проявляется в том, что поглощение света достигается в результате взаимодействия электронного облака молекулы с электрическим вектором световой волны.

Физическая реакция поглощения света молекулой вещества ( $M$ ) может быть записана в следующем виде:



где  $M^*$  — возбужденное состояние молекулы. Возбужденная молекула  $M^*$  не отличается от обычной молекулы  $M$  по химическому составу или строению, но имеет несколько деформированное электронное облако и содержит избыточные запасы энергии.

Переходу  $M + h\nu \rightarrow M^*$  соответствует переброска на более высокий энергетический уровень (орбиту) лишь одного электрона молеку-

лы (фотоэлектрона). Поглощение света – это одноэлектронный одно-квантовый физический процесс.

Чаще всего фотоэлектроном сложных органических молекул является электрон, участвующий в образовании двойных, чаще делокализованных сопряженных связей молекулы.

Для истинных нерассеивающих растворов поглощение света проявляется в ослаблении светового потока после прохождения через объект. Если пропустить через слой вещества ( $l$ ), монохроматический свет с интенсивностью  $I_0$ , то после прохождения через вещество его интенсивность уменьшается до  $I$ . Поглощение света веществом для монохроматического света выражается законом Бугера-Ламберта-Бэра:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c l},$$

где

$I$  – интенсивность света прошедшего через объект,

$I_0$  – интенсивность света, падающего на объект,

$\varepsilon$  – молярный коэффициент экстинкции,

$c$  – концентрация вещества, поглощающего свет,

$l$  – толщина слоя вещества.

Поглотительную способность вещества характеризуют двумя параметрами – пропусканием и оптической плотностью.

Отношение интенсивности пучка света, прошедшего через кювету с веществом ( $I$ ) к интенсивности изначального пучка ( $I_0$ ) характеризует пропускание света веществом и обозначают –  $T$ :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Эту величину выражают обычно в процентах.

Десятичный логарифм отношения интенсивности изначального пучка ( $I_0$ ) к интенсивности пучка света, прошедшего через кювету с веществом ( $I$ ) называют оптической плотностью ( $D$ ):

$$D = \lg \frac{I_0}{I}$$

Величина оптической плотности может принимать положительные значения от 0 до  $\infty$ , однако, современные приборы позволяют точно измерить  $D$  в пределах от 0 до 2. При небольших значениях оптической плотности она, как правило, пропорциональна концентрации вещества:

$$D = \varepsilon cl$$

Свет различных длин волн поглощается веществом в неодинаковой степени. Зависимость оптической плотности от длины волны называют спектром поглощения. Спектр поглощения характеризуется наличием в нем определенных полос (пигов). Каждая полоса характеризуется:

- а) положением максимума, которое выражается соответствующей длиной волны ( $\lambda_{max}$ ),
- б) высотой пика ( $D_{max}$ ),
- в) полушириной полосы (рис. 9.1).

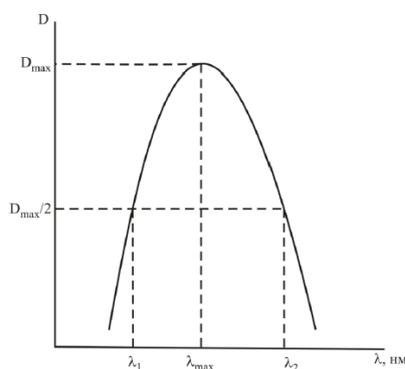


Рисунок 9.1. Спектр поглощения вещества и его основные параметры

Спектр поглощения является индивидуальной характеристикой вещества, т.е. определенному веществу соответствует определенный спектр поглощения. На этом основан качественный анализ спектрофотометрии. Форма спектра поглощения зависит не только от типа вещества, но и от его состояния, характера молекулярного окружения. Восстановление, окисление молекул, их агрегация, комплексообразование, изомеризация, изменение полярности окружения – все эти факторы существенно сказываются на форме спектров поглоще-

ния, что позволяет, исходя из анализа спектров поглощения, делать определенные выводы о характере состояния исследуемых веществ.

**Упражнение 1. Выбор рабочей концентрации и снятие спектров разных веществ.** Включить прибор и дать ему прогреться в течение получаса.

Подготовить серию разведений исследуемых веществ (генциан фиолетовый, нейтральный красный, метиловый оранжевый, метиленовый синий и бромфеноловый синий). Для этого отобрать 1 мл сток-раствора красителя в первую пробирку и довести его до 10 мл дистиллированной водой. Затем отобрать 1 мл полученного раствора из первой пробирки, перенести во вторую пробирку и довести дистиллированной водой до 10 мл. Далее отобрать 1 мл раствора из второй пробирки в третью и довести дистиллированной водой до 10 мл.

Далее на фотоэлектроколориметре построить спектр поглощения растворов исследуемого вещества в видимом диапазоне длин волн (400-700 нм) против дистиллированной воды. Рабочей концентрацией считается такая, высота пика которой в максимуме поглощения лежит в диапазоне от 0,7 до 1,6.

Зарисовать спектры поглощения веществ для рабочих концентраций. В таблице привести длины волн при максимуме поглощения.

**Упражнение 2. Определение качественного состава смеси.** На фотоэлектроколориметре построить спектр поглощения смеси неизвестных веществ. Опираясь на результаты предыдущего упражнения 1, определить по максимумам поглощения качественный состав смеси.

**Упражнение 3. Построение калибровочной кривой и определение концентрации вещества.** Построить калибровочную кривую для красителя нейтральный красный.

Для этого отобрать 1 мл сток-раствора красителя перенести его в первую пробирку и довести дистиллированной водой до 10 мл.

Используя полученный раствор готовят растворы красителя различной концентрации в соответствии с таблицей 9.1. Используя результаты упражнения 1, устанавливают длину волны, соответствующую пику поглощения нейтрального красного и измеряют оптическую плотность растворов. Результаты заносят в таблицу 9.1.

Полученные значения оптической плотности используют для построения калибровочного графика. Для этого на ось X наносят значения используемых концентраций красителя в %, а на ось Y – соответствующие им значения оптической плотности. График представляет собой прямую, проходящую через начало координат.

Таблица 9.1.

№ пробирки	Раствор красителя, мл	Вода, мл	C, красителя, %	Оптическая плотность
1	0	5	0	
2	0,5	4,5	0,0001	
3	1,0	4	0,0002	
4	1,5	3,5	0,0003	
5	2,0	3	0,0004	
6	2,5	2,5	0,0005	

Для определения концентрации получают оптическую плотность исследуемого раствора. Определить концентрацию раствора двумя способами:

I) Определяют концентрацию по калибровочной кривой.

II) Используя формулу  $c = D \frac{c_0}{D_0}$ , находят концентрацию исследуемого раствора. В качестве  $C_0$  и  $D_0$  используют значения для пробирки №4.

*По результатам работы сделать выводы:*

О том, в какой области видимого спектра поглощают разные красители.

О том, какова погрешность (%) при оценке концентрации с помощью калибровочной кривой и с помощью формулы по 1 точке.

*Контрольные вопросы*

1. На чём основан колориметрический метод анализа?
2. От чего будет зависеть высота пика вещества?
3. В чём смысл закона Бугера-Ламберта-Бэра?

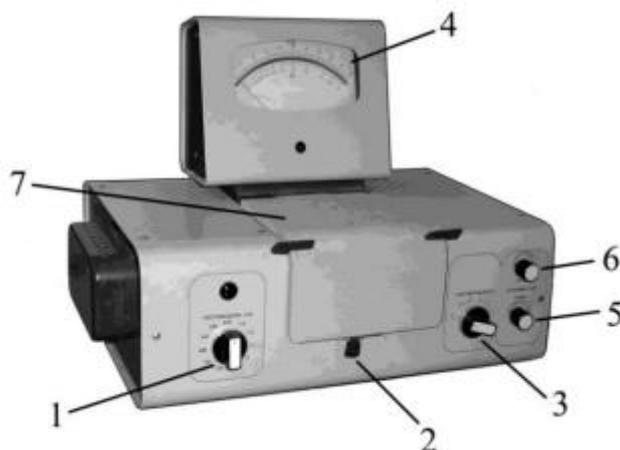
## ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ПРАВИЛА РАБОТЫ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. Работать в лаборатории разрешается только в халатах.
2. Длинные волосы должны быть подобраны.
3. Все процедуры при выполнении работы можно проводить только на своем рабочем месте или в вытяжном шкафу.
4. При возникновении каких-либо неясностей работу прекратить и обратиться за разъяснением к преподавателю или лаборанту.
5. В процессе работы все флаконы с реактивами должны находиться на отведенных для них местах.
6. Необходимо соблюдать осторожность при работе с кислотами и щелочами.
7. Запрещается отмеривать реактивы путем всасывания ртом в пипетку.
8. Запрещается закрывать пальцем отверстия пробирок и колб при взбалтывании растворов.
9. При нагревании пробирки в пламени горелки следить, чтобы отверстие пробирки не было направлено на кого-либо из работающих. Во избежание выброса содержимого из пробирки нагрев производить постепенно, постоянно встряхивая ее и периодически вынимая из пламени. Во избежание ожогов и поражений от брызг и выбросов не следует наклоняться над сосудом, в который налита какая-либо жидкость.
10. Пролитый реактив немедленно удалить со стола.
11. При попадании на кожу кислоты или щелочи необходимо тотчас же пораженный участок обильно промыть водой, обработать нейтрализующими веществами: 2 %-ным раствором бикарбоната натрия или 2 %-ным раствором уксусной кислоты.
12. Запрещается принимать пищу в лаборатории.
13. Запрещается трогать и включать приборы без разрешения преподавателя.
14. После окончания работы показать преподавателю результаты эксперимента и, получив разрешение на окончание работы, привести в порядок свое рабочее место.
15. Использованную посуду освободить от содержимого, сполоснуть и сдать лаборанту.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ПРАВИЛА РАБОТЫ НА ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРЕ

Фотоэлектроколориметр (ФЭК) предназначен для измерения экстинкции прозрачных окрашенных растворов (колориметрия), а также для измерения величины светорассеяния непрозрачных растворов и суспензий (нефелометрия). Каждый ФЭК снабжен набором светофильтров, позволяющих варьировать длину волны света, проходящего через раствор (в пределах видимой части спектра), а также комплектом стеклянных кювет с различными расстояниями между рабочими гранями для проведения измерения при различной толщине слоя раствора.

Общая схема прибора КФК-2 и обозначения.



1 – Рукоятка установки светофильтра (около рукоятки маркировка по длине волны).

2 – Ручка перемещения кювет в кюветном отделении.

3 – Ручка включения чувствительности фотоприемников (обозначена цифрами 1, 2 и 3 черного цвета при работе в диапазоне волн от 315 до 540 нм и красного цвета – в диапазоне от 590 до 980 нм).

4 – Микроамперметр (по верхней шкале измеряют коэффициент светопропускания (от 0 до 100%), а по нижней – оптическую плотность раствора (от 0 до 1,5)).

5 – Ручка «грубой» настройки микроамперметра.

6 – Установка «точной» настройки микроамперметра.

7 – Крышка кюветного отделения.

### *1. Подготовка прибора к работе*

1. Установить нужный светофильтр (рукояткой 1).

2. Рукоятку 3 (чувствительность фотоэлемента) установить на цифру 1 соответствующего цвета: при работе в диапазоне волн от 315 до 540 нм чувствительность обозначена цифрами черного цвета и в диапазоне от 590 до 980 нм – красного цвета.

3. Проверить, выключен ли микроамперметр (рукоятки 5 и 6 должны быть повернуты до отказа влево).

4. Прибор включить (вилку в сеть; тумблер, расположенный на задней стенке в нижнем левом углу, переключить в положение «вкл»). При этом загорается лампочка накаливания.

5. Прибор прогреть в течение 15-20 минут.

## *II. Измерение оптической плотности раствора*

1. Кювету с контролем или растворителем поставить в дальнее (от исследователя) гнездо кюветодержателя; кювету с исследуемым раствором (опытом) – в ближнее гнездо кюветодержателя.

2. Кювету с контролем (или растворителем) поместить в световой поток поворотом ручки 2 до отказа влево.

3. Закрыть крышку кюветного отделения (7).

4. Установить стрелку микроамперметра на 0 по нижней шкале поворотом ручки 5 («грубой» настройки). В случае необходимости воспользоваться ручкой 6 («точной» настройки).

**Примечание.** Если не удастся вывести стрелку микроамперметра на 0, то необходимо повысить чувствительность фотоэлемента. Для этого необходимо:

а) микроамперметр выключить (рукоятки 5 и 6 до отказа влево);

б) рукоятку переключения чувствительности фотоэлемента (3) поставить на цифру 2 соответствующего цвета;

в) вывести стрелку микроамперметра на 0 по нижней шкале (то есть повторить действия, указанные в пункте 4).

Если и в этом случае стрелка микроамперметра не выводится на 0, необходимо еще раз повысить чувствительность фотоэлемента, повторяя все действия, перечисленные в пунктах «а», «б» и «в», но установив рукоятку 3 на цифру 3 соответствующего цвета.

5. Заменить в световом потоке кювету с контролем на кювету с исследуемым раствором (опытом), поворачивая рукоятку 2 до отказа вправо.

6. Записать величину оптической плотности исследуемого раствора по нижней шкале микроамперметра.

7. Микроамперметр выключить (рукоятки 5 и 6 до отказа влево).

### *III. Завершение работы на приборе*

1. Реактивы из кювет вылить.

2. Кюветы сполоснуть дистиллированной водой и поставить в чашку Петри вверх доньшком (кюветы необходимо полоскать только после полного завершения работы или методики, в промежутках между отдельными измерениями этого делать не следует!).

3. Прибор выключить (тумблер, расположенный на задней стенке в левом углу, переключить в положение «выкл.»; вилку вынуть из розетки).

4. Крышку кюветного отделения закрыть

### **ПРИЛОЖЕНИЕ 3. ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ**

Лабораторные работы оформляются на двойных листочках формата А5. В том случае, если одного двойного листочка не хватает, то к нему последовательно прикрепляют необходимое количество двойных листочков.

Лабораторная работа подписывается на первом листочке сверху (Фамилия И. Группа/подгруппа).

Лабораторные работы должны быть пронумерованы по порядку их выполнения.

Требования к иллюстративному материалу:

1. Рисунки, схемы и графики, иллюстрирующие ход работы или результаты должны быть выполнены карандашом (возможно использование цветных карандашей).

2. Каждый рисунок схема или график должны быть подписаны и пронумерованы.

3. Каждый рисунок схема или график должен занимать не менее половины страницы.

4. Оси графиков и линии сетки таблиц должны быть выполнены карандашом строго по линейке.

5. Оси графиков должны быть подписаны.

В каждой лабораторной работе должно быть:

1. Название лабораторной работы.

2. Цель лабораторной работы.

3. Задачи лабораторной работы (в том случае, если упражнений несколько).

4. Ход работы.

5. Результаты работы с иллюстрациями (рисунки, таблицы, схемы, графики)

6. Выводы (вывод может быть единым для всей работы или сделан отдельно для каждого упражнения)

## ПРИЛОЖЕНИЕ 4. РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

### Работа 1. Поверхностное натяжение

1. Крутильные торсионные весы.
2. Подъемный столик с кремальерой.
3. Часовые стекла.
4. Платиновые кольца.
5. Пинцеты.
6. Спиртовки.
7. Пипетки на 1 мл.
8. Дистиллированная вода.
9. Этиловый спирт (95-96%).
10. Бутиловый спирт/Изобутиловый спирт.
11. Изопропиловый спирт.
12. Ацетон.
13. Этилацетат.
14. Глицерин.
15. Физиологический раствор NaCl (9 г NaCl растворить в 1 л)
16. Раствор Рингера. На 1 л H<sub>2</sub>O: NaCl – 9 г, KCl – 0,45 г, CaCl<sub>2</sub> – 0,25 г, NaHCO<sub>3</sub> – 0,15 г, MgCl<sub>2</sub> – 0,25 г.
17. 0,1%-ный раствор олеата натрия.

### Работа 2. Электрофорез белков на фильтровальной бумаге

1. Камера для электрофореза с блоком питания.
2. Полоски хроматографической (фильтровальной) бумаги 270 мм × 25 мм.
3. Ёмкости для окрашивания.
4. Растворы белков: яичный альбумин (разведение в 100 раз), сыворотка крови, сыворотка молока, желатина (0,5% раствор).
5. Фосфатный буфер pH 8,6. Подготовить раствор А (0,07 М однозамещённого фосфата калия KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 9,078 г в 1 л) и раствор Б (0,07 М двузамещённого фосфата натрия Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 11,876 г в 1 л). Смешать растворы А и Б в соотношении 1 : 99. Довести pH до нужного значения фосфорной кислотой или калиевой щелочью.
6. Раствор бромфенолового синего. На 1 л H<sub>2</sub>O: 0,1 г бромфенолового синего, 50 мл ледяной уксусной кислоты, 50 г – ZnSO<sub>4</sub>.

7. 7% раствор уксусной кислоты
8. Раствор закрепителя. На 1 л  $H_2O$ : 20 г ацетата натрия, 100 мл ледяной уксусной кислоты.

### Работа 3. Ферментативная активность

1. Центрифуга
2. Спектрофотометр
3. Растительный материал (клубень картофеля, кабачок, яблоко, груша, лук, огурец)
4. Мерная колба 50 мл
5. Ацетатный буфер рН 5,4
6. Фосфатный буфер рН 7,4
7. Весы
8. Раствор бензидина (в мерную колбу на 200 мл наливают примерно 100 мл дистиллированной воды, прибавляют 2,3 мл ледяной уксусной кислоты и 184 мг бензидина; колбу нагревают на водяной бане при  $60^{\circ}C$ , постоянно взбалтывая; после полного растворения бензидина в колбу добавляют 5,45 г уксуснокислого натрия, охлаждают и доводят водой до метки)
9. Раствор пирокатехина 0,05 М (5,5 г пирокатехина растворяют в 1 л дистиллированной воды)

### Работа 4. Набухание тканей

1. Весы торсионные
2. Чашки Петри.
3. Препаровальные ножницы.
4. Пинцеты.
5. Проволочные крючки.
6. Фильтровальная бумага.
7. Бюксы на 10 - 15 мл,
8. Мерные цилиндры на 10 - 15 мл
9. Пипетка на 1 мл.
10. Физиологический раствор  $NaCl$  для теплокровных (0,9%)
11. Гипотонический раствор  $NaCl$  (0,2%),
12. Гипертонический раствор  $NaCl$  (2,0%).
13. Раствор  $CaCl_2$  (10%).
14. Фосфатный буфер рН 9,1. Подготовить раствор А (0,07 М однозамещенного фосфата калия  $KH_2PO_4$  – 9,078 г в 1 л) и раствор Б (0,07 М двузаме-

щённого фосфата натрия  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 11,876 г в 1 л). Смешать растворы А и Б в соотношении 1 : 99. Довести рН до нужного значения фосфорной кислотой или калиевой щелочью.

15. Фосфатный буфер рН 4,9. Подготовить раствор А (0,07 М однозамещённого фосфата калия  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 9,078 г в 1 л) и раствор Б (0,07 М двузамещённого фосфата натрия  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 11,876 г в 1 л). Смешать растворы А и Б в соотношении 99 : 1. Довести рН до нужного значения фосфорной кислотой или калиевой щелочью.

16. Образцы тканей печени, мышцы и кожи курицы.

#### Работа 5. Осмотическое давление биологических жидкостей

1. Микроскоп
2. Капилляры
3. Растворы  $\text{NaCl}$  с концентрацией 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0 5,0 10,0%
4. Дистиллированная вода
5. Электрическая плитка
6. Менделевская замазка или сургуч
7. Предметные стёкла
8. Покровные стёкла
9. Лук

#### Работа 6. Антимикробная фототерапия.

1. Стеклянные чашки Петри (стерильные).
2. Автоматическая пипетка на 20-200 мкл.
3. Спирт 96%.
4. Микробиологические шпатели.
5. Питательный микробиологический агар (.
6. Микробиологическая петля.
7. Спиртовки.
8. Бокс с источником УФ излучения.
9. Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр.
10. Кюветы с толщиной слоя 1 см.
11. Пробирки с ватно-марлевыми пробками (стерильные).
12. Тест культуры: грамположительные и грамотрицательные условно патогенные бактерии.

### Работа 7. Биоэлектрические потенциалы

1. Растворы KCl с концентрацией 0,01 н и 0,001 н
2. Сифоны, заполненные 2% агар-агаром, приготовленном на насыщенном растворе KCl
3. Яблоко или картофель.
4. Столетник (алоэ).
5. Потенциометр.
6. Каломельные электроды.

### Работа 8. pH-метрия

1. pH-метр или ионметр со встроенным милливольтметром
2. Фосфатные буферные растворы с pH 3,0 4,0 5,0 6,0 7,0 8,0 9,0 10,0
3. Раствор NaOH 1 М
4. Раствор HCl 1 М
5. Сыворотка молока
6. Фруктовый или овощной сок
7. Пробирки мерные
8. Стаканчики стеклянные вместимостью 25-50 мл

### Работа 9. Спектрофотометрия

1. Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр
2. Растворы красителей (нейтральный красный, метиленовый оранжевый, кристаллический фиолетовый, метиленовый синий) 0,1%
3. Раствор с неизвестной концентрацией нейтрального красного (0,01-0,1%)
4. Раствор 2 красителей
5. Пипетки на 5 мл
6. Набор пробирок

## ВОПРОСЫ ДЛЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ

1. Биофизика как наука: цели, задачи, предмет, объект исследований. Классификация разделов биофизики в зависимости от размеров исследуемого объекта. Методологическая база разделов биофизики.
2. История развития биофизики. Вклад отечественных и зарубежных учёных в развитие биофизики.
3. Классификация термодинамических систем. Их параметры. Изолированная система – идеальная модель.
4. Термодинамическое равновесие закрытых и изолированных систем. Стационарное состояние открытых систем. Основные отличия.
5. Ход реакций в закрытых и открытых системах. Роль ферментов.
6. Экзергонические и эндергонические процессы. Понятие потенциала и разности потенциалов. Энергетическое сопряжение.
7. Основные постулаты термодинамики.
8. Первый закон термодинамики. Опыты Лапласа и Лавуазье. Закон Гесса как следствие первого закона термодинамики. Тепловая энергия – как эквивалент всех видов энергии.
9. Работа как процесс преобразования энергии. Преобразование энергии в закрытых системах. Деградация энергии в открытых системах.
10. Энтальпия. Изменение энтальпии в экзотермических и эндотермических реакциях. Виды теплообмена.
11. Понятие энтропии. Связь энтропии с упорядоченностью системы. Роль энтропии в жизнедеятельности организмов.
12. Второй закон термодинамики в приложении к живым системам. Уравнение Пригожина.
13. Свободная энергия Гиббса. Уравнение Гиббса-Геймгольца как математическое объяснение протекания реакций. Энтальпийные и энтропийные процессы.
14. Специфика биомеханики живых организмов. Понятие статики и динамики в живых организмах.
15. Принципы молекулярного узнавания Крейна на примере биологических систем.
16. Нековалентные взаимодействия в живых системах. Потенциал Ленарда-Джонса.
17. Гидрофобный эффект, как фактор направляющий процессы фолдинга биомолекул и формирование мембран. Изменение энтропии.

18. Классификация аминокислот по физико-химическим свойствам радикалов.
19. Первичная структура белка. Явление резонанса как причина прочности пептидной связи.
20. Спиральные виды вторичной структура белка. Спираль  $4_{13}$  и  $3_{10}$  Пролиновая спираль. Условия формирования.
21. Складчатые виды вторичной структуры белка.
22. Надвторичные структуры белка. Мотивы. Цинковый палец. Лейциновая застёжка-молния.
23. Изопериметрические задачи в биофизике. Форма третичной структуры белка. Кривая Фишера.
24. Условия формирования четвертичной структуры белка. Роль водной среды и гидрофобного эффекта.
25. Вторичная структура нуклеиновых кислот. Конформации, их характеристики и роль. Стеккинг взаимодействия.
26. Фолдинг и денатурация нуклеиновых кислот и белков. Баланс энтропии. Уравнение зависимости температуры плавления от состава ДНК.
27. Строение мембран клеток и их функции. Жидкостно-мозаическая модель мембран.
28. Химический состав биологических мембран. Связи между частями мембран.
29. Мембрана как конденсатор. Поведение мембраны в электрическом поле.
30. Метод исследования проницаемости мембран.
31. Типы пассивного транспорта веществ через клеточные мембраны. Роль градиентов.
32. Понятие градиента и его роль в направлении протекания процессов.
33. Схема активного и пассивного транспорта. Их отличие.
34. Энергетика активного транспорта ионов через мембрану. Модель работы  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы.
35. Понятие биопотенциалов. Классификация. Потенциал покоя и потенциал действия. Роли ионов натрия и калия в генерации потенциала действия в гигантском аксоне кальмара.
36. Механизм передачи электрического импульса по нервному волокну. Роль миелиновых оболочек.
37. Митохондриальная цепь переноса электронов. Принцип работы. Энергетика процесса.

38. Особенности ферментов, как биологических катализаторов. Единицы активности.
39. Ферментативный катализ. Изменение энергии активации.
40. Строение ферментов. Причины эффективности ферментативного катализа.
41. Схема ферментативного катализа на примере реакции преобразования одного субстрата в 1 продукт. Факторы, ограничивающие скорость протекания ферментативной реакции.
42. Константа Михаэлиса. Физический и биологический смысл.
43. Поверхностное натяжение различных жидкостей. Механизм возникновения поверхностного натяжения на границе раздела 2 сред.
44. Поверхностное натяжение. Поверхностная буферность.
45. Электрофорез. Применение в биологических и смежных исследованиях.
46. Электрофорез. Прикладные аспекты в медицине.
47. Набухание тканей. Влияние состава ионов окружающей среды на набухание тканей.
48. Набухание тканей. Методы изучения проницаемости веществ в клетки.
49. Набухание тканей. Зависимость набухания тканей от рН раствора.
50. Осмотическое давление и методы его регистрации. Онкотическое давление.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.Ф. *Биофизика*. – М.: Владос, 2006. – 287 с.
2. Волькенштейн М.В. *Биофизика*. – СПб.: Лань, 2008. – 594 с.
3. Тарусов Б.Н., Антонов В.Ф., Бурлакова Е.В. *Биофизика*. М., 1968.
4. Рубин А.Б. *Биофизика*. М., 2000.
5. *Биофизика* / Г. А. Плутахин, А. Г. Коцаев. – М.: Лань, 2012. – 240 с.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

РАБОТА 1. ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ .....	3
РАБОТА 2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ НА ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГЕ .....	11
РАБОТА 3. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ .....	14
РАБОТА 4. НАБУХАНИЕ ТКАНЕЙ .....	18
РАБОТА 5. ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ.....	22
РАБОТА 6. АНТИМИКРОБНАЯ ФОТОТЕРАПИЯ.....	27
РАБОТА 7. БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ .....	30
РАБОТА 8. pH-МЕТРИЯ .....	34
РАБОТА 9. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ.....	41
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ПРАВИЛА РАБОТЫ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.....	46
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ПРАВИЛА РАБОТЫ НА ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРЕ.....	47
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ .....	50
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ .....	51
ВОПРОСЫ ДЛЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ.....	55
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	58

Учебно-методическое издание

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ  
К МАЛОМУ ПРАКТИКУМУ ПО БИОФИЗИКЕ

Издание седьмое

Составители:

*Каневский Матвей Владимирович*  
*Тучина Елена Святославна*  
*Миронова Ирина Константиновна*

Редактор В.А. Трушина  
Технический редактор Л.В. Агальцова  
Корректор Е.А. Малютина

Формат 60 X 84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.  
Усл. печ. л. 2,56 (2,75). Уч.-изд. л. 2,9. Тираж 300. Заказ №3#  
Издательство Саратовского университета. 410026, Саратов, Астраханская,83.  
Типография Издательства Саратовского университета. 410026, Саратов, Астраханская, 83.