

ФГБОУ ВПО
«САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
К МАЛОМУ ПРАКТИКУМУ ПО БИОХИМИИ

Учебно-методическое пособие для студентов биологического факультета,
обучающихся по направлениям подготовки
020400 «Биология» и 050100 «Педагогическое образование - биология»

САРАТОВ 2013

УДК 19.31

ББК 28.072я73+28.070я73

Составители:

С.А.Коннова, А.А.Галицкая, Е.В.Плешакова, Е.С.Тучина

Методическое пособие к малому практикуму по биохимии. 5-е изд., перераб. и доп./Сост. С.А.Коннова, А.А.Галицкая, Е.В.Плешакова, Е.С.Тучина / под общ. ред. В.В. Игнатова. – Саратов, 2013. – 73 с.:ил.

ISBN 5-292-03368-5

Под редакцией заслуженного деятеля науки РФ,
доктора биологических наук, профессора *В.В. Игнатова*

В учебно-методическое пособие включены лабораторные работы малого практикума по курсу биохимии. Каждая работа содержит краткие теоретические комментарии и рекомендации по проведению экспериментов. Пособие включает вопросы для самоконтроля и подготовки к экзамену.

Для студентов биологического факультета, обучающихся по направлениям подготовки 020400 «Биология» и 050100 «Педагогическое образование - биология».

Рекомендуют к печати:

Кафедра биохимии и биофизики биологического факультета СГУ

Доктор медицинских наук, профессор В.Б. Бородулин

Доктор биологических наук, профессор Т.Г. Анищенко

Публикуется по решению Учебно-методической комиссии
биологического факультета СГУ

УДК 19.31

ББК 28.072я73+28.070я73

Работа издана в авторской редакции

ISBN 5-292-03368-5

©

С.А.Коннова, А.А.Галицкая,
Е.В.Плешакова, Е.С.Тучина,
составление, 2013

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящее издание предназначено для студентов биологического факультета, обучающихся по направлениям подготовки 020400 «Биология» и 050100 «Педагогическое образование - биология».

Основные цели практикума:

- развитие у студентов навыков самостоятельной работы с биологическим материалом в лаборатории (прил.1), творческого отношения к работе, умения анализировать наблюдаемые явления;
- изучение закономерностей химического строения и функционирования живой материи на модельных экспериментах;
- изучение возможностей использования аналитических методов в различных областях биологии.

Пособие составлено в соответствии с типовой для университетов программой по биохимии и молекулярной биологии и новым учебным планом.

Методическое пособие подготовлено на основе предыдущего издания 1991 года, куда внесены следующие изменения и дополнения:

- 1) обновлен набор лабораторных работ с учетом новых требований программы и возможностей кафедры;
- 2) шире представлены методы количественного анализа;
- 3) к каждой теме составлены вопросы и упражнения для самоконтроля.

Выполнение программы практикума поможет студенту самостоятельно решать небольшие практические задачи при помощи биохимических методов исследования.

ТЕМА 1. БЕЛКИ И ИХ СВОЙСТВА

Белки (протеины) – высокомолекулярные органические соединения, мономерными единицами которых являются аминокислоты. В настоящее время в составе различных белков обнаружено около 20 аминокислот (а также иминокислоты – пролин и оксипролин). Все они являются α -аминокислотами и по конфигурации принадлежат к L – ряду. Аминокислоты в молекуле белка связаны между собой пептидными связями ($-\text{CO}-\text{NH}-$).

Белки, состоящие только из аминокислот, – простые белки (протеины). Сложные белки, кроме аминокислот, включают в состав вещества иной природы – простетические группы. Для каждого белка характерна определенная последовательность расположения аминокислот – первичная структура. Полипептидная цепь не вытянута в пространстве, а частично свернута в спираль, образуя вторичную структуру. Укладка спирали в компактную глобулу – третичная структура. Некоторые белки состоят из нескольких одинаковых или близких по строению молекул (субъединиц), образующих четвертичную структуру.

Для сохранения пространственной структуры белка необходимо наличие дополнительных связей (водородных, дисульфидных, ионных, гидрофобных). Пространственная структура белковой молекулы очень лабильна и легко разрушается под влиянием различных физических и химических воздействий (процесс денатурации). В то же время первичная структура белка очень устойчива к внешним воздействиям.

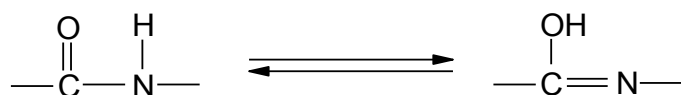
Для обнаружения белков используют 2 группы реакций – цветные реакции и реакции осаждения.

Работа 1. Сравнение строения и аминокислотного состава различных белков с помощью цветных реакций

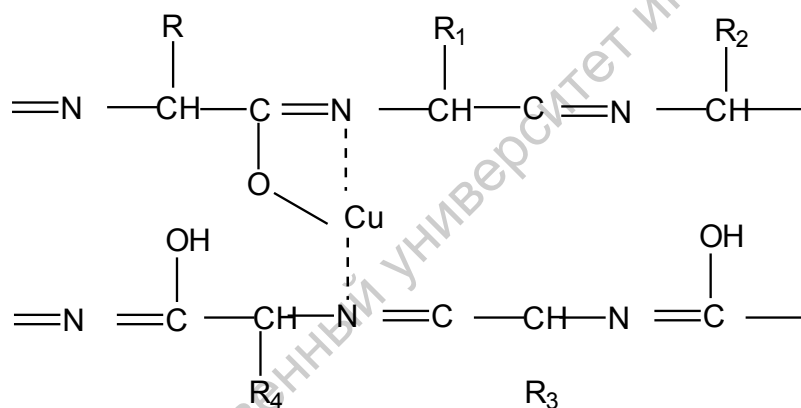
Цветные реакции основаны на образовании окрашенных продуктов при взаимодействии белков с некоторыми химическими веществами и обусловлены присутствием в молекуле белка той или иной аминокислоты.

Эти реакции дают возможность не только обнаружить наличие белка в растворе, но и выявить присутствие отдельных аминокислот в молекуле белка. На основе некоторых цветных реакций разработаны методы количественного определения белка и аминокислот.

1. Биуретовая реакция (Пиотровского) обусловлена наличием пептидных связей в молекуле белка. Для пептидной (амидной) группы характерна кето-енольная (лактам-лактимная) таутомерия:



При добавлении сернокислой меди к сильнощелочному раствору белка образуются комплексные соединения меди с пептидными группировками, окрашенные в фиолетовый цвет. При этом преобладающие в щелочной среде енольные формы пептидных связей образуют ковалентные связи с ионом меди за счет водорода енольного гидроксила, а координационные – за счет электронных пар атомов азота иминных групп.



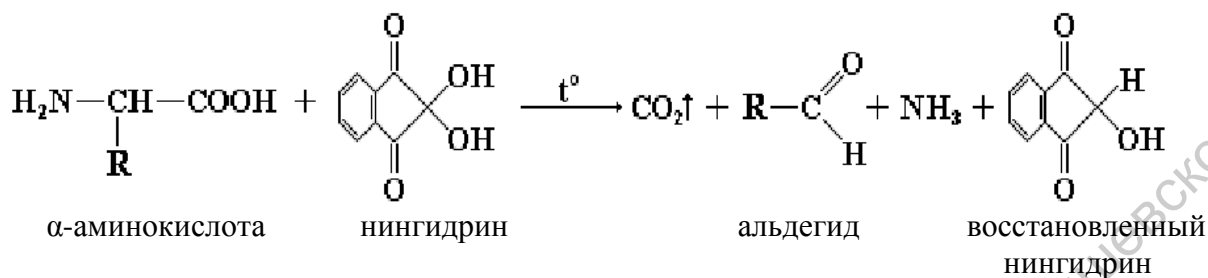
Биуретовую реакцию дают все соединения, содержащие в молекуле две и больше двух близкорасположенных пептидных связей, например, биурет $\text{NH}_2\text{---CO---NH---CO---NH}_2$ (продукт конденсации двух молекул мочевины), оксамид $\text{NH}_2\text{---CO---CO---NH}_2$.

Ход исследования

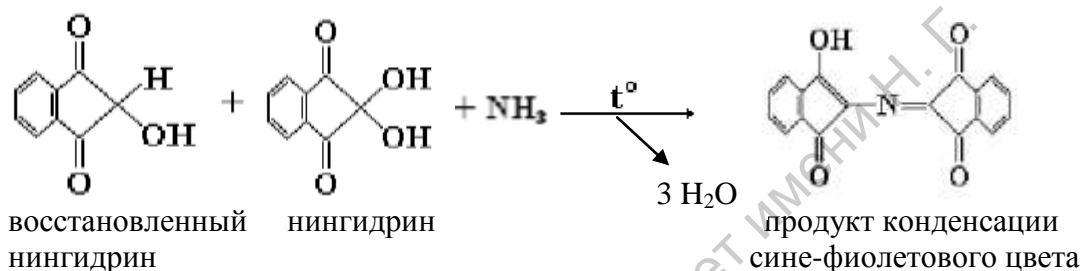
В одну пробирку наливают 10 капель раствора яичного альбумина, в другую – 10 капель раствора желатины. Затем в обе пробирки добавляют по 10 капель 10 %-ного раствора NaOH и по 1 капле 2 %-ного раствора CuSO_4 , перемешивают. Сравнить окраску в пробирках, объяснить полученный результат.

2. Нингидриновая реакция открывает свободные α -

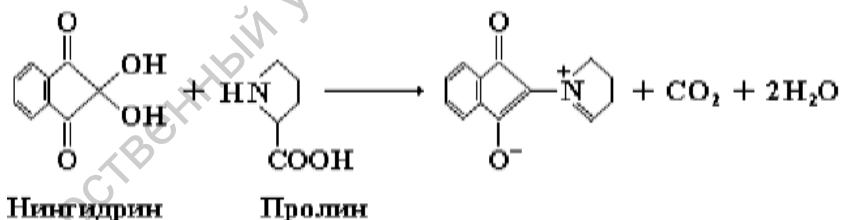
аминогруппы в молекуле белка. В ходе реакции N-концевая α-аминокислота окисляется кислородом нингидрина и распадается с образованием аммиака, CO₂ и соответствующего альдегида.



Восстановленный нингидрин конденсируется с другой молекулой нингидрина и аммиаком, образуя продукт сине-фиолетового цвета.



Аналогично реагируют свободные α-аминокислоты, исключение составляет пролин, при взаимодействии с которым образуется продукт конденсации желтого цвета.



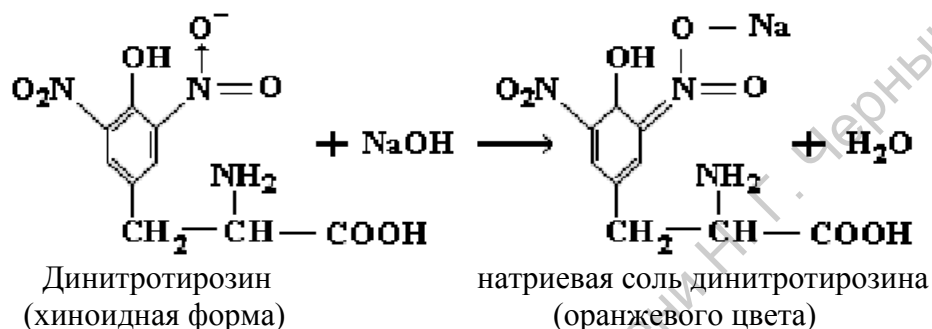
Ход исследования

В две пробирки, содержащие по 10 капель раствора альбумина и желатины соответственно, добавляют по 10 капель 0,1 %-ного раствора нингидрина и нагревают до кипения. Объяснить полученный результат.

3. Ксантопротеиновая реакция (Мульдера) обусловлена присутствием в молекуле белка ароматических аминокислот. При нагревании этих аминокислот с концентрированной азотной кислотой образуются их нитропроизводные, окрашенные в желтый цвет.



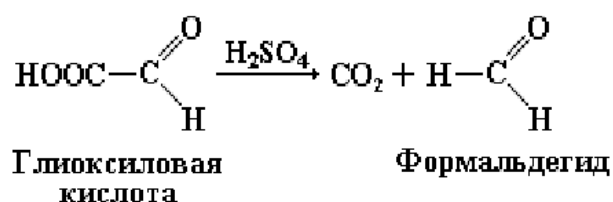
В щелочной среде нитропроизводные аминокислот приобретают оранжевую окраску.



Ход исследования

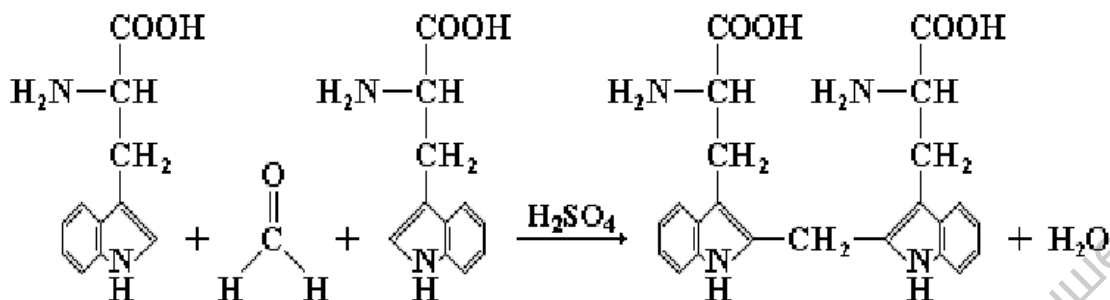
В две пробирки, содержащие по 10 капель раствора альбумина и желатины соответственно, добавляют по 5 капель концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают до кипения. Отмечают полученную окраску. После охлаждения в пробирки добавляют по стенке по 10 капель 10 %-ного раствора NaOH. Наблюдают изменение окраски. Объяснить полученный результат.

4. Цветные реакции на триптофан. Индольное кольцо триптофана в кислой среде реагирует с альдегидами, образуя окрашенные продукты конденсации. Чаще всего для выявления триптофана используют реакцию Адамкевича-Гопкинса-Коля с глиоксиловой кислотой. Глиоксиловая кислота декарбоксилируется под действием концентрированной серной кислоты и образует формальдегид, который и вступает в реакцию с триптофаном.

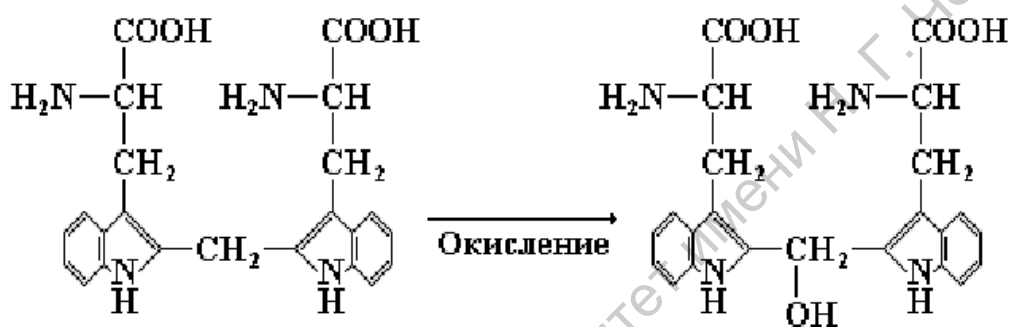


В результате конденсации двух молекул триптофана и одной молекулы формальдегида образуется бис-2-триптофанилметан, который затем

окисляется до бис-2-триптофанилкарбинола, имеющего красно-фиолетовую окраску. При добавлении в реакционную смесь сульфата меди (II) развивается сине-фиолетовая окраска.

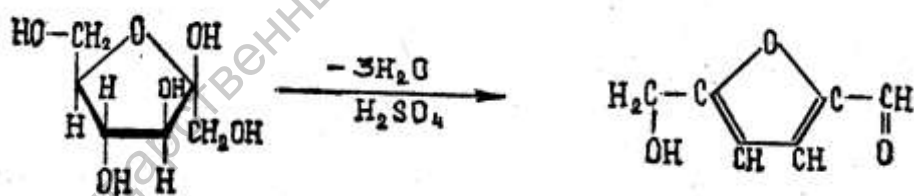


бис-2-триптофанилметан



бис-2-триптофанилкарбинол

Реакция Шульце–Распайля основана на способности триптофана реагировать с оксиметилфурфуролом, образующимся из фруктозы в сильноокислой среде.



Фруктоза

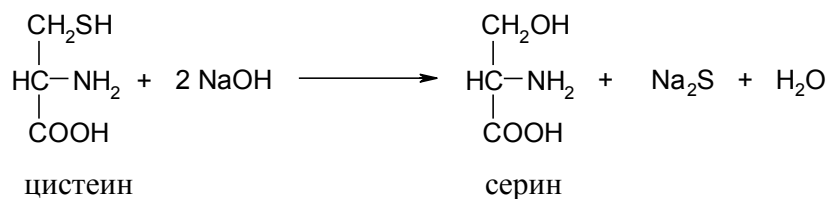
оксиметилфурфурол

Продукт конденсации оксиметилфурфуrolа и триптофана имеет темно-красный цвет.

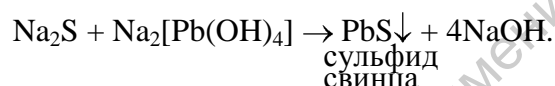
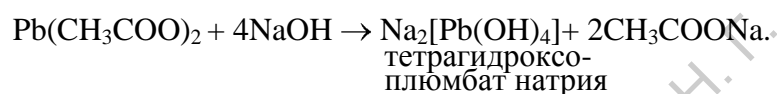
Ход исследования

В две пробирки наливают по 10 капель раствора альбумина и желатины соответственно, добавляют по 2 капли 10 %-ного раствора фруктозы, перемешивают. Осторожно по стенке пробирки подслаивают по 10 капель концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей образуется окрашенное кольцо. Объяснить полученный результат.

5. Реакция Фоля обусловлена присутствием в белке серосодержащих аминокислот, которые при кипячении со щелочью теряют серу в виде сульфида натрия.



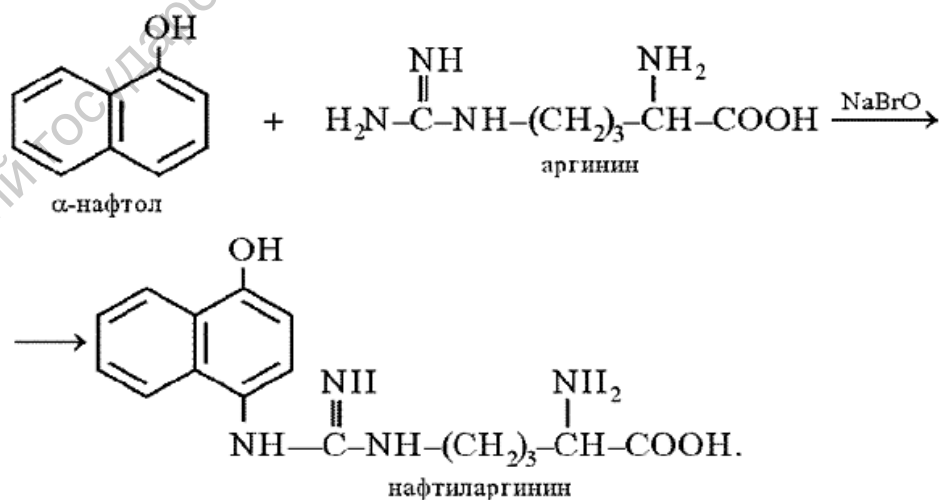
Сульфид натрия с ацетатом свинца в щелочной среде дает черно-коричневое окрашивание.



Ход исследования

В две пробирки наливают по 10 капель раствора альбумина и желатины соответственно, добавляют по 20 капель 10 %-ного раствора NaOH и осторожно кипятят в течение 3 мин. Затем прибавляют по 1 капле 5 %-ного раствора уксуснокислого свинца. Объяснить полученный результат.

6. Реакция Сакагути на аргинин. Гуанидиновая группа аргинина, входящий в состав белка, окисляется гипобромитом натрия, затем продукт окисления взаимодействует с α -нафтолом, образуя вещество красного цвета.



Ход исследования

В две пробирки наливают по 10 капель раствора альбумина и желатины соответственно, добавляют по 5 капель 10 %-ного раствора NaOH и по 5 капель 1 %-ного спиртового раствора α -нафтола. Перемешивают, затем приливают по 3 капли 2 %-ного раствора гипобромита натрия. Объяснить результат.

Полученные во всех работах экспериментальные данные внести в таблицу.

Название реакции	Употребляемые реактивы	Исследуемый белок	Наблюдаемая окраска	Чем обусловлена реакция
Пример: 1. Биуретовая реакция 2. И так далее	NaOH CuSO ₄	Альбумин Желатина	Фиолетовая Фиолетовая	Взаимодействием ионов меди с пептидными группировками

Сделать выводы:

1. О сходстве в строении альбумина и желатины.
2. О различии аминокислотного состава этих белков.
3. О возможности использования цветных реакций на белки в аналитической практике.
4. Написать химические механизмы цветных реакций на белки.

Работа 2. Разделение аминокислот хроматографическим методом

Для разделения и количественного определения аминокислот широко используются различные виды хроматографии. Наиболее доступным из них является метод распределительной хроматографии на бумаге, который основан на различной растворимости аминокислот в двух несмешивающихся жидкостях (органическом растворителе и воде).

В качестве инертного носителя используют специальную фильтровальную бумагу. Вода, будучи полярным веществом, прочно сорбируется на целлюлозе и служит неподвижной фазой. Подвижной фазой обычно является бутанол (или другой малополярный растворитель). Гидрофобные аминокислоты, лучше растворяющиеся в неполярном растворителе, движутся от точки старта с большей скоростью, чем гидрофильные аминокислоты. В результате смесь аминокислот разделяется на отдельные компоненты, которые обнаруживают с помощью нингидриновой реакции и

идентифицируют с применением аминокислот – «свидетелей».

Скорость перемещения отдельных аминокислот определяется посредством коэффициента распределения (R_f):

$$R_f = \frac{\text{Путь, пройденный аминокислотой (до середины пятна)}}{\text{Путь, пройденный растворителем (до фронта растворителя)}}$$

Коэффициент распределения является характерной величиной для каждой аминокислоты и постоянен при данных условиях опыта (растворитель, сорт бумаги, температура и др.).

Ход исследования

Работать осторожно, не прикасаясь руками к центру диска!

Бумажный диск диаметром 12 см делят графитовым карандашом на 4 сектора. В центре диска делают небольшой вырез (около 1 см в диаметре) и в каждом секторе на линии старта отмечают точку старта. В вырез диска помещают ножку высотой 2 см, сделанную из фильтровальной бумаги в виде трубочки. Затем в первый сектор в точку старта пастеровской пипеткой наносят 2 капли (дробно!) раствора лизина, во второй – 2 капли раствора лейцина, в третий – 2 капли раствора тирозина, а в четвертый – смесь двух аминокислот. В чашку Петри наливают 15 мл органического растворителя (бутанол, насыщенный водой). Бумажный диск с нанесенными аминокислотами подсушивают на воздухе и накладывают на края чашки Петри так, чтобы ножка касалась растворителя. Чашку Петри накрывают крышкой и оставляют стоять при комнатной температуре на 30–40 мин, наблюдая за движением фронта растворителя. Разгон заканчивают, как только растворитель пройдет расстояние, равное радиусу крышки чашки Петри. Хроматографический диск вынимают пинцетом из камеры-чашки, отмечают фронт растворителя карандашом и переносят под тягу для испарения органического растворителя. Хроматограмму проявляют, смочив ее в 0,1 %-ном растворе нингидрина в ацетоне, подсушивают под тягой и помещают в термостат при температуре 50–100 °С на 5 мин.

Для каждой аминокислоты определить R_f . Сравнивая положение на хроматограмме аминокислот смеси с положением аминокислот – «свидетелей», определить состав смеси.

Полученные данные занести в тетрадь, хроматограммы с указанием идентифицированных аминокислот зарисовать или подклеить в тетрадь.

Работа 3. Осаждение белков

Два основных фактора позволяют удерживаться тяжёлым молекулам белка в растворе. Во-первых – это наличие гидратной оболочки; во-вторых – наличие заряда у белковой молекулы. Гидратная оболочка - это слой молекул воды, определенным образом ориентированных на поверхности бел-

ковой молекулы. Поверхность большинства белковых молекул заряжена отрицательно, и диполи молекул воды притягиваются к ней своими положительно заряженными полюсами. Чем больше гидрофильных свойств у белковой молекулы, чем больше в ее составе и на ее поверхности аминокислот с полярными (гидрофильными) радикалами, тем сильнее выражена и прочнее удерживается гидратная оболочка и тем больше в ней слоев. Вода гидратной оболочки обладает особыми свойствами: она не является свободной, она связана с белковой молекулой – это “связанная” вода. Окружая каждую молекулу белка, гидратная оболочка не дает этим белковым молекулам сблизиться, соединиться и выпасть в осадок. Чтобы осадить белок из раствора, надо лишить его обоих факторов стабилизации: и заряда, и гидратной оболочки.

Реакции осаждения белков весьма разнообразны. В зависимости от применяемого реагента они могут быть обратимыми или необратимыми. К необратимым относятся реакции осаждения белков солями тяжелых металлов, нагреванием, минеральными и органическими кислотами. Обратимые реакции осаждения белков можно провести, используя в качестве осадителя органические растворители (на холоде) либо соли щелочных металлов. Глубоких изменений в молекуле белка не происходит, поэтому полученный осадок хорошо растворяется в исходном растворителе, и белок полностью сохраняет свои нативные свойства.

1. Высаливание белков. Это обратимое осаждение белков из раствора путем добавления нейтральных солей (особенно сульфатов) в высоких концентрациях. При высаливании происходит дегидратация молекул белков и устранение заряда. Процесс осаждения зависит от молекулярной массы и заряда белка, степени гидрофильности.

Ход исследования

К 20 каплям раствора яичного белка приливают по стенке равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. На границе жидкостей образуется белое кольцо – осадок глобулина. Содержимое пробирки фильтруют, а к фильтрату, помешивая стеклянной палочкой, добавляют малыми порциями порошок сульфата аммония, до полного насыщения раствора. Раствор мутнеет – осаждаются альбумины. Половину содержимого пробирки переносят в чистую пробирку и прибавляют 20 капель дистиллированной воды. Осадок растворяется. Объяснить полученные результаты.

2. Осаждение белка спиртом, ацетоном основано на дегидратации молекул белка. Кратковременное воздействие спирта на холоде не нарушает структуры белка, при комнатной температуре происходит денатурация белка.

Ход исследования

К 10 каплям раствора альбумина добавляют 10 капель этанола. Отмечают осаждение белка. Затем в пробирку наливают 20 капель дистиллированной воды – осадок не растворяется.

3. Осаждение белка кислотами. Концентрированные минеральные и некоторые органические кислоты вызывают денатурацию белковых молекул. Кроме того, минеральные кислоты дегидратируют молекулы белка.

Ход исследования

В две пробирки наливают по 10 капель раствора альбумина. Затем в первую пробирку добавляют 5 капель 10 %-ной трихлоруксусной кислоты, во вторую – 5 капель концентрированной азотной кислоты. Отмечают выпадение осадка, не исчезающего при добавлении воды.

4. Осаждение белка солями тяжелых металлов. Ионы тяжелых металлов при взаимодействии с белками (особенно с группами SH) образуют нерастворимые в воде комплексы. Белок при этом подвергается денатурации.

Ход исследования

В две пробирки наливают по 10 капель раствора альбумина. В первую пробирку прибавляют 2 капли 2 %-ного раствора сульфата меди, во вторую – 2 капли 5 %-ного раствора ацетата свинца. Отмечают появление осадка, не исчезающего при добавлении воды.

5. Осаждение белка при нагревании. При нагревании раствора белка до 60–70 °С происходит, как правило, выпадение белка в осадок. Это связано с глубокими нарушениями структуры белковой молекулы.

Важную роль в осаждении денатурированного белка играет концентрация водородных ионов (рН). Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в изоэлектрической точке белка. В сильнокислых и сильнощелочных растворах денатурированный при нагревании белок не выпадает в осадок, так как молекулы белка несут в первом случае положительный, а во втором – отрицательный заряд.

Ход исследования

В четыре пронумерованные пробирки наливают по 10 капель раствора альбумина. Затем во вторую пробирку добавляют 1 каплю 1 %-ного раствора уксусной кислоты, в третью – 5 капель 10 %-ного раствора уксусной кислоты, в четвертую – 5 капель 10 %-ного раствора едкого натра. Все пробирки нагревают до кипения и отмечают отсутствие или выпадение осадка, а также его характер. Объяснить результаты.

Полученные данные внести в таблицу.

Название групп осадителей	Употребляемые реактивы	Характер осадка	Чем обусловлено осаждение
1. Нейтральная соль	а) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ раствор	Белое кольцо (глобулин)	Дегидратация белка, снятие заряда
	б) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ кристаллический	Помутнение раствора (альбумин)	“ – “
	в) H_2O дистиллированная	Растворение осадка	Обратимость осаждения
2. И так далее			

После оформления таблицы сделать выводы:

- а) о возможности обратимого и необратимого осаждения белка;
- б) об основных механизмах осаждения белка;
- в) о практическом применении реакций осаждения белка.

Работа 4. Определение изоэлектрической точки белка

Молекулы белка имеют электрический заряд, возникающий в результате ионизации свободных карбоксильных групп и аминок групп. Заряд белка зависит, во-первых, от аминокислотного состава белка, во-вторых, от рН среды. При определенном значении рН суммарный заряд молекулы белка может стать равным нулю. Это значение рН называется изоэлектрической точкой белка (ИЭТ). Различные белки имеют различные ИЭТ. У кислых белков ИЭТ лежит при $\text{pH} < 7$, у основных – при $\text{pH} > 7$.

В изоэлектрическом состоянии белок максимально неустойчив и очень легко может быть осажден из раствора. Эта особенность поведения белка используется для экспериментального определения его ИЭТ.

Ход исследования

В четыре пронумерованные пробирки наливают из бюреток по 2 мл буферного раствора с разными значениями рН (3,0; 4,0; 5,0; 6,0) и по 2 мл раствора желатины. Содержимое пробирок перемешивают, не допуская образования пены, затем в каждую пробирку осторожно, не перемешивая, накладывают по 1 мл спирта. Через 30 мин отмечают пробирку, в которой наблюдается наиболее интенсивное (за счёт выпадения осадка белка) помутнение на границе раздела жидкостей. рН раствора в этой пробирке соответствует ИЭТ данного белка.

Степень помутнения обозначают так: (–) – отсутствие помутнения; (+) – слабое помутнение; (++) – выраженное помутнение; (+++) – максимальное помутнение. Результаты эксперимента занести в таблицу.

№ пробирки	pH буферного раствора	Степень помутнения на границе раздела сред
1.		
и так далее		

На основании полученных результатов сделать вывод о значении изоэлектрической точки и об особенностях аминокислотного состава данного белка.

Работа 5. Количественное определение белка по Горналу

Определение содержания белка является одной из наиболее важных и часто используемых методик в научно-исследовательских и клинических лабораториях, в производственных условиях.

Для количественного определения белков применяют физические, химические и биологические методы. Наиболее разнообразны химические методы, в частности колориметрические. Они основаны на измерении интенсивности окраски, развивающейся при взаимодействии белков со специфическими реагентами (см. работу 1 «Сравнение строения и аминокислотного состава различных белков с помощью цветных реакций»). Чтобы по интенсивности окраски рассчитать концентрацию белка, строят калибровочный график.

Из колориметрических методов определения белка особого внимания заслуживают методы, основанные на биуретовой реакции. Они высоко специфичны, точны и легко выполнимы, не требуют дефицитных реактивов, хотя чувствительность их невысокая.

В лабораторной практике широко используется метод Горнала, основанный на образовании окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей белка с ионами двухвалентной меди в щелочной среде. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации белка в растворе. Метод Горнала позволяет определить концентрацию белка в растворе в пределах 1 – 10 мг/мл. При концентрации белка в исследуемом растворе выше 10 мг/мл его необходимо развести водой.

Ход исследования

Для построения калибровочного графика используют стандартный раствор альбумина ($C = 20$ мг/мл), из которого готовят рабочие растворы белка различной концентрации в соответствии с таблицей на стр. 16.

Затем берут 5 пронумерованных пробирок и наливают в них по 1 мл раствора белка различной концентрации из соответствующих пробирок с рабочими растворами (от 2,0 до 10,0 мг/мл). Добавляют в каждую пробирку по 4 мл биуретового реактива, осторожно перемешивают. В 6-ю пробирку наливают 1 мл воды и 4 мл биуретового реактива (контроль на реак-

тивы). Растворы белка перемешивать осторожно, избегая образования пены! Через 30 мин окрашенные растворы фотометрируют на ФЭЖе с зеленым светофильтром (540–550 нм) в кюветах с толщиной светопоглощающего слоя 10 мм против контрольного раствора. Правила работы на ФЭЖе см. в прил. 2.

№№ пробирок	Стандартный раствор белка, мл	Вода, мл	Содержание белка в пробе, мг	Концентрация белка, мг/мл	Оптическая плотность раствора
1	0,5	4,5	10	2,0	
2	1,0	4,0	20	4,0	
3	1,5	3,5	30	6,0	
4	2,0	3,0	40	8,0	
5	2,5	2,5	50	10,0	

Полученные значения экстинкции (оптической плотности раствора) используют для построения калибровочного графика.

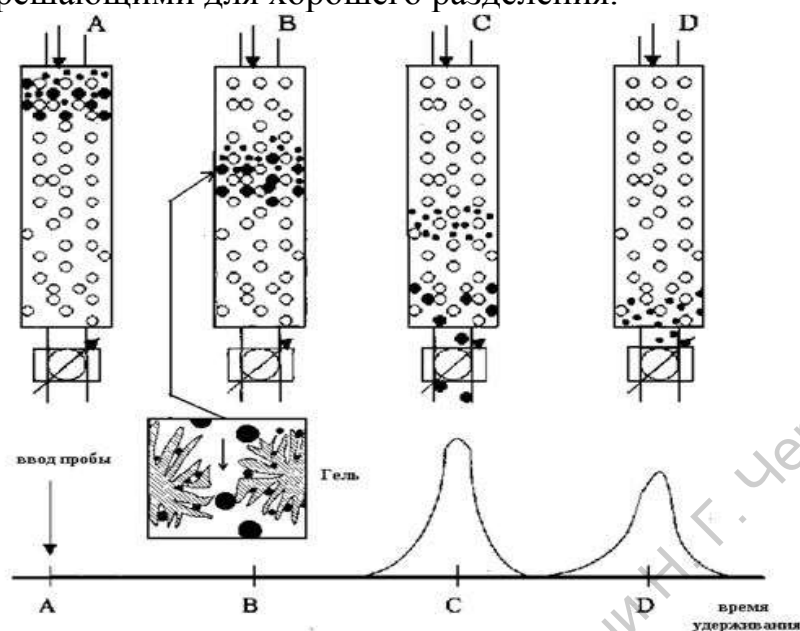
Для этого на ось x наносят значения использованных концентраций белка (C) с 2,0–10,0 мг/мл, на ось y – соответствующие им значения экстинкции (E). График представляет собой прямую, проходящую через начало координат. При больших концентрациях белка линейная зависимость нарушается, на графике появляется изгиб. Калибровочный график строится заново при работе с другим прибором или другими реактивами.

Определение белка в исследуемом растворе: в шестую и седьмую пронумерованные пробирки вносят соответственно 1 мл исследуемого раствора (содержащего от 1 до 10 мг белка) и 1 мл дистиллированной воды (контроль на реактивы), добавляют в обе по 4 мл биуретового реактива, осторожно перемешивают. Через 30 мин фотометрируют при зелёном светофильтре с той же длиной волны в кюветах с толщиной светопоглощающего слоя 10 мм против контроля. Концентрацию белка в растворе определяют по калибровочному графику. При определении белка в сыворотке крови (6–8 % белка) ее необходимо развести, учитывая чувствительность метода, как минимум в 10 раз.

Работа 6. Обессоливание белкового раствора при помощи гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25

Метод гель-фильтрации основан на различиях в гидродинамических размерах молекул разделяемых веществ. Осуществляется с помощью гелей–молекулярных сит с определенным (контролируемым) диаметром пор. Малые молекулы в образце могут проникать внутрь гранул, вследствие этого они протекают через колонку медленнее. Крупные молекулы, которые не могут проникнуть в гранулы через поры, проходят сквозь колонку

быстрее, чем более мелкие. Правильный размер пор и свойства растворителя являются решающими для хорошего разделения.



Наиболее распространенными носителями для гель-хроматографии белков являются гели, синтетические производные полисахарида декстрана, в полимерные молекулы которых введены поперечные «сшивки», образующие трёхмерную сетку с порами заданного размера – сефадексы, сефакрилы, сефароза, биогели А и Р. Метод применим для фракционирования биологических макромолекул по их размерам, а также для их очистки от низкомолекулярных примесей, в том числе для обессоливания.

Для обессоливания обычно используют сефадексы G-25 и G-50 (грубый или средний), внутрь гранул которых большинство известных белков не проникает. Объем элюции белков (V_e) обычно немного больше наружного объема колонки (V_o), а ионы соли элюируются приблизительно в объеме, равном сумме наружного и внутреннего ($V_o + V_i$). Объем наносимого образца при обессоливании может составлять 20 – 30% от общего объема колонки.

Обессоливание с помощью сефадексов происходит гораздо быстрее и с меньшей потерей белка, чем при диализе.

Ход исследования

Укрепляют колонку строго вертикально. Сначала открывают верхнюю, а затем нижнюю пробки, промывают колонку дистиллированной водой. ВНИМАНИЕ! Как только весь необходимый объем элюента будет пропущен через колонку, ее следует закрыть, не допуская пересыхания сефадекса!

1. Калибровка колонки. Основная задача калибровки состоит в том, чтобы определить главные параметры колонки: наружный объем V_o и

внутренний объем V_i . V_o - это объем, занимаемый буфером, находящимся вне гранул сефадекса (подвижная фаза), а V_i – объем буфера, находящегося внутри всех гранул геля (неподвижная фаза). Очищаемый белок выходит в объеме элюата в пределах между V_o и V_i .

Для определения этих характеристик в колонку загружают смесь 0,2%-ного раствора голубого декстрана и 0,2%-ного раствора хромата калия (1:1), объемом не более 2% от общего объема колонки (для колонки объемом 10 мл это составляет примерно 160 мкл). Калибровочную смесь наносят на сухой верхний фильтр колонки, сразу же после нанесения начинают сбор фракций по 0,5 мл в градуированные пробирки. После того, как калибровочная смесь полностью войдет в колонку, проводят элюцию дистиллированной водой до полного выхода хромата калия. Полученные результаты записать в виде рабочей таблицы, отмечая примерное содержание компонентов калибровочной смеси («-» – отсутствует, «+», «++», «+++» - разное содержание).

№ фракции	Присутствие голубого декстрана	Присутствие хромата калия
1.		
2.		
3.		
4.		

Используя полученные данные, рассчитывают объем элюции V_e для голубого декстрана и для хромата калия.

Объем элюции V_e (мл) равен объему элюата, собранному после нанесения образца на колонку до появления максимальной концентрации его в соответствующей фракции. Объем элюции V_e голубого декстрана примерно равен наружному объему колонки, объем элюции V_e хромата калия – сумме наружного и внутреннего. Рассчитывают параметры колонки и представляют их в виде заполненной таблицы:

Тип геля	Сефадекс G-25
Элюент	
V_e голубого декстрана = V_o	
V_e хромата калия	
V_i колонки	

После окончания калибровки колонку промывают несколькими объемами дистиллированной воды.

2. Обессоливание альбумина. На промытую дистиллированной водой колонку наносят пробу для обессоливания (200 мкл). Тотчас же после нанесения пробы начинают собирать фракции по 0,5 мл в градуированные пробирки, в каждой определяют наличие белка и сульфата аммо-

ния. Сульфат аммония выявляют по качественной реакции с уксуснокислым свинцом (добавлять по 1 капле и перемешать). Появление при этом мути указывает на наличие ионов сульфата. Присутствие белка определяют при помощи биуретового реактива (добавить по 2-3 капли).

Полученные результаты также отображают в виде рабочей таблицы, отмечая содержание белка и соли.

№ фракции	Присутствие белка	Присутствие соли
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		

Используя данные таблицы определяют, в каком объеме снимается с колонки весь белок, через какой объем элюата начинает выходить соль. На основании полученных данных рассчитывают объемы элюции альбумина и сульфата аммония. После определения объемов элюции белка и соли сравнить их с данными калибровки и сделать вывод о возможном применении гель-фильтрации.

ВНИМАНИЕ! По окончании эксперимента промыть колонку несколькими объемами дистиллированной воды и тщательно ее закрыть, проследив, чтобы над поверхностью сефадекса остался слой жидкости.

Работа 7. Сложные белки

Сложные белки – это белки, содержащие в своей структуре компоненты небелковой природы, так называемые простетические (добавочные) группы. В зависимости от химической природы этого компонента сложные белки делятся на нуклео-, хромо-, глико-, липо-, фосфопротеины.

Гликопротеины содержат в своей молекуле помимо простого белка углеводный компонент. Гликопротеины присутствуют почти во всех тканях и жидкостях организма, в секретах слизистых желез (муцины), входят в состав костной, хрящевой и соединительной тканей (мукоиды). В организме они играют важную роль, выполняя опорную, защитную функции, препятствуют проникновению инфекций в организм, участвуют в процессах межклеточного взаимодействия («узнавание»).

Ход исследования

1.Выделение муцина из слюны: в пробирку собирают 1–2 мл слюны и по каплям приливают концентрированную уксусную кислоту (2–3 капли). Выпадает осадок муцина. Через 3 мин жидкость фильтруют, сгусток на фильтре промывают водой из пипетки (10–20 капель), осторожно переносят в пробирку и добавляют 30 %-ный раствор натриевой щелочи до полного растворения осадка (около 20 капель). С содержимым пробирки (щелочной раствор муцина) проводят следующие реакции.

2.Реакция на белковый компонент: к 10 каплям щелочного раствора муцина прибавляют 1–2 капли 2 %-ного раствора CuSO_4 . Положительная биуретовая реакция доказывает присутствие в пробе белка.

3.Реакция на углевод: к 10 каплям раствора муцина добавляют 2 капли раствора α -нафтола, хорошо перемешивают. Раствор нейтрализуют, осторожно добавляя 3 капли концентрированной H_2SO_4 . После остановки реакции осторожно подслаивают равное суммарному объему количество концентрированной H_2SO_4 (15–20 капель). На границе раздела жидкостей появляется окрашенное кольцо фиолетового цвета.

Фосфопротеины содержат в качестве простетической группы фосфорную кислоту. Они служат важнейшим питательным материалом для развития эмбрионов и растущих организмов. Так, казеин молока, вителлин яичного желтка включают все незаменимые аминокислоты, важнейшие минеральные вещества – фосфор и кальций.

Ход исследования

1.Выделение и гидролиз казеина: к 1–2 мл обезжиренного молока добавляется 1–2 капли концентрированной уксусной кислоты. Через 5 мин надосадочную жидкость осторожно сливают, а в пробирку с осадком казеина добавляют 2–3 мл дистиллированной воды и через 5 мин избыток надосадочной жидкости сливают, а остаток фильтруют. Казеин собирают с фильтра в пробирку и растворяют в 4 мл 10 %-ного раствора натриевой щелочи. Содержимое пробирки кипятят 1 мин, затем охлаждают и проводят реакции для выявления продуктов гидролиза казеина.

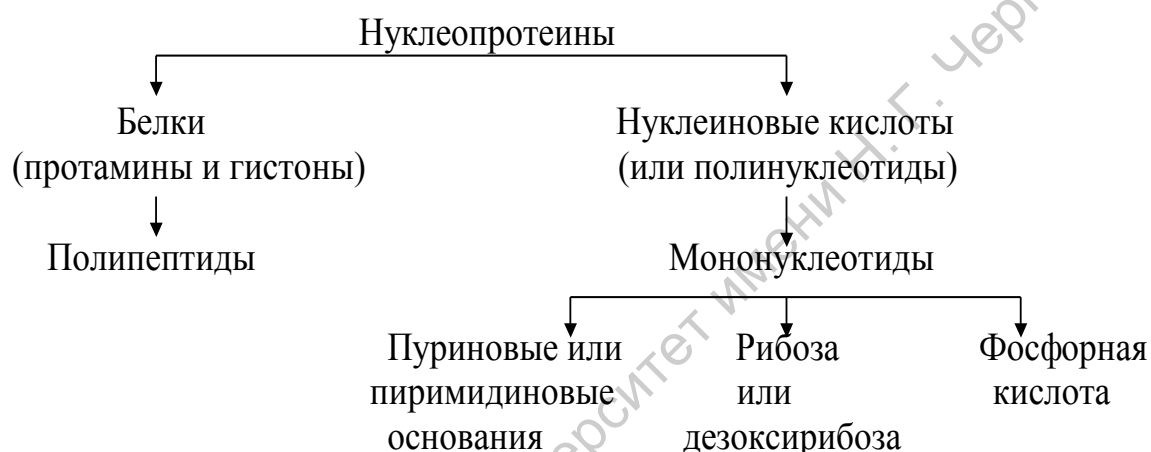
2.Обнаружение белка (биуретовая реакция): в пробирку наливают 10 капель гидролизата и добавляют каплю 2 %-ного раствора CuSO_4 . Наблюдают результат качественной реакции на белок.

3.Обнаружение фосфорной кислоты: к 10 каплям гидролизата казеина добавляют 1 каплю раствора фенолфталеина и по каплям концентрированную азотную кислоту до обесцвечивания. Затем добавляют 20 капель молибденового реактива, нагревают до кипения и охлаждают.

Появляется желтый осадок – результат качественной реакции на наличие фосфорной кислоты.

Нуклеопротеины относятся к группе сложных белков. Простетической группой нуклеопротеидов являются нуклеиновые кислоты, представляющие собой высокомолекулярные соединения, состоящие из нуклеотидов. Нуклеотиды, в свою очередь, состоят из пуриновых или пиримидиновых оснований, сахара и фосфорной кислоты. В ходе гидролиза нуклеопротеины распадаются на основные компоненты согласно схеме.

Схема гидролиза нуклеопротеинов



Ход исследования

Гидролиз нуклеопротеидов: в колбочку на 100 мл помещают 2 г дрожжей, предварительно измельченных, и добавляют 30 мл 5 %-ного раствора H_2SO_4 . Содержимое колбочки тщательно перемешивают. Небольшое количество жидкости отфильтровывают в пробирку, где после нейтрализации 30 %-ным раствором $NaOH$ проводят биуретовую реакцию. Колбочку закрывают пробкой с обратным холодильником, помещают в кипящую водяную баню, осторожно кипятят в течение часа. После этого жидкость, содержащую продукты гидролиза нуклеопротеинов, охлаждают и фильтруют. С гидролизатом проводят следующие реакции:

1. Реакция на белковый компонент: 10 капель гидролизата дрожжей титруют 30 %-ным раствором $NaOH$ до щелочной реакции и добавляют 1–2 капли 2 %-ного раствора $CuSO_4$.

2. Реакция Молиша на углеводы: в пробирку наливают 10 капель гидролизата, добавляют 30 %-ный раствор $NaOH$ до щелочной реак-

ции, затем добавляют 5 капель α -нафтола, перемешивают. Осторожно подслаивают концентрированную H_2SO_4 (15–20 капель). На границе жидкостей появляется окрашенное кольцо.

3. Реакция на фосфорную кислоту: к 10 каплям гидролизата добавляют равный объем раствора молибденовокислого аммония в азотной кислоте и нагревают до кипения. Образуется желтый осадок фосфорномолибденового аммония.

4. Проба на пуриновые основания: 10 капель гидролизата дрожжей титруют 30 %-ным раствором NaOH до нейтральной реакции (по индикатору). Затем добавляют 3 капли 1 %-ного раствора азотнокислого серебра. Появляется осадок. Результаты работ свести в таблицу.

№№ пробирок	Исследуемый материал	Употребляемые реактивы	Открытый компонент	К какой группе сложных белков относится
1				

ТЕМА 2. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные биополимеры, обнаруживаемые во всех типах клеток. Они выполняют в организме ряд важнейших функций: обеспечивают хранение и передачу генетической информации.

Нуклеиновые кислоты делятся на два типа: рибонуклеиновые (РНК) и дезоксирибонуклеиновые (ДНК). РНК и ДНК отличаются особенностями химического строения входящих в них пентоз и пиримидиновых оснований, локализацией в клетке и фундаментальным назначением в клеточном метаболизме.

Количественное определение нуклеиновой кислоты включает в себя определение содержания хотя бы одного из трех ее компонентов: азотистых оснований, пентоз и фосфатов. В соответствии с этим существует три группы методов определения количества нуклеиновых кислот: определение содержания азотистых оснований путем измерения поглощения УФ-света; определение содержания пентоз и фосфора с помощью цветных реакций.

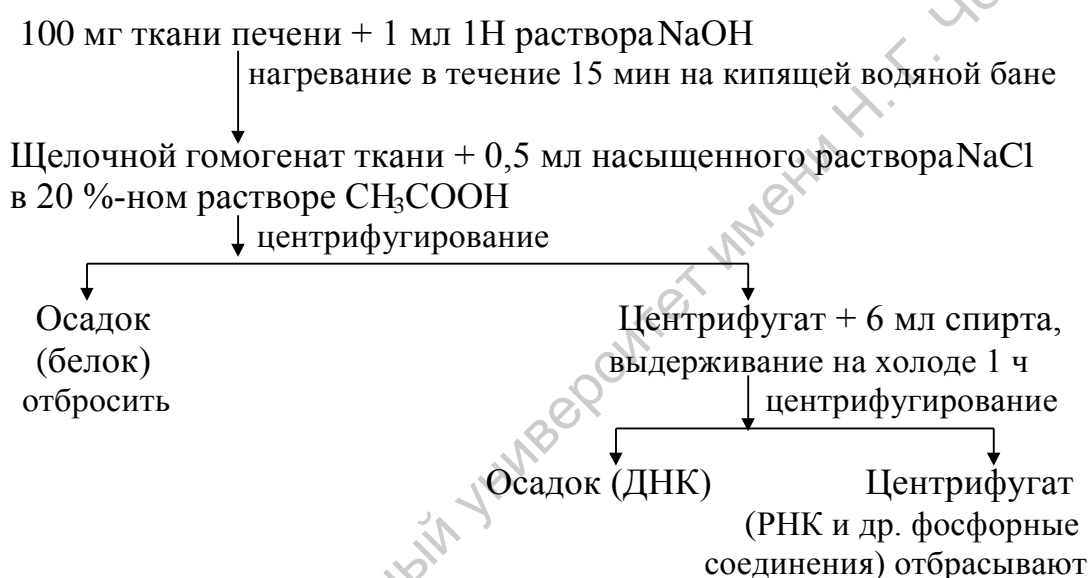
Работа 8. Количественное определение ДНК **методом Шмидта – Таннгаузера**

Определение ДНК методом Шмидта–Таннгаузера основано на анализе количества фосфора, входящего в состав ДНК, который освобождается в результате сжигания (минерализации) ДНК. Фосфор определяют колориметрическим методом по реакции его с молибдатом аммония в присутствии восстановителя. Продукт реакции – молибденовая синь – дает ок-

раску синего цвета, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству фосфора в пробе. Для определения количества фосфора необходимо построение калибровочного графика.

1. Выделение ДНК из печени крысы. Метод основан на том, что при добавлении насыщенного раствора NaCl в уксусной кислоте к обработанной щелочью ткани печени белки выпадают в осадок, а ДНК и другие фосфорные соединения остаются в растворе. ДНК отделяют от других фосфорных соединений путем осаждения ее спиртом и промывания осадка трихлоруксусной кислотой. Ниже представлена схема выделения.

Схема выделения ДНК из ткани печени



Ход исследования

100 мг ткани печени помещают в пробирку с 1 мл раствора NaOH (1 Н) и ставят в кипящую водяную баню на 15 мин. Периодически содержимое пробирки перемешивают стеклянной палочкой. В течение этого времени ткань полностью растворяется (получившаяся жидкость представляет собой прозрачный или слегка опалесцирующий раствор). Пробу охлаждают при комнатной температуре, а затем при 0 °С (лед). К охлажденной пробе добавляют 0,5 мл насыщенного раствора NaCl в 20 %-ном растворе CH₃COOH, при этом белки выпадают в осадок. Через 3–5 мин после добавления реактива пробу центрифугируют 5 мин при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в находящуюся во льду пробирку, в которую налито 6 мл C₂H₅OH; при этом ДНК выпадает в осадок, а РНК и другие фосфорные соединения остаются в спиртовом растворе.

Для полного осаждения ДНК содержимое пробирки тщательно перемешивают и оставляют на холоде в течение 1 ч. Затем содержимое про-

бирок центрифугируют 5 мин при 5000 об/мин; центрифугат сливают, а осадок ДНК промывают 5 мл 5 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты путем центрифугирования. Центрифугат сливают, а полученный препарат ДНК используют для количественного определения ДНК по фосфору.

2. Определение содержания ДНК в препарате печени.

Для построения калибровочного графика, необходимого для анализа содержания неорганического фосфора, используют стандартный раствор KH_2PO_4 , содержащий 5 мкг фосфора в 1 мл пробы (22 мг KH_2PO_4 в 1 л).

Из стандартного раствора в пробирках готовят серию разведений следующим образом:

№ пробирки	Объем станд. раствора, мл	Вода, мл	Содержание фосфора в пробе, мкг	Концентрация фосфора, мкг/мл	Оптическая плотность
1	1	4	5	1	
2	2	3	10	2	
3	3	2	15	3	
4	4	1	20	4	

Из каждой пробирки отбирают 2,5 мл жидкости, прибавляют 0,25 мл 5 %-ного раствора молибдата аммония и 0,25 мл 1 %-ного раствора гидрохинона, перемешивают. Параллельно ставят контроль на реактивы (вместо раствора фосфата в реакцию берут 2,5 мл воды).

Через 5 мин к содержимому пробирки добавляют 1 мл карбонат-сульфитной смеси и 1 мл воды, перемешивают. Через 10 мин пробы колориметрируют против контроля на реактивы ($\lambda=590-600$ нм, оранжевый светофильтр, кювета 10 мм) и по полученным данным строят калибровочную кривую: на оси абсцисс откладывают значения концентраций стандартных растворов, а на оси ординат – соответствующие им оптические плотности продуктов реакции.

Определение количества ДНК в препарате: отмытый трихлоруксусной кислотой осадок ДНК количественно переносят в колбу Кьельдаля, добавляют 1,5 мл концентрированной серной кислоты и ставят на газовую горелку. Сжигание (минерализацию) ведут до полного просветления жидкости.

После окончания минерализации жидкость из колбы Кьельдаля количественно (трижды ополаскивая водой) переносят в коническую колбу, где доводят реакцию среды до нейтральной (по универсальному индикатору), добавляя сначала 30 %-ный, а затем 10 %-ный растворы NaOH. Далее жидкость количественно переносят в мерную колбу и доводят дистиллированной водой до метки 25 мл. После этого содержимое мерной колбы переливают в коническую колбу и перемешивают. Из колбы отбирают 2,5 мл жидкости, переносят в пробирку, добавляют

0,25 мл 5 %-ного раствора молибдата аммония и 0,25 мл 1 %-ного раствора гидрохинона, перемешивают. Через 5 мин к содержимому пробирки добавляют 1 мл карбонат-сульфитной смеси и 1 мл воды, перемешивают. Через 10 мин определяют оптическую плотность окрашенного раствора на ФЭКе. По величине оптической плотности рассчитывают количество фосфора в мг на мл пробы, используя калибровочную кривую. Расчет концентрации ДНК в растворе производят, исходя из того, что фосфор составляет примерно 10 % от массы ДНК. Затем определяют содержание ДНК в 100 г ткани печени.

Работа 9. Количественное определение ДНК **методом Дише**

Метод основан на определении углеводного компонента в составе ДНК. Дезоксирибоза в присутствии концентрированных кислот образует фурфуриловый спирт, который конденсируется с дифениламином и дает продукт синего цвета. Для количественного определения пентозы необходимо построение калибровочного графика.

1. Выделение ДН-протеида из селезенки крысы: дезоксирибонуклеотиды (ДН-протеины) выделяют из тканей, богатых клеточными ядрами: зубной железы, селезенки и др. ДН-протеины растворяются в растворах солей средней концентрации, например в 1 М растворе NaCl. При сильном разведении раствора они осаждаются в виде нитей.

Ход исследования

Берут 0,5–1 г селезенки и растирают в течение 10–15 мин в ступке с окисью алюминия (100 мг), приливая небольшими порциями 8 мл 5 %-ного раствора NaCl, содержащего цитрат натрия. Полученный вязкий раствор переносят в центрифужную пробирку, уравнивают ее на центрифужных весах и центрифугируют 10–15 мин при 5000 об/мин. Надосадочная жидкость содержит ДН-протеины.

В химический стакан наливают 50–80 мл дистиллированной воды и медленно сливают в нее надосадочную жидкость, перемешивая содержимое деревянной палочкой. ДН-протеид не растворим в воде, поэтому выпадает в осадок и наматывается в виде нитей на деревянную палочку.

ДН-протеины вместе с палочкой переносят в пробирку. Для растворения нитей в пробирку добавляют 8 мл 0,4 %-ного раствора NaOH и перемешивают. Полученный щелочной раствор ДН-протеида делят на две равные части. В одной из них определяют содержание ДНК методом Дише. Вторую часть сохраняют для следующей работы (определение ДНК спектрофотометрическим методом).

2. Определение содержания ДНК в препарате.

При построении калибровочного графика в качестве стандарта используют раствор очищенного препарата ДНК в 0,05 Н растворе NaOH (800 мкг/мл).

Для приготовления рабочего раствора смешивают равные объемы (по 2 мл) стандартного раствора и 10 %-ного раствора HClO_4 , нагревают смесь в пробирке с обратным холодильником при 100°C в течение 15 мин. Затем из этого раствора (концентрация ДНК 400 мкг/мл) готовят серию разведений следующим образом:

№№ пробирок	Рабочий раствор, мл	5 %-ный раствор HClO_4 , мл	Концентрация ДНК, мкг/мл	Реактив Дише, мл	Оптическая плотность
1	0,5	0,5	300	4	
2	1,0	1,0	200	4	
3	0,5	1,5	100	4	
4	0,3	1,7	60	4	
5 (контроль)	-	2,0	-	4	

Во все пробирки наливают по 4 мл реактива Дише (раствор дифениламина в ледяной уксусной кислоте). Растворы перемешивают, пробирки закрывают пробками с обратным холодильником или фольгой и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. После охлаждения колориметрируют при 595 нм (красный светофильтр) против контроля (5 %-ного раствора HClO_4 – 2 мл + 4 мл реактива Дише). Полученные результаты используют для построения калибровочной кривой: значение концентрации ДНК калибровочных растворов откладывают на оси абсцисс, а на оси ординат – соответствующие оптические плотности.

Определение ДНК в препарате: в пробирку вносят пипеткой 2 мл исследуемого раствора (щелочной раствор ДНК из селезенки) и приливают к нему 4 мл реактива Дише. Растворы перемешивают, закрыв пробкой, и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем пробирки охлаждают и колориметрируют окрашенные в сине-фиолетовый цвет растворы при 595 нм (красный светофильтр) в кюветах с толщиной светопоглощающего слоя 10 мм против контроля на реактивы. Содержание ДНК определяют по калибровочному графику. Затем производят расчет содержания ДНК в 100 г ткани селезенки.

Работа 10. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот по А.С. Спирину

В основе метода лежит характерное свойство азотистых оснований, являющихся производными гетероциклических соединений – пурина или пиримидина, интенсивно поглощать УФ-свет.

Нуклеиновые кислоты экстрагируют из биологического материала

горячей хлорной кислотой с последующим определением поглощения экстрактов в ультрафиолетовой области спектра при 270 и 290 нм.

Расчет содержания нуклеиновых кислот производится по формуле, предложенной А.С. Спириным.

Ход исследования

В работе используется ДН-протеид, выделенный из селезенки (щелочной раствор, см. работу №8).

К 0,4 мл раствора, содержащего ДНК, прибавляют 1,6 мл дистиллированной воды и 2 мл 10 %-ного раствора HClO_4 . Содержимое пробирки тщательно перемешивают, затем ее закрывают пробкой с обратным холодильником, нагревают в кипящей водяной бане в течение 30 мин. Эта процедура обеспечивает количественную экстракцию нуклеиновых кислот из исследуемого материала и их кислотный гидролиз до растворимых фрагментов. Гидролизат охлаждают, отфильтровывают 1 мл в градуированную пробирку, добавляют 5 %-ный раствор HClO_4 до 10 мл, перемешивают и определяют оптическую плотность при 270 нм и 290 нм против контрольного раствора – 0,5 Н HClO_4 на спектрофотометре (E_{270} и E_{290} соответственно). Содержание нуклеиновых кислот (в мкг/мл) рассчитывают по формуле:

$$C = 2 \times \frac{(E_{270} - E_{290}) \times 10,3}{0,19},$$

где 0,19 – коэффициент, соответствующий содержанию 1 мкг фосфора нуклеиновых кислот, содержащегося в 1 мл раствора; 10,3 – средний пересчетный коэффициент, выведенный на основании теоретического расчета содержания фосфора в нуклеиновой кислоте.

Контрольные вопросы и упражнения по темам 1 и 2

1. Что такое белки? Какова их биологическая роль?
2. Почему ИЭТ различны для разных белков?
3. Почему белки называют полиэлектролитами?
4. Что такое обратимое и необратимое осаждение белка?
5. Что такое денатурация белка?
6. Какие уровни организации белковой молекулы изменяются при денатурации?
7. Чем обусловлены реакции осаждения белков?
8. Каково практическое применение реакции осаждения белков?
9. Каково применение цветных реакций на белки?
10. В чем отличие простых и сложных белков?
11. Каковы продукты гидролиза нуклеопротеинов?
12. Как построена простетическая группа гликопротеинов?

13. Какие функции выполняют сложные белки в организмах?
14. Написать структурную формулу следующего пептида: сер-тир-три-глию. Какой заряд несет молекула этого пептида в водной среде? Какими цветными реакциями можно обнаружить данный пептид?
15. Написать схему диссоциации альбуминов и гистонов в нейтральной, кислой, щелочной среде.
16. Написать формулы незаменимых аминокислот.
17. Написать формулы аминокислот, у которых преобладают: а) кислотные, б) щелочные свойства.
18. Написать и назвать пептиды, которые можно получить из следующих аминокислот: вал-цис-гис, лиз-лей-мет.
19. Написать формулы аминокислот, преобладающих в протаминах и гистонах.
20. Показать характер связи фосфорной кислоты и углевода с белком в соответствующих сложных белках.
21. Указать характер связи глобина с гемом.
22. Что такое нуклеиновые кислоты?
23. Какие белки входят в состав нуклеопротеинов? Каковы особенности их строения?
24. Какие виды ДНК, РНК вам известны? Каковы их функции в клетке?
25. Какова структура ДНК?
26. Каковы особенности структурной организации различных видов РНК?
27. Какие методы выделения и исследования нуклеиновых кислот вы знаете?
28. Написать моонуклеотид, входящий в состав ДНК, и схему его гидролиза.
29. Написать моонуклеотид, входящий в состав РНК, и схему его гидролиза.
30. Написать динуклеотид А-Т и комплементарный ему динуклеотид.
31. В чем заключается принцип комплементарности оснований? Какова его биологическая роль?

ТЕМА 3. ФЕРМЕНТЫ И ВИТАМИНЫ

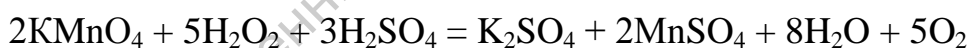
Ферменты – это белки, катализирующие химические реакции обмена веществ в живых организмах. По своей природе ферменты являются простыми или сложными белками. В последнем случае они состоят из белковой части (апофермента) и низкомолекулярного компонента (простетической группы, или кофермента). Ферментативное действие оказывает только фермент в целом: ни кофермент, ни белковая часть в отдельности не активны. Многие коферменты являются производными витаминов и входят в так называемый «активный центр» фермента, который определяет каталитическую активность фермента. Как белковые вещества ферменты термо-

лабильны и теряют активность при температурах, когда происходит денатурация белка, т.е. обычно при температуре выше 50 °С. Для каждого фермента существует оптимальная область значений рН, в которой он наиболее активен. Важным свойством ферментов является также специфичность действия, т.е. способность катализировать строго определенные реакции. Действие ферментов можно усиливать определенными веществами, называемыми активаторами. Противоположное (тормозящее) влияние оказывают на ферменты ингибиторы. Все известные ферменты делятся на шесть главных классов, названия которых отражают тип катализируемой реакции: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы. Внутри каждого класса существует деление на подклассы и подподклассы, уточняющие природу ферментативной реакции. Наряду с современной номенклатурой сохраняются и рабочие названия ферментов, давно вошедшие в употребление (тривиальные).

Работа 11. Определение активности каталазы по Баху и Зубковой

Фермент каталаза (H_2O_2 : H_2O_2 -оксидоредуктаза) разлагает перекись водорода по уравнению: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Каталаза содержится в большом количестве в эритроцитах.

Метод Баха и Зубковой основан на определении количества перекиси водорода, разложенного каталазой за 30 мин. Активность каталазы рассчитывается по разнице между контролем и опытом, где перекись водорода частично разложена каталазой. Определение перекиси водорода проводится титрованием марганцовокислым калием в кислой среде. Реакцию можно выразить уравнением:



Ход исследования

В две колбы наливают по 7 мл дистиллированной воды и по 1 мл крови (в разведении 1:1000). Содержимое одной колбы кипятят в течение 2 мин и охлаждают (контроль). Другую колбу (опыт) оставляют без изменений. В каждую колбу вносят по 2 мл 0,1 Н раствора перекиси водорода и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. После этого в обе колбы добавляют по 5 мл 10 %-ной серной кислоты и титруют содержимое 0,1 Н раствором KMnO_4 до появления розового окрашивания.

Расчет: Активность каталазы выражается каталазным числом – количеством перекиси водорода, которое разлагается 1 мл крови в течение 30 мин. На титрование контрольного раствора, где каталаза инактивирована кипячением и H_2O_2 сохранилась, идет больше перманганата калия, чем на титрование опытного раствора. Разность в результатах титрования соответствует количеству разложенной H_2O_2 . Грамм-эквивалент H_2O_2 равен

пировиноградная кислота (ПВК) и глутаминовая кислота.

Образовавшаяся ПВК при взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) в щелочной среде образует окрашенный гидразон. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.

Ход исследования

В две пронумерованные пробирки (1 – опытная проба; 2 – холостая проба) вносят по 0,5 мл субстратного раствора, содержащего аланин и α -кетоглутарат. Затем в пробирку 1 добавляют 0,1 мл сыворотки крови и обе пробирки инкубируют при 37 °С в течение 30 мин.

После этого в пробирку 1 вносят 0,5 мл раствора 2,4-ДНФГ, а в пробирку 2 – 0,5 мл раствора 2,4-ДНФГ и 0,1 мл сыворотки крови, перемешивают. Пробирки оставляют на 20 мин при комнатной температуре. Затем в обе пробирки наливают по 5 мл 0,4 Н раствора NaOH, тщательно перемешивают и оставляют на 10 мин.

Опытную пробу фотометрируют при 500 – 560 нм в кювете с толщиной светопоглощающего слоя 10 мм против холостой пробы. Расчет активности АлТ в сыворотке крови производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: из стандартного раствора ПВК (88 мкг/мл или 1 мкмоль/мл) готовят в соответствии с таблицей ряд разведений:

№№ пробирок	Объем стандартного раствора ПВК, мл	Вода, мл	Содержание ПВК		Экстинкция, отн. ед	Активность фермента АлТ, нМ/с·л
			мкг	мкмоль		
1	0,05	0,55	4,4	0,05		278
2	0,1	0,5	8,8	0,1		556
3	0,15	0,45	13,2	0,15		834
4	0,2	0,4	17,6	0,2		1112
5	0,25	0,35	22,0	0,25		1390

Затем берут 5 пронумерованных чистых пробирок, вносят в них по 0,5 мл субстратного раствора и по 0,1 мл растворов ПВК различных концентраций (см. таблицу). Далее с этими пробирками поступают так же, как с опытной пробой (см. ход исследования) – нагревают, добавляют растворы ДНФГ и NaOH, фотометрируют.

По результатам измерения строят график зависимости экстинкции (ось Y) от содержания ПВК в микромолях (ось X).

Расчет активности фермента: активность АлТ выражают в наномолях ПВК, образовавшейся в ходе реакции за 1 с в расчете на 1 л сыворотки крови (нмоль/с·л)

$$A = \frac{m \cdot 10^3}{t \cdot V \cdot 10^{-3}},$$

- где A – активность фермента в нмоль/с·л;
 m – количество ПВК, образовавшейся в ходе реакции, определяемое по калибровочному графику, мкмоль;
 10^3 – коэффициент для пересчета мкмоль в нмоль;
 t – время протекания реакции (30 мин);
 60 – коэффициент для пересчета минут в секунды;
 V – объем исследуемой сыворотки крови (0,1 мл);
 10^{-3} – коэффициент для пересчета миллилитров в литры.

Работа 14. Исследование некоторых свойств ферментов

1. Влияние реакции среды на активность амилазы. Влияние рН на активность ферментов связано с изменением состояния ионизации фермента, субстрата или комплекса фермента и субстрата.

Ход исследования

В три пробирки наливают по 1 мл буферного раствора с заданным рН (5,0; 7,0; 9,0) соответственно, по 1 мл 0,1 %-ного раствора крахмала и по 1 мл слюны, разведенной в 100 раз (источник амилазы). Перемешивают и тотчас замечают время. Пробирки ставят в термостат с температурой 37 °С. Через каждые 2 мин отбирают по 5 капель смеси из каждой пробирки в чистую пробирку и смешивают с каплей реактива Люголя до отрицательной реакции (желтый цвет) в одной из пробирок. Затем в каждую пробирку с оставшейся смесью добавляют по 1 капле реактива Люголя. Объяснить полученные результаты и оформить в виде таблицы.

Продолжительность реакции, мин	Окраска в контрольной реакции при рН		
	5	7	9
2	Фиолетовая	Фиолетовая	Синяя
4			
и т.д.			

2. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции. Поскольку ферменты имеют белковую природу, они являются термолабильными соединениями. Оптимальное для работы ферментов значение температуры лежит в физиологических пределах, а снижение или повышение температуры приводит к снижению скорости катализируемой реакции.

Ход исследования

Перед началом работы в отдельной пробирке прокипятить 2 мл раствора амилазы (1 мл слюны, разведенной в 100 раз). Затем в четыре пронумерованные пробирки вносят по 1 мл 0,1% раствора крахмала. В про-

бирки 1, 2 и 4 добавляют 0,5 мл раствора амилазы, в 3 – 0,5 мл прокипяченного раствора амилазы. Пробирку 1 помещают в стакан с холодной водой (или на ледяную баню), пробирки 2 и 3 – в стакан с теплой водой (38...40 °С), пробирку 4 – в кипящую водяную баню. Периодически через каждые 5 мин из пробирки 2 отбирают небольшое количество раствора пипеткой (2–3 капли), переносят на чистое предметное стекло и добавляют по капле реактива Люголя. Когда получена отрицательная проба (раствор не окрашивается в синий цвет), во все пробирки добавляют по одной капле реактива Люголя. Полученные данные представить в виде таблицы:

№ пробирки	Температура, при которой проводили реакцию, °С	Окраска в контрольной реакции при продолжительности реакции, мин		
		2	4	и т.д.
1	0 – +4	Фиолетовая	Фиолетовая	Синяя
2	38 – 40			
3	100 (амилаза), 38 – 40			
4	100			

Сделать вывод по результатам проведённой работы.

3. Влияние количества субстрата на скорость ферментативной реакции. При низких концентрациях субстрата наблюдается отчетливая линейная зависимость между его концентрацией и скоростью реакции. С увеличением количества субстрата скорость ферментативной реакции возрастает только до определенного значения: при избытке субстрата скорость реакции постоянна и называется максимальной скоростью (V_{\max}).

Ход исследования

В три пробирки вносят по 1 мл слюны, разведенной в 100 раз. Затем в первую пробирку добавляют 0,5 мл крахмала, во вторую – 1 мл, в третью – 5 мл. Замечают время и ставят в термостат с температурой 37 °С. Из каждой пробирки через каждые 2 мин отбирают небольшое количество раствора чистой пипеткой (2–3 капли), переносят на чистое предметное стекло и смешивают с каплей реактива Люголя. Если реакция во всех вариантах положительна (синий цвет), содержимое пробирок инкубируют еще две минуты и т.д. до отрицательной реакции (желтый цвет) в двух вариантах. Затем в каждую пробирку с оставшейся смесью добавляют по капле реактива Люголя. Полученные результаты объяснить и оформить в виде таблицы.

Продолжительность реакции, мин	Окраска в контрольной реакции при разном количестве субстрата		
	0,5 мл	1,0 мл	5,0 мл
2	Фиолетовая	Фиолетовая	Синяя
4			
и т.д.			

4. Влияние количества фермента на скорость ферментативной реакции. Начальная скорость ферментативной реакции при условии избытка субстрата пропорциональна концентрации фермента: $v=kE$, где v – скорость реакции, k – константа скорости реакции, E – концентрация фермента. При графическом отражении этой зависимости получается прямая линия, выходящая из начала координат.

Ход исследования

В три пробирки вносят по 1 мл крахмала. Затем в первую пробирку наливают 0,1 мл слюны, разведенной в 100 раз (источник амилазы), во вторую – 0,5 мл, в третью – 1 мл. Замечают время и ставят на водяную баню или в термостат с температурой 37 °С. Из каждой пробирки через каждые 2 мин отбирают небольшое количество раствора пипеткой (2–3 капли), переносят на чистое предметное стекло и смешивают с каплей реактива Люголя. Если реакция во всех вариантах положительна (синий цвет), содержимое пробирок инкубируют еще две минуты и т.д. до отрицательной реакции (желтый цвет) в двух вариантах. Затем в каждую пробирку с оставшейся смесью добавляют по капле реактива Люголя. Полученные результаты объяснить и оформить в виде таблицы.

Продолжительность реакции, мин	Окраска в контрольной реакции при разном количестве фермента		
	0,5 мл	1,0 мл	5,0 мл
2	Фиолетовая	Фиолетовая	Синяя
4			
и т.д.			

5. Активаторы и ингибиторы ферментов. Механизм действия активаторов и ингибиторов бывает очень сложным, но обычно сводится к их взаимодействию с функциональными группами активного центра или с аллостерическим центром. Ингибирование активности также может быть вызвано денатурацией молекулы белка-фермента.

Ход исследования

В три пробирки наливают по 1 мл слюны, разведенной в 100 раз. Затем в первую пробирку наливают 1 мл 2 %-ного раствора NaCl, во вторую

– 1 мл дистиллированной воды, в третью – 1 мл 2 %-ного раствора CuSO_4 . Содержимое пробирок хорошо перемешивают и добавляют по 1 мл крахмала. Замечают время и ставят на водяную баню или в термостат с температурой 37°C . Из каждой пробирки через каждые 2 мин отбирают небольшое количество раствора пипеткой (2–3 капли), переносят на чистое предметное стекло и смешивают с каплей реактива Люголя. Если реакция во всех вариантах положительна (синий цвет), содержимое пробирок инкубируют еще две минуты и т.д. до отрицательной реакции (желтый цвет) в одном из вариантов. Затем в каждую пробирку с оставшейся смесью добавляют по капле реактива Люголя. Полученные результаты объясняют и оформляют в виде таблицы.

4. Специфичность действия ферментов. Отличительным свойством ферментов служит их высокая специфичность. Она заключается в том, что каждый фермент действует на определенный субстрат или группу субстратов, сходных по своему строению. Степень специфичности у разных ферментов проявляется по-разному.

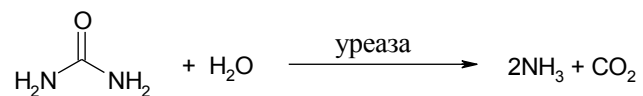
а) Специфичность действия амилазы и сахаразы. Источником амилазы служит слюна, разведенная в 5 раз. Источником сахаразы – дрожжевые клетки. Для получения препарата сахаразы дрожжи (0,5 г) растирают с окисью алюминия в ступке в течение 5 мин, затем добавляют 3 мл воды и перемешивают дрожжи с водой в течение 5 мин. При этом сахараза переходит в раствор. Полученный гомогенат фильтруют, а фильтрат используют как источник сахаразы.

Ход исследования

В первую и третью пробирки наливают по 1 мл 0,1 %-ного раствора крахмала, во вторую и четвертую – по 1 мл раствора сахаразы. Затем в первую и вторую пробирки прибавляют по 1 мл фильтрата, содержащего сахаразу, а в третью и четвертые пробирки – по 1 мл разведенной в 5 раз слюны, содержащей амилазу. Содержимое пробирок перемешивают и ставят в термостат с температурой 37°C на 10 мин. Затем из первой и третьей пробирки отбирают по 20 капель смеси и ставят реакцию Люголя. Во всех пробирках проводят реакцию Троммера (см. работу 14). Сделайте вывод о специфичности исследуемых ферментов. Результаты работы запишите в таблицу.

№ № пробирок	Субстрат	Фермент	Контрольные реакции	
			с J_2	Троммера
1				
2				
3				
4				

б) *Специфичность действия уреазы.* Субстратом для уреазы является мочеви́на, которая расщепляется с образованием аммиака и углекислого газа.



Тиомочевина отличается от мочевины только тем, что атом кислорода в ее молекуле заменен на атом серы. Но даже такое незначительное изменение в структуре субстрата приводит к тому, что фермент уже не оказывает действия на субстрат.

Ход исследования

Фермент уреазы в большом количестве содержится в семенах сои, поэтому в эксперименте используется 2 %-ная суспензия соевой муки.

В 2 пробирки наливают по 2 мл суспензии соевой муки, содержащей фермент, затем в первую – 2 мл мочевины, во вторую – 2 мл тиомочевины. В обе пробирки добавляют по 5 капель фенолфталеина. Содержимое пробирок перемешивают, и пробирки оставляют стоять 15 мин при комнатной температуре. Опишите и объясните полученные результаты. Сделайте выводы.

Работа 15. Витамины

Витамины – жизненно необходимые низкомолекулярные органические вещества, содержащиеся в пище. Для организма витамины требуются в небольших количествах. Они не являются источником энергии и не используются как структурный материал; их функция – регулировать обмен веществ. Многие витамины входят в состав ферментов, и потому недостаточное их поступление в организм нарушает те обменные реакции, которые связаны с деятельностью соответствующих ферментов.

Все витамины делятся на 2 группы: 1) витамины, растворимые в жирах; 2) витамины, растворимые в воде.

Часть 1. Водорастворимые витамины

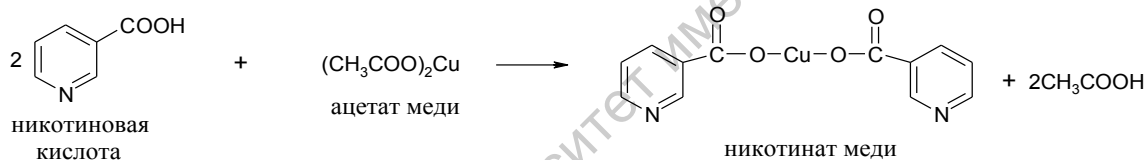
1. Реакция окисления тиамин в тиохром. Тиамин (витамин В₁) входит в состав тиаминпирофосфата (ТПФ), который участвует в качестве кофермента в реакциях декарбоксилирования α-кетокислот и в реакциях пентозного цикла. При недостатке тиамин в первую очередь нарушается углеводный обмен, увеличивается содержание пириновинной кислоты.

При окислении тиамин в щелочной среде железосинеродистым калием (калия феррицианид) образуется тиохром – желтый пигмент.

Тиохром извлекается из реакционной смеси изобутиловым (или бу-

ляются пузырьки водорода, раствор постепенно теряет желто-зеленую окраску. Также исчезает флуоресценция раствора. Кусочек цинка осторожно удаляют из пробирки стеклянной палочкой. Через 20–30 мин снова появляется желто-зеленая окраска, а затем и флуоресценция.

3. Качественная реакция на витамин РР. Витамин РР (ниацин, никотиновая кислота и никотинамид) является производным пиридинового кольца. В организме человека витамин РР находится в основном в связанном с белками состоянии. Никотинамид входит в состав коферментов НАД (никотинамидадениндинуклеотид) и НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат), входящих в состав ферментов дегидрогеназ и участвующих во многих окислительно-восстановительных реакциях. Недостаток витамина РР проявляется в виде дерматитов (пеллагра), расстройств деятельности желудочно-кишечного тракта и нервной системы. Качественное определение витамина РР основано на образовании плохо растворимого синего осадка медной соли никотиновой кислоты при нагревании с раствором ацетата меди.



Ход исследования

В пробирку набирают 5 – 7 капель 3 %-ного раствора витамина РР, затем приливают 7–10 капель 5 %-ного раствора ацетата меди. Выдерживают, не перемешивая, 2–3 мин, наблюдают выпадение осадка медной соли никотиновой кислоты.

4. Обнаружение никотинамидадениндинуклеотида (НАД) в дрожжах. НАД, одним из компонентов которого является никотинамид (витамин РР), встречается во многих органах и тканях человека, животных и растений, много его в микроорганизмах и грибах. Этот кофермент легко извлекается из дрожжей горячей водой (он термостабилен) и может быть обнаружен по образованию флуоресцирующего комплекса с ацетоном.

Ход исследования

В пробирку помещают небольшой кусочек дрожжей (~0,5 г), измельчают, добавляют 1/3 пробирки воды и кипятят 20–30 с, затем фильтруют. К 5–10 каплям полученного экстракта добавляют 3–5 капель ацетона и 1–2 капли 30 %-ного раствора едкого натра. Оставляют пробирку стоять 2 мин,

затем добавляют 1 каплю фенолфталеина и по каплям концентрированную соляную кислоту до обесцвечивания раствора. Пробирку помещают на 2 мин в кипящую водяную баню, после чего вынимают, охлаждают и просматривают во флуориметре. Ацетоновый комплекс НАД флуоресцирует синим цветом.

По каждому из проведенных экспериментов дать объяснение результатов и сделать соответствующие выводы.

5. Качественная реакция на витамин В₆. Группа витамина В₆: пиридоксол, пиридоксаль и пиридоксамин, являющиеся производными пиридина, носят общее название пиридоксин.



В организме каждое соединение может подвергнуться фосфорилированию при участии АТФ с образованием коферментов фосфопиридоксала и фосфопиридоксамина. Эти коферменты входят в состав ферментов, участвующих в белковом обмене (в реакциях трансаминирования, декарбоксилирования, десульфирования, дегидратирования аминокислот), в образовании витамина РР из триптофана и в некоторых других реакциях. Недостаток витамина В₆ в питании животных приводит к нарушению белкового обмена, у человека авитаминоз В₆ встречается редко.

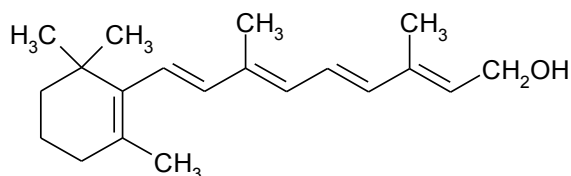
Качественное определение основано на реакции взаимодействия пиридоксина с хлорным железом, в результате которой образуется комплексная соль красного цвета (фенолят железа).

Ход исследования

На предметное стекло нанести стеклянной палочкой 1 каплю 1%-ного раствора витамина В₆ и 1 каплю 1%-ного раствора хлорного железа и перемешивают. Развивается красное окрашивание.

По каждому из проведенных экспериментов дать объяснение результатов и сделать соответствующие выводы.

6. Количественное определение витамина С с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (2,6-ДФИ) по методу Тильманса. Количественное определение аскорбиновой кислоты основано на ее способности окисляться 2,6-ДФИ в дегидроаскорбиновую кислоту.

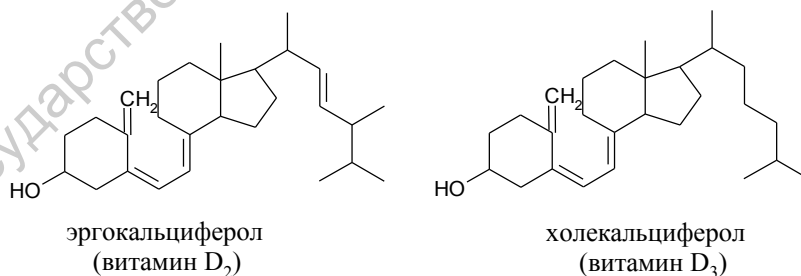


Ретинол является необходимым компонентом для нормальной функции сетчатой оболочки глаза: он связывается с опсином (красным пигментом сетчатой оболочки), образуя зрительный пурпур родопсин, необходимый для зрительной адаптации в темноте. Витамин А необходим для роста костей, нормальной репродуктивной функции, эмбрионального развития, для регуляции деления и дифференцировки эпителия (усиливает размножение эпителиальных клеток кожи, омолаживает клеточную популяцию, тормозит процессы кератинизации). Качественное определение основано на том, что серная кислота, обладающая водоотнимающим свойством, способствует превращению витамина А в окрашенный комплекс фиолетово-красного цвета. Реакция специфичностью не обладает.

Ход исследования

На сухое предметное стекло наносят 2 капли рыбьего жира в 4-5 каплях хлороформа и 1 каплю концентрированной серной кислоты. Наблюдают за появлением окраски (вначале проявляется голубое окрашивание, которое затем быстро переходит в буро-красное).

8. Качественная реакция на витамин Д. Витамин Д (антирахитический) представляет собой группу соединений, состоящую из феролов, приобретающих активность при ультрафиолетовом облучении (в том числе эргокальциферол и холекальциферол).



Повышает проницаемость клеточных и митохондриальных мембран кишечного эпителия, облегчая транспорт катионов кальция и других двухвалентных катионов, активирует вторичное всасывание фосфатов, увеличивает захват этих ионов костной тканью. При взаимодействии витамина Д с анилиновым реактивом при нагревании образуются окрашенные продукты реакции.

Ход исследования

В сухую пробирку вносят 3 – 5 капель рыбьего жира и 5 капель хло-

роформа (или раствор витамина в масле), перемешивают и добавляют 1 мл смеси анилина и концентрированной соляной кислоты (15:1). При нагревании желтая эмульсия приобретает сначала зеленую, а затем красную окраску. Через 1–2 мин эмульсия разделяется на два слоя, нижний из которых окрашен в интенсивный красный цвет.

Контрольные вопросы и упражнения по теме 3

1. Чем отличаются ферменты от неорганических катализаторов?
2. Каково химическое строение ферментов?
3. Какова связь между ферментами и витаминами?
4. По какому принципу классифицируют ферменты?
5. Что такое активный центр ферментов?
6. Каков механизм каталитического действия ферментов?
7. Как влияет температура и реакция среды на активность фермента?
8. Что такое активаторы и ингибиторы ферментов? Каков механизм их действия?
9. Написать формулы аминокислот, входящих в состав активных центров ферментов.
10. Написать формулы витаминов, участвующих в построении ферментов.
11. Написать формулы коферментов, входящих в состав оксидоредуктаз.
12. Какие виды специфичности действия ферментов вам известны?
13. Какие методы используются для определения активности ферментов?

ТЕМА 4. УГЛЕВОДЫ, ИХ СВОЙСТВА И ОБМЕН

Углеводы в живом организме играют важную роль и выполняют разнообразные функции. Наиболее важная из них – энергетическая, поскольку 50–60 % всей энергии, которая используется организмом для нормальной жизнедеятельности, приходится на углеводы. Основным источником энергии является окисление гликогена и глюкозы в тканях. Большую роль в энергетическом снабжении клетки играют коферменты (НАД⁺, ФАД и др.), в состав которых входит рибоза. Углеводы содержатся в больших количествах в продуктах растительного происхождения: крахмале, тростниковом сахаре (сахарозе). Суточная потребность человека в углеводах составляет 500–600 г.

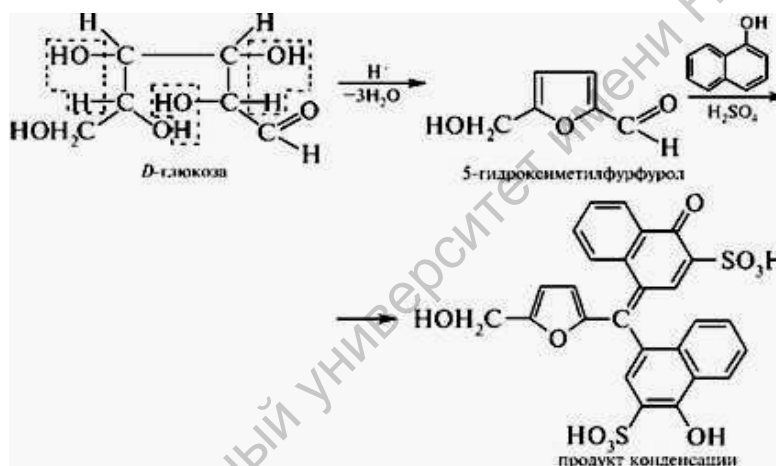
Нормальное содержание глюкозы в крови взрослого человека довольно постоянно – 60–100 мг %. Избыток глюкозы, поступающий в организм, откладывается в виде запаса гликогена в печени и мышцах. Источником образования гликогена в печени, помимо глюкозы, могут быть гликогенные аминокислоты, молочная кислота, глицерин. Важнейшая роль в регуляции углеводного обмена принадлежит гормонам: например, инсулин понижает содержание глюкозы в крови, а адреналин и глюкагон повышают его.

Работа 16. Химическое строение и свойства углеводов

Моносахариды и большинство дисахаридов обладают восстанавливающими свойствами, причем у моносахаридов они выражены сильнее, чем у дисахаридов. Эта реакция обусловлена наличием в молекуле моносахаридов и некоторых дисахаридов альдегидной группы, которая чрезвычайно легко окисляется, превращаясь в карбоксильную группу, и вызывает тем самым восстановление, например, металлов.

Наиболее распространенными реакциями, с помощью которых обнаруживают моносахариды, являются реакции Молиша, Троммера и реакция с фелинговой жидкостью.

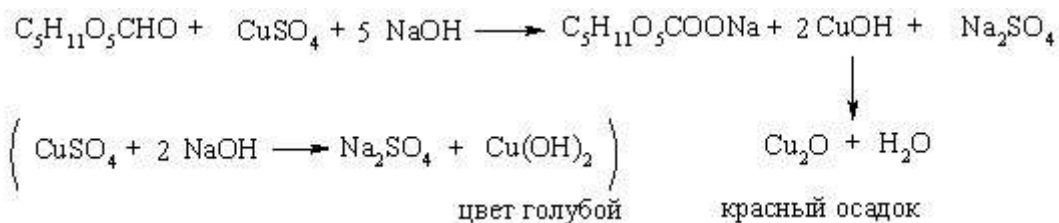
1. Реакция Молиша. Чувствительной реакцией на все углеводы является реакция с α -нафтолом (реакция Молиша). При действии серной кислоты на углеводы образуются фурфурол и оксиметилфурфурол, которые конденсируясь с α -нафтолом, образуют окрашенный продукт.



Ход исследования

В три пробирки наливают по 10 капель растворов крахмала, сахарозы и глюкозы соответственно, добавляют по 2 капли раствора α -нафтола, перемешивают. Осторожно подслаивают равный объем концентрированной серной кислоты. На границе раздела жидкостей появляется окрашенное кольцо.

2. Реакция Троммера основана на редуцирующей способности моносахаридов. В ходе реакции Троммера сернокислая медь реагирует со щелочью, образуя голубой гидроксид меди Cu^{2+} , который в присутствии сахаров, содержащих свободный полуацетальный гидроксил, восстанавливается в гидроксид меди. Последний при нагревании, теряя воду, переходит в оксид меди красного цвета.



Ход исследования

К 20 каплям раствора глюкозы добавляют равный объем 10 %-ного раствора NaOH и 1–2 капли 2 %-ного раствора CuSO₄. Содержимое пробирки нагревают до кипения. Появление желтого окрашивания, переходящего в красное, указывает на положительную реакцию Троммера.

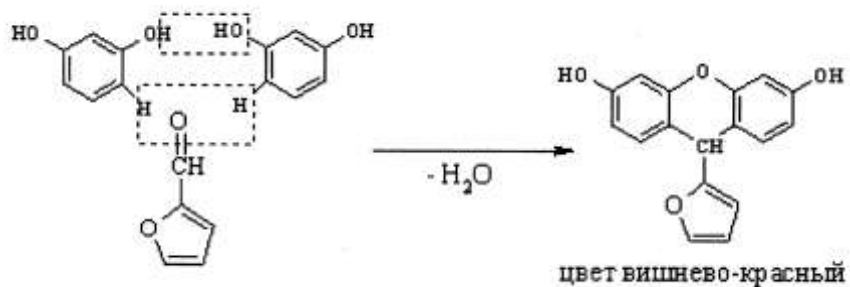
3. Реакция Фелинга, как и предыдущая, основана на редуцирующей способности сахаров. Реакция идет в присутствии сегнетовой соли, которая связывает избыток Cu(OH)₂, и, следовательно, препятствует образованию CuO черного цвета, маскирующей красный осадок Cu₂O.



Ход исследования

К 20 каплям раствора глюкозы прибавляют равный объем фелинговой жидкости и нагревают. Наблюдают образование красного осадка Cu₂O.

4. Реакция Селиванова. При нагревании фруктозы и других кетогексоз с соляной кислотой и резорцином раствор окрашивается в вишневый цвет.

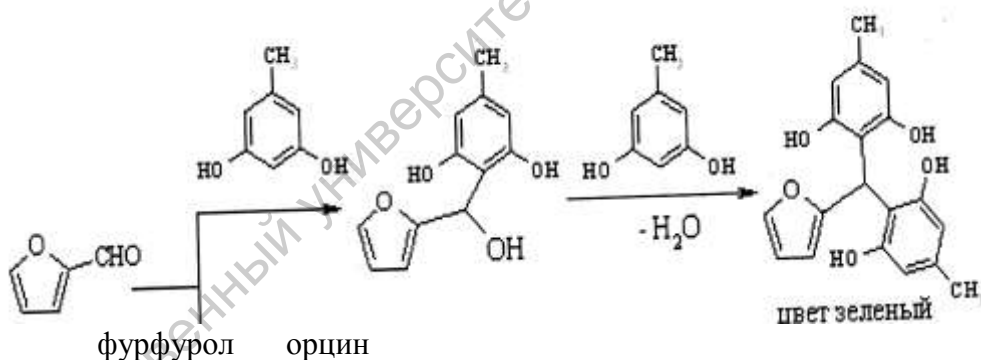


Получающаяся окраска зависит от реакции резорцина с оксиметил-фурфуролом, образующимся при нагревании кетоз с кислотой.

Ход исследования

К 20 каплям раствора фруктозы приливают такое же количество реактива Селиванова и нагревают до кипения. Наблюдают вишнево-красное окрашивание.

5. Реакция на пентозы. Пентозы при кипячении с концентрированной кислотой в присутствии орцина дают зеленое окрашивание.



Ход исследования

20 капель орцинового реактива нагревают до кипения и тотчас добавляют 5–6 капель арабинозы. Через несколько минут появляется зеленое окрашивание.

6. Дисахариды и полисахариды. Большинство дисахаридов (лактоза, мальтоза и др.) обладают восстанавливающими свойствами. В отличие от них сахароза, не содержащая свободного полуацетального гидроксидила, не дает реакции Троммера. Крахмал также не обладает редуцирующими свойствами, вследствие незначительных количеств свободных полуацетальных гидроксидов (концевых).

Ход исследования

В три пробирки наливают соответственно по 20 капель 1 %-ного раствора мальтозы, сахарозы и крахмала. Затем в каждую прибавляют по 20 капель 10 %-ного раствора NaOH и 2–3 капли 2 %-ного раствора CuSO₄ и нагревают до кипения. По каждому из проведенных экспериментов дайте объяснение результатов и сделайте соответствующие выводы. Напишите уравнения реакций.

Работа 17. Количественное определение глюкозы по Халтману

Для количественного определения глюкозы широко используются следующие методы: титрометрические, энзиматические и колориметрические. Последние наиболее распространены в биохимической практике в силу легкой воспроизводимости, точности и сравнительно высокой специфичности. Колориметрические методы основаны на определении степени интенсивности окраски соединений, образующихся при взаимодействии глюкозы с определенным веществом.

В основе метода Халтмана – колориметрическое определение интенсивности окраски раствора, образующегося при нагревании о-толуидина с глюкозой в присутствии уксусной кислоты. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации глюкозы.

Ход исследования

В три пробирки (одна из которых центрифужная) наливают по 1,8 мл 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). В первую (центрифужную) пробирку прибавляют 0,2 мл крови (опытная проба), во вторую – 0,2 мл стандартного раствора глюкозы (стандартная проба) и в третью – 0,2 мл воды (контрольная проба). Содержимое пробирок перемешивают, а опытную пробу (с кровью) центрифугируют в течение 10 мин при 2500–3000 об/мин. Центрифугат сливают в сухую пробирку. Затем из каждой пробы отбирают в другие пробирки по 0,5 мл раствора и добавляют во все пробирки по 4,5 мл о-толуидинового реактива. Пробирки закрывают фольгой вместо пробок, выдерживают в кипящей водяной бане 8 мин и тотчас же охлаждают. Окрашенный раствор колориметрируют против контроля на реактивы в кювете с рабочим ходом 10 мм, при длине волны 580–630 нм.

Расчет производят по формуле: $C_{\text{оп}} = C_{\text{ст}} \times E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}$,

где $C_{\text{оп}}$ – концентрация глюкозы в крови, мг %;

$C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора глюкозы, мг % (200 мг %);

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандартной пробы.

В норме содержание глюкозы в крови составляет 75–90 мг %.

Работа 18. Количественное определение глюкозы глюкозооксидазным методом

При окислении глюкозы кислородом воздуха под действием глюкозооксидазы (фермент из плесневых грибов) образуется эквимольное количество перекиси водорода. Под действием пероксидазы (фермент из корней хрена) перекись водорода окисляет некоторые ароматические амины (ортотолуидин, 4-аминоантипирин и др.) в окрашенные продукты. Интенсивность окраски последних пропорциональна концентрации глюкозы и измеряется фотометрически. Метод позволяет определить концентрацию глюкозы в пределах 3–22 мМ/л (0,5 – 4 г/л или 50 – 400 мг %).

Ход исследования

Для проведения исследования необходимы три пробирки (одна из них центрифужная). В первую пробирку (центрифужную) наливают 1,1 мл 0,9 %-ного раствора NaCl (физраствор), затем 0,1 мл исследуемой крови; 0,4 мл 5 %-ного раствора ZnSO₄; 0,4 мл 1,2 %-ного раствора NaOH, перемешивают. Через 10 мин центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость используют далее в качестве исследуемого раствора (опытная проба).

Во вторую пробирку наливают 1,9 мл физраствора и 0,1 мл 10 мМ раствора глюкозы, перемешивают. Полученный раствор используют в качестве стандартного раствора глюкозы (стандартная проба).

В третью пробирку вносят 1,9 мл физраствора и 0,1 мл воды (контрольная проба). Затем берут три чистых пробирки и вносят в них реагенты по схеме, представленной в таблице.

Реагенты	Опытная проба (пробирка 1)	Станд. проба (пробирка 2)	Контрольная проба (пробирка 3)
а) Энзимо-хромогенный реактив (содержит глюкозооксидазу, пероксидазу, о-толидин), мл	3	3	3
б) Исследуемый раствор, мл	1	-	-
в) Стандартный раствор глюкозы, мл	-	1	-
г) Физраствор + вода, мл	-	-	1

При использовании вместо о-толидина других хромогенов условия подготовки крови, инкубации и регистрации результатов изменяются. Пробы тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре. Через 10 мин опытную и стандартную пробы фотометрируют против контроля при 625–670 нм (красный светофильтр).

Расчет производить по формуле:

$$C_o / C_k = E_o / E_k, \text{ отсюда } C_o = \frac{E_o \times C_k}{E_k},$$

где C_o – концентрация глюкозы в исследуемой крови, мМ/л;
 E_o - оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотности;
 E_k - оптическая плотность стандартной пробы, ед. опт. плотности;
 C_k - концентрация глюкозы в стандартной пробе (10 мМ/л).

Работа 19. Анаэробное окисление углеводов

Распад углеводов в организме происходит двумя путями: дихотомическим и апотомическим. В первом случае гексоза (фруктозо-1,6-дифосфат) распадается на две фосфорилированные фосфотриозы с последующим образованием пировиноградной кислоты. Во втором (пентозный цикл) - идет образование пентоз, гептоз, тетроз, триоз. Дихотомический распад способствует освобождению и накоплению энергии. Апотомический используется в основном для процессов биосинтеза.

Дихотомический распад может происходить в анаэробных и аэробных условиях. При анаэробном превращении углеводов исходным продуктом может служить глюкоза (гликолиз) или гликоген (гликогенолиз) и заканчивается оно образованием молочной кислоты. При этом часть энергии накапливается в двух молекулах АТФ, другая часть выделяется в виде тепла. Гликолиз и гликогенолиз позволяют выполнять работу в условиях недостаточного снабжения кислородом.

В клетках микроорганизмов анаэробный распад глюкозы (брожение) заканчивается образованием различных продуктов: этилового спирта, уксусной, пропионовой, масляной и других кислот, ацетона и т.д.

1. Спиртовое брожение – процесс распада глюкозы под влиянием ферментов дрожжей с выделением углекислого газа и этилового спирта. До стадии образования пировиноградной кислоты (ПВК) спиртовое брожение протекает так же, как и гликолиз. Затем ПВК последовательно декарбоксилируется, и образовавшийся ацетальдегид восстанавливается в этиловый спирт.

Ход исследования

Растереть в ступке 0,5 г дрожжей, прибавляя в нее порциями 10 мл 5 %-ного раствора глюкозы. Полученную массу вносят в бродильную трубку так, чтобы заполнить закрытое колено и ставят в термостат при температуре 37°C на один час. По истечении времени вынуть трубку, отметить скопление газа в закрытом колене и проделать качественные реакции на углекислый газ и этиловый спирт.

Обнаружение углекислого газа: в бродильную трубку налить до краев 10%-ный раствор едкого натра. Закрывать отверстие трубки большим пальцем и несколько раз перевернуть ее, перемешивая содержимое. Углекислый газ поглощается щелочью, создавая вакуум, и палец присасывается к отверстию трубки.

Качественная реакция на этиловый спирт: отфильтровать 3–4 мл жидкости из бродильной трубки, добавить несколько капель реактива Люголя до появления желтой окраски и слегка нагреть. Выпадает желтоватый осадок йодоформа и ощущается его характерный запах.

2. Молочно-кислое брожение – в процессе прокисания молока под действием микроорганизмов происходит анаэробный распад углеводов молока. Одним из продуктов брожения является молочная кислота.

Ход исследования

К 5 каплям кислой сыворотки молока добавляют 10 капель фенолята железа (реактива Уффельмана). В присутствии молочной кислоты фиолетовая окраска жидкости переходит в желто-зеленую, обусловленную образованием молочнокислого железа.

Проанализировать результаты, полученные в эксперименте. Написать уравнения реакций.

Работа 20. Аэробное окисление углеводов

Аэробный дихотомический распад углеводов является главным источником энергии для клетки. При этом накапливается 38 молекул АТФ из расчета на молекулу глюкозы.

В аэробных условиях пировиноградная кислота (ПВК) в результате окислительного декарбоксилирования превращается в активный ацетат, который в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса) окисляется до углекислого газа и воды. Кислоты цикла Кребса можно обнаружить по их способности к флуоресценции.

1. Качественные реакции на ди- и трикарбоновые кислоты. Кислоты цикла Кребса можно легко обнаружить, так как они при взаимодействии с резорцином и серной кислотой образуют флуоресцирующие соединения.

Ход исследования

В первую пробирку вносят небольшое количество (на кончике скальпеля) цитрата натрия, а во вторую пробирку такое же количество янтарной кислоты. В обе пробирки добавляют по 10 капель воды. Затем в пробирки добавляют двойное по отношению к исходному объему количество концентрированной серной кислоты, резорцина (на кончике скальпеля) и пробирки нагревают при слабом кипении в течение 3 мин, держа их у

края пламени. Затем пробирки охлаждают, в каждую добавляют 1–2 мл воды (наслаивая) и наблюдают флуоресценцию.

2. Обнаружение янтарной и лимонной кислот в дрожжах.

Ход исследования

Небольшое количество дрожжей (~0,5 г) растирают в ступке с окисью алюминия. Затем добавляют 5 мл 20 % ТХУ и перемешивают в течение 5 мин. Экстракт, содержащий кислоты цитратного цикла, фильтруют и используют в ходе дальнейшей работы. К 1 мл фильтрата добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты, немного резорцина, затем поступают так же, как и в предыдущем опыте.

Сопоставьте полученные результаты. Сделайте соответствующие выводы. Напишите уравнения реакций.

Контрольные вопросы и упражнения по теме 4

1. Какая взаимосвязь существует между структурой и функцией углеводов?
2. Каковы основные пути использования глюкозы в организме?
3. В чем сходство и различие анаэробного и аэробного путей окисления глюкозы?
4. Какова энергетическая ценность различных путей окисления глюкозы?
5. В чем различие путей синтеза АТФ при гликолизе и аэробном окислении?
6. Какова роль витаминов в углеводном обмене?
7. Какова биологическая роль пентозного цикла?
8. Какие виды брожения Вам известны?
9. Как осуществляется синтез полисахаридов?
10. Написать реакции гликолиза, требующие затрат энергии, и реакции, связанные с синтезом АТФ.
11. Написать этапы и суммарную реакцию окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты.
12. Написать реакции цикла Кребса, приводящие к синтезу АТФ.
13. Написать окислительно-восстановительные реакции пентозного цикла.

ТЕМА 5. ЛИПИДЫ

Липиды – природные органические соединения, не растворимые в воде, но растворимые в органических растворителях. Как правило, липиды содержат в своем составе остатки жирных кислот, которые, взаимодействуя со спиртами, образуют сложные эфиры. В качестве спирта в их состав чаще всего входит глицерин, могут входить и другие спирты. Биологическая роль липидов многообразна, но в основном они выполняют структур-

ную функцию – построение мембран клетки и ее органелл. При окислении липидов освобождается большое количество энергии.

Работа 21. Химические свойства и обмен липидов

Наиболее биологически важными группами липидов являются фосфолипиды и стероиды. Фосфолипиды представляют собой сложные эфиры, в состав которых чаще всего входят глицерин, две жирные кислоты, фосфорная кислота и азотистые основания. Указанные вещества образуются при гидролизе фосфолипидов под действием липаз.

1. Обнаружение фосфорной кислоты в лецитине яичного желтка.

Ход исследования

В две пробирки наливают по 10 капель 1 %-ной суспензии сухого яичного желтка. В первую пробирку добавляют 3 капли 5 %-ного раствора панкреатина, содержащего липазу, во вторую – 3 капли воды (контроль). Пробирки помещают в термостат при температуре 37° С на 30 мин.

После инкубации в обе пробирки наливают по 10 капель молибденового реактива, нагревают до кипения и после охлаждения наблюдают желтое окрашивание.

Объяснить полученные результаты. Написать уравнение реакции.

2. Выделение холестерина из мозга.

Ход исследования

0,5 г мозга растирают в ступке с 2–3 частями гипса до гомогенной массы. Полученную массу распределяют тонким слоем на предметном стекле шпателем и высушивают над пламенем горелки на расстоянии 20 см.

Высушенный с гипсом мозг соскабливают скальпелем в сухую пробирку, заливают 2 мл хлороформа и закрывают пробкой. Экстрагируют 5 мин при комнатной температуре путем постоянного интенсивного встряхивания. Затем экстракт фильтруют через сухой фильтр в сухую пробирку и проводят качественные реакции на холестерин.

3. Качественные реакции на холестерин.

Ход исследования

Реакция Сальковского: к 10 каплям фильтрата добавляют 10 капель концентрированной серной кислоты и осторожно перемешивают. После расслоения жидкости верхний хлороформный слой окрашивается в красный цвет.

Реакция Либермана Бурхардта: в сухую пробирку наливают 20 капель хлороформного экстракта из мозга, добавляют 10 капель уксусного ангидрида и 2 капли концентрированной серной кислоты, хорошо перемешивают, осторожно встряхивая. Появляется окраска (красная, синяя), постепенно переходящая в зеленую. Написать уравнения реакций.

4. Гидролиз жиров молока липазой.

Под действием липазы нейтральные жиры расщепляются, реакция среды сдвигается в кислую сторону за счет образования жирных кислот, и розовая окраска фенолфталеина исчезает.

Ход исследования

В две пробирки наливают по 10 капель молока. В первую пробирку добавляют 5 капель панкреатина, содержащего липазу, во вторую – 5 капель воды. В обе пробирки приливают по 1 капле 1 %-ного раствора фенолфталеина и по каплям 1 %-ного раствора карбоната натрия до появления розовой окраски, одинаковой в обеих пробирках (нельзя приливать избыток раствора карбоната натрия). Пробирки помещают в термостат при температуре 37° С на 30 мин.

Описать и объяснить полученный результат. Написать уравнение реакции.

Контрольные вопросы и упражнения по теме 5

1. Какова современная классификация липидов?
2. Где и как происходит окисление жирных кислот?
3. Каковы особенности биосинтеза высших жирных кислот?
4. Какова роль коэнзима А в обмене жирных кислот?
5. В чем сходство и различие биосинтеза жиров и фосфолипидов?
6. Как осуществляется связь липидного и углеводного обмена?
7. Какова энергетическая ценность жиров?
8. Какие специфические функции выполняют липиды?
9. Написать формулы важнейших фосфолипидов.
10. Написать реакции окисления глицерина.
11. Напишите формулы триглицеридов: тристеарина, олеопальмитостеарина.
12. При мягкой щелочной обработке фосфолипидов разрываются сложноэфирные связи. Напишите реакцию и назовите продукт щелочного гидролиза 1-стеароил-2-пальмитоилфосфатидил-серина.
13. Написать реакцию образования сложного эфира холестерина и линолевой кислоты.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО КУРСУ БИОХИМИИ

1. Определение биохимии как науки, история развития, роль отечественных ученых в развитии биохимии. Роль биохимии в развитии биологии, медицины, народного хозяйства.
2. Физико-химические свойства белков. Свойства белка в растворах.
3. Методы выделения и очистки белков.
4. Растворимость, осаждение и фракционирование белков.
5. Белки как амфотерные полиэлектролиты. Изоэлектрическая точка, методы ее определения.
6. Аминокислоты как структурные компоненты белков, их классификация, строение, свойства.
7. Кислые и основные аминокислоты, входящие в состав белков, их характеристика.
8. Анализ аминокислотного состава белков.
9. Первичная структура белка, ее уникальность, методы определения.
10. Вторичная структура белка, ее разновидности.
11. Третичная и четвертичная структуры белка, методы их анализа.
12. Типы связей между аминокислотами в молекуле белка. Денатурация белка.
13. Хроматография и электрофорез как методы выделения и исследования белков.
14. Классификация белков. Биологическая роль белков.
15. Краткая характеристика простых белков.
16. Краткая характеристика сложных белков: липопротеины, гликопротеины: структуры и функции.
17. Краткая характеристика сложных белков: хромопротеины, фосфопротеины, нуклеопротеины: структуры и функции.
18. Ферменты как биокатализаторы. Общие свойства ферментов. Использование ферментов в практике.
19. Классификация и номенклатура ферментов.
20. Ферменты – простые и сложные белки. Коферменты, их строение и функции.
21. Структурно-функциональная организация ферментов. Фермент – субстратный комплекс- его роль в ферментативном процессе.
22. Механизм каталитического действия ферментов. Понятие о энергетическом барьере реакции, энергии активации, формировании фермент-субстратного комплекса.
23. Скорость ферментативной реакции. Методы определения активности ферментов. Единицы активности ферментов.
24. Влияние реакции среды и температуры на активность фермента.
25. Влияние концентрации субстрата и фермента на скорость реакции.
26. Специфичность действия ферментов. Виды специфичности.

27. Регуляция активности ферментов в клетке. Активаторы и ингибиторы ферментов.
28. ДНК, строение, свойства, функции.
29. Структура ДНК по Уотсону и Крику. Природа связей, имеющих в нуклеиновых кислотах.
30. РНК, виды, свойства, функции. и-РНК и т-РНК: структура, свойства, функции.
31. Углеводы: классификация, свойства, биологическая роль, отдельные представители.
32. Моносахариды и их производные, химическая структура, классификация, биологическая роль.
33. Дисахариды: мальтоза, сахароза, лактоза. Структура, биологическая роль.
34. Особенности строения полисахаридов растительного происхождения: крахмал, целлюлоза, гликоген, пектин.
35. Особенности строения полисахаридов и функции полисахаридов: хитин, гликоген, гепарин.
36. Липиды: классификация, свойства, биологическая роль.
37. Фосфолипиды: строение, свойства, биологическая роль.
38. Гликолипиды: строение, свойства, биологическая роль.
39. Витамины: классификация, строение, свойства, биологическая роль, участие витаминов в построении кофермента.
40. Тиамин: строение, свойства, роль в обмене веществ.
41. Никотинамид: свойства, роль в биологическом окислении.
42. Рибофлавин: строение, свойства, участие в метаболических процессах.
43. Понятие о биологическом окислении. Аккумуляция энергии в клетке – высокоэнергетические фосфаты.
44. Роль АТФ в процессе жизнедеятельности. Пути образования и использования АТФ в клетке.
45. Гликолиз, химизм, энергетический баланс, значение.
46. Необратимые реакции гликолиза.
47. Гликогенолиз, химические реакции, биологическая роль.
48. Брожение: виды брожения, химизм, биологическая роль.
49. Химическое превращение углеводов, липидов и белков в пищеварительном тракте.
50. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты. Цепь химических реакций, биологическая роль.
51. Цикл Кребса, цепь химических реакций, биологическая роль процесса.
52. Общий путь катаболизма веществ в клетке. Реакция образования сукцинил-коэнзима А в цикле Кребса, механизм, роль в процессе.

53. Энергетический баланс аэробного окисления углеводов. Связь углеводного обмена с обменом липидов.
54. Пентозофосфатный путь окисления углеводов, реакции окислительной стадии процесса, биологическая роль.
55. Аэробное окисление углеводов, химические реакции, биологическая роль. Энергетический баланс аэробного окисления углеводов
56. Катаболизм глицерина по пути к углеводам и липидам. Энергетический баланс окисления жиров.
57. Бета-окисление жирных кислот, локализация процесса, химизм, биологическая роль.
58. Пути образования и превращения активного ацетата (Коэнзима А).
59. Дезаминирование аминокислот, химизм, биологическая роль. Судьба безазотистого остатка аминокислот.
60. Переаминирование аминокислот, биологическая роль. Трансаминазы.
61. Декарбоксилирование аминокислот, биогенные амины, их биологическая роль и пути дезактивации.
62. Пути образования и обезвреживания аммиака. Связь белкового обмена с обменом углеводов и липидов.
63. Синтез аминокислот. Заменяемые и незаменимые аминокислоты.
64. Основные этапы биосинтеза белка. Локализация, особенности протекания у про- и эукариотических организмов.
65. Процесс репликации ДНК, стадии процесса, ферменты, значение для биосинтеза белка.
66. Процесс транскрипции ДНК, стадии процесса, ферменты, значение для биосинтеза белка.
67. Процесс трансляции, стадии процесса, ферменты, значение для клетки.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основной

1. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимова. М., 1986.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М., 1982 – 2002.
3. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. М., 2003.
4. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М., 1985 – 2000.
5. Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология. М., 2003.

Дополнительный

1. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М., 2002.
2. Биохимия: Учеб. для вузов / Под ред. Е.С. Северина. М., 2003 – 2013
3. Ленинджер А. Биохимия. М., 1976.
3. Филиппович Ю.Б. Биохимия белка и нуклеиновых кислот. М, 1976.
4. Землянхун А.А. Практикум по биохимии. Воронеж, 1975.

Приложение 1

Правила работы в химической лаборатории.

Работать в лаборатории разрешается только в халатах. Длинные волосы должны быть подобраны. Все процедуры при выполнении работы можно проводить только на своем рабочем месте или в вытяжном шкафу.

При возникновении каких-либо неясностей работу прекратить и обратиться за разъяснением к преподавателю или лаборанту.

В процессе работы все флаконы с реактивами должны находиться на отведенных для них местах. Необходимо соблюдать большую осторожность при работе с кислотами и щелочами.

Запрещается отмеривать реактивы путем всасывания ртом в пипетку.

Запрещается закрывать пальцем отверстия пробирок и колб при взбалтывании растворов.

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.

Пролитый реактив немедленно удалить со стола.

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.

Запрещается принимать пищу в лаборатории.

Запрещается трогать и включать приборы без разрешения преподавателя.

После окончания работы показать преподавателю результаты эксперимента и, получив разрешение на окончание работы, привести в порядок свое рабочее место.

Использованную посуду освободить от содержимого, сполоснуть и сдать лаборанту.

Правила работы на фотоэлектроколориметре (ФЭК)

Общие замечания. Определение концентрации веществ в растворе с помощью фотометрических приборов основано на способности растворов поглощать часть световой энергии при прохождении через них пучка света. Явление поглощения света раствором количественно описывает закон Ламберта–Бера, согласно которому

$$\lg \frac{J_0}{J} = \varepsilon \cdot C \cdot L,$$

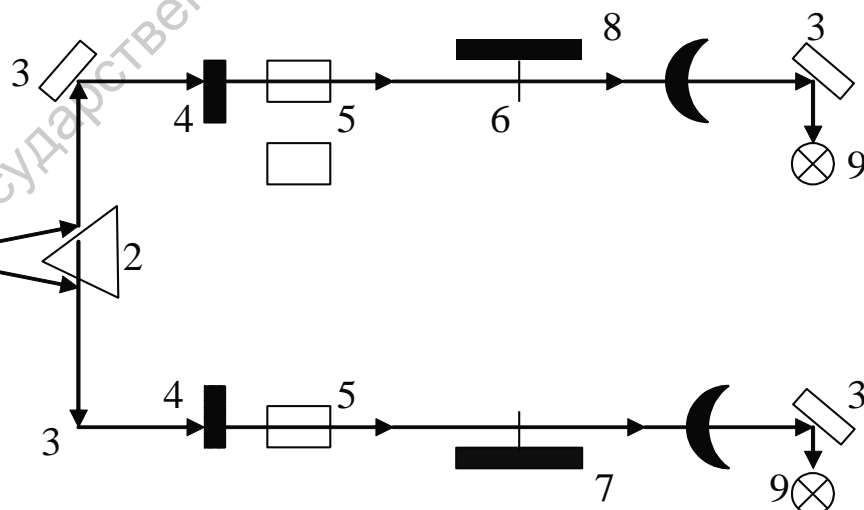
где J_0 – начальная интенсивность света, прошедшего через раствор; J – интенсивность света; ε – молярный коэффициент экстинкции, зависящий от природы вещества, поглощающего свет, и длины волны поглощаемого света; C – концентрация растворенного вещества, моль/л; L – толщина слоя раствора, см.

Величина, стоящая в левой части уравнения, характеризует степень ослабления интенсивности света при прохождении его через раствор. Эту величину называют оптической плотностью раствора (D) или его экстинкцией (E).

Упрощенная формула записи закона Ламберта–Бера ($E=C \cdot L$) показывает, что экстинкция прямо пропорциональна толщине слоя и концентрации раствора; это обстоятельство и используется в биохимии при фотометрическом определении концентрации веществ с помощью специальных приборов – фотоэлектроколориметров (ФЭК) и спектрофотометров, позволяющих определять экстинкции растворов.

Принципы работы фотоэлектроколориметра. 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 (L).

Принципиальная оптическая схема ФЭКа представлена на рисунке.



Пучок света от источника (1) падает на призму (2), которая делит его на два потока: левый и правый. Левый световой поток является компенсационным, правый – измерительным. Отразившись от зеркала (3) и пройдя через светофильтры (4), пучки света идут параллельно, проходя через кюветы (5), и попадают на фотоэлементы (9), со-

единенные с гальванометром. В правый поток света помещают опытную (с раствором) или контрольную (с растворителем) кюветы; в левом потоке всегда находится только кювета с растворителем. При равенстве световых потоков, падающих на фотоэлемент, стрелка гальванометра находится в среднем (нулевом) положении. Если правый световой пучок проходит через кювету с окрашенным или светорассеивающим раствором, то его интенсивность ослабляется, по сравнению с левым пучком, проходящим через кювету с растворителем. Выравнивание интенсивностей световых потоков проводят с помощью специальных барабанов – левого (7) и правого (8), при вращении которых световые потоки регулируются с помощью раздвижных диафрагм (6).

При проведении колориметрических или нефелометрических измерений в правый световой поток сначала помещают кювету с исследуемым раствором и уравнивают потоки вращением левого барабана, а затем – кювету с контролем, и уравнивают потоки правым барабаном.

Промышленность выпускает ряд моделей колориметров, имеющих весьма сходные конструкции и различающихся только особенностями фотоэлементов и количеством светофильтров. Ниже приведено краткое описание прибора КФК-2.

Колориметр фотоэлектрический концентрационный (КФК-2) предназначен для количественного определения веществ в окрашенных растворах по их оптической плотности или коэффициенту светопропускания в диапазоне волн 315-980 нм. КФК-2 состоит из оптического блока (передняя часть прибора), где находятся осветитель, светофильтр, оптика, кюветное отделение, фотометрическое устройство и регистрирующий прибор, и блока питания (задняя часть), где расположены стабилизатор напряжения с выпрямителем и силовой трансформатор.

Источником света в колориметре служит галогенная лампа. Приемниками излучения являются фотоэлемент Ф-26 для работы в диапазоне волн 315-540 нм и фотодиод ФД-24К для работы в специальном диапазоне 590-980 нм.

Световой поток лампы с помощью специальных устройств конденсируется, усиливается и проходит через светофильтр, кювету с исследуемым раствором и падает на приемник излучения. При этом световое излучение преобразуется в электрические сигналы, которые подаются на измерительный прибор. Показания микроамперметра пропорциональны световому потоку, проходящему через исследуемый раствор.

Использование конкретного цветового светофильтра позволяет пропускать через раствор лучи определенной длины волны, поглощение которых характерно для исследуемого вещества. В КФК-2 имеется набор из 11 светофильтров. Приведенная ниже таблица позволяет ориентировочно выбрать светофильтр для измерения оптической плотности некоторых окрашенных растворов.

Окраска исследуемого раствора	Цвет необходимого светофильтра	Длина волны пропускаемого света, нм
Желтая	Синий	420–450
Оранжевая	Синий	430–460
Красная	Зеленый	460–500
Пурпурная	Зеленый	490–530
Синяя	Оранжевый	590
Сине-зеленая	Красный	600–650
Голубая	Красный	750
Сине-фиолетовая	Красный	750

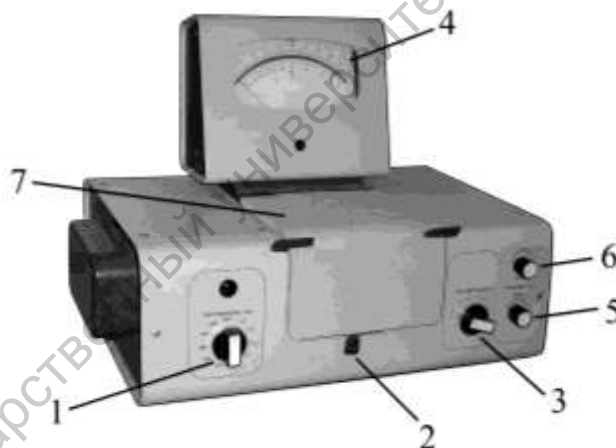
Обычно эффективную длину волны и цвет светофильтра указывают в используемом методе.

Известно, что чем толще слой жидкости, через который проходит луч света, тем больше поглощение светового пучка и тем выше показание оптической плотности исследуемого раствора. К колориметру прилагается набор кювет, отличающихся расстоянием между рабочими гранями, через которые проходит световой поток. Это расстояние (в мм) указано на одной из рабочих граней. На боковой стенке кювет имеется метка, до которой необходимо наливать жидкость. При работе с летучими растворами кюветы закрывают специальными крышками.

Набор кювет обеспечивает возможность работы с толщиной слоя исследуемого раствора от 1 до 50 мм. Подбор кювет осуществляется таким образом, чтобы оптическая плотность исследуемого раствора не была ниже величины 0,15 и выше 0,7. Предварительный выбор кювет производится визуально, соответственно интенсивности и окраски раствора. Если раствор интенсивно окрашен, следует пользоваться кюветами с малой рабочей длиной. В случае слабоокрашенных растворов рекомендуется работать с кюветами большей рабочей длины.

Все кюветы перед каждым измерением тщательно промывать и высушивать. Не касаться рабочих стенок кюветы пальцами!

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.

Правила работы на КФК-2

I. 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. Закрывать 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 дном (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.

Примечание. При работе на КФК-2 необходимо соблюдать следующие правила:

1. До включения прибора в сеть проверить заземление.
2. Не оставлять прибор включенным без надобности.
3. Следить за чистотой прибора, не проливать реактивы.
4. Не хлопнуть крышкой кюветного отделения.
5. Особенно осторожно обращаться с кюветами – не царапать, протирать только мягкой и чистой тряпочкой (марлей).
6. При смене светофильтра работу продолжать не ранее чем через 5 минут.
7. При переключении светофильтров и замене кювет в кюветодержателе микроамперметр должен быть выключен (рукоятки 5 и 6 должны находиться в крайнем левом положении!).

Реактивы и оборудование

Работа 1. Сравнение строения и аминокислотного состава различных белков с помощью цветных реакций

Материалы исследования и реактивы

1. Альбумин яичный, 1 %-ный раствор.
2. Желатина, 1 %-ный раствор.
3. Нингидрин, 1 %-ный раствор.
4. Фруктоза, 10 %-ный раствор.
5. NaOH, 1 %-ный раствор.
6. CuSO₄, 2 %-ный раствор.
7. HNO₃, концентрированная.
8. H₂SO₄, концентрированная.
9. Свинец уксуснокислый, 5 %-ный раствор.
10. α- нафтол, 10 %-ный спиртовой раствор.
11. Натрий гипобромит, 2 %-ный раствор: 2 г брома (0,65 мл) растворяют в 100 мл 5 %-ного раствора едкого натрия при охлаждении льдом (относительная плотность брома 3,12). Растворение производят под тягой.

Работа 2. Разделение аминокислот хроматографическим методом

Материалы исследования и реактивы

1. Лизин, 0,2 %-ный раствор.
2. Тирозин, 0,1 %-ный раствор.
3. Лейцин, 0,1 %-ный раствор.
4. Смесь двух из этих аминокислот в соотношении 1:1 по объему.
5. Нингидрин, 0,5 %-ный раствор в ацетоне.
6. Органический растворитель: в делительной воронке смешивают н-бутанол, уксусную кислоту и воду (в соотношении 4:1:5). После встряхивания (5 мин) и последующего расслоения в работе используют верхний слой.

Оборудование

1. Чашки Петри.
2. Диски из фильтровальной бумаги диаметром 14 см.
3. Пастеровские пипетки.
4. Сушильный шкаф.
5. Карандаши графитовые.
6. Кюветы для проявления (18×24 см).

Работа 3. Осаждение белков

Материалы исследования и реактивы

1. Альбумин яичный, 1 %-ный раствор.
2. Сульфат аммония, насыщенный раствор.
3. Сульфат аммония кристаллический.
4. Трихлоруксусная кислота, 10 %-ный раствор.
5. Свинец уксуснокислый, 5 %-ный раствор.

6. Уксусная кислота, 1 и 10 %-ные растворы.
7. Спирт этиловый.
8. HNO_3 , концентрированная.
9. Медь сернокислая, 2 %-ный раствор.
10. Натр едкий, 10 %-ный раствор.

Оборудование

1. Стеклянные палочки.
2. Фильтры бумажные.
3. Воронки диаметром 3–5 см.
4. Пробирки обыкновенные.
5. Пипетки глазные.
6. Спиртовки

Работа 4. Определение изоэлектрической точки белка

Материалы исследования и реактивы

1. Желатина, 1 %-ный раствор.
2. Спирт этиловый.
3. Буферные системы с рН: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0.

Оборудование

1. Пипетки на 1 мл.
2. Бюретки на 50 мл.
3. Штативы с пробирками.
4. Карандаш по стеклу.

Работа 5. Количественное определение белка по Горналу

Материалы исследования и реактивы

1. Сыворотка крови.
2. Стандартный раствор белка (альбумина): 1 г кристаллического белка растворяют в 50 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия. Полученный стандартный раствор белка содержит 20 мг белка в 1 мл.
3. Биуретовый реактив: 0,5 г медного купороса и 0,6 г виннокислого калия-натрия (сегнетовой соли) растворяют в 50 мл воды в мерной колбе на 100 мл при энергичном помешивании. К раствору постепенно добавляют 30 мл 10 %-ного раствора NaOH (свободного от углекислого натрия), затем 0,2 г йодистого калия для предотвращения самопроизвольного восстановления. Раствор доводят водой до 100 мл и хранят в холодильнике в плотно закрытой полиэтиленовой или парафинированной посуде.

Оборудование

1. Фотоэлектроколориметр (кюветы с рабочей длиной 10 мм).
2. Пипетки на 1; 2; 5 мл.
3. Миллиметровая бумага.
4. Штативы с пробирками.
5. Карандаши по стеклу.

Работа 6. Обессоливание белкового раствора при помощи гель-фильтрации на колон-

ке с Сефадексом G-25

Материалы исследования и реактивы

1. Хромат калия, 0,2%-ный раствор.
2. Голубой декстран, 0,2%-ный раствор.
3. Альбумин, 0,5%-ный раствор в 5%-ном растворе сульфата аммония.
4. Свинец уксуснокислый, 5 %-ный раствор.
5. Биуретовый реактив (см. раб. 5).

Оборудование

1. Хроматографическая колонка с Сефадексом G-25.
2. Стаканы на 50 мл (2 шт).
3. Градуированные пробирки (эппендорфы; 10 шт).
4. Штатив для эппендорфов;
5. Автоматические пипетки переменного объема на 200 мкл.

Работа 7. Сложные белки

Материалы исследования и реактивы

1. Дрожжи.
2. Молоко свежее.
3. Слюна неразведенная.
4. α -нафтол, 1 % ный раствор в 70 %-ном растворе спирта.
5. Фенолфталеин, 1 %-ный спиртовой раствор.
6. Молибденовый реактив: 7,5 г молибдата аммония растворяют в 50 мл воды и прибавляют 50 мл концентрированной азотной кислоты. Полное растворение наступает после добавления HNO_3 .
7. Уксусная кислота, концентрированная.
8. NaOH , 30 %-ный и 10 %-ный растворы.
9. CuSO_4 , 2 %-ный раствор.
10. H_2SO_4 , 5 %-ный раствор и концентрированная.
11. HNO_3 , концентрированная.
12. Серебро азотнокислое, 1 %-ный раствор.

Оборудование

1. Фильтры бумажные.
2. Стекланные палочки.
3. Воронки диаметром 3–5 см.
4. Водяная баня.
5. Колбочки конические на 50–100 мл с обратным холодильником.
6. Карандаши по стеклу.

Работа 8. Количественное определение ДНК методом Шмидта – Таннгаузера

Материалы исследования и реактивы

1. Печень крысы.
2. Натр едкий, 4 %-ный раствор.
3. Натрий хлорид, насыщенный раствор в 20 %-ном растворе CH_3COOH .
4. Спирт этиловый.
5. Трихлоруксусная кислота, 5 %-ный раствор.
6. Индикаторная бумага, универсальная.
7. Натр едкий, 30 %-ный раствор.
8. Дистиллированная вода.
9. Аммоний, молибденовокислый, 5 %-ный раствор в серной кислоте: 50 г мо-

либдата аммония растворяют в 500 мл дистиллированной воды и, если нужно, фильтруют. Раствор переносят в мерную колбу на 1 л. В другой колбе к 250 мл дистиллированной воды приливают 150 мл концентрированной кислоты. Второй раствор соединяют с первым и после охлаждения доливают водой до метки.

10. Гидрохинон, 1 %-ный раствор.
11. Карбонат – сульфитная смесь: отдельно растворяют 40 г безводного карбоната натрия в 200 мл воды и 7,5 г сульфита натрия ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) в 50 мл воды. Первый сливают со вторым и получают карбонат-сульфитную смесь.
12. Стандартный раствор однозамещённого фосфата калия: на аналитических весах отвешивают 0,4393 г химически чистого KH_2PO_4 и растворяют его в дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл. Перед употреблением основной раствор фосфорнокислого однозамещённого калия разводят в мерной колбе в 200 раз. В 1 мл рабочего стандартного раствора содержится 0,005 мг фосфора (5 мкг).

Оборудование

1. Водяная баня.
2. Стеклянные палочки.
3. Пипетки на 1; 2; 10 мл.
4. Баня со льдом.
5. Центрифужные пробирки.
6. Центрифуга.
7. Колбы Кьельдаля на 25–50 мл.
8. Конические колбы на 50 мл.
9. Мерные колбы на 25 мл.
10. Пробирки градуированные на 10 мл.
11. ФЭК (кюветы с рабочей длиной 10 мл).
12. Весы центрифужные.
13. Миллиметровая бумага.
14. Карандаши по стеклу.

Работа 9. Количественное определение ДНК методом Дише

Материалы исследования и реактивы

1. Селезенка крысы.
2. Натрий хлорид, 5 %-ный раствор, содержащий 0,3 % трехзамещенного цитрата натрия.
3. Кварцевый песок.
4. Натр едкий, 0,4 %-ный раствор.
5. Стандартный раствор ДНК в 0,05 Н растворе NaOH (800 мкг/мл).
6. Реактив Дише: 1 г дифениламина растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и добавляют 2,75 мл концентрированной серной кислоты. Реактив готовят перед употреблением.
7. Хлорная кислота, 10 %-ный раствор.

Оборудование

1. Ступки с пестиками.
2. Центрифужные пробирки.
3. Центрифуга.
4. Весы центрифужные.
5. Химические стаканы на 100 мл.

6. Палочки деревянные.
7. Пробирки обыкновенные.
8. Пробки корковые.
9. Водяная баня.
10. ФЭК (кюветы с рабочей длиной 10 мл).
11. Миллиметровая бумага.
12. Карандаши по стеклу.

Работа 10. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот по А.С. Спирину

Материалы исследования и реактивы

1. ДН-протеид, выделенный из селезенки (щелочной раствор, см. работу №8).
2. Хлорная кислота, 5 %-ный и 10 %-ный растворы.

Оборудование

1. Пробки с обратным холодильником.
2. Градуированные пробирки.
3. Фильтры бумажные.
4. Стеклянные палочки.
5. Водяная баня, $t = 100^{\circ}\text{C}$.
6. Спектрофотометр.
7. Воронки диаметром 3–5 см.

Работа 11. Определение активности каталазы по Баху и Зубковой

Материалы исследования и реактивы

1. Кровь.
2. Перекись водорода, 0,1 Н раствор.
3. Перманганат калия, 0,1 Н раствор.
4. Серная кислота, 10 %-ный раствор.

Оборудование

1. Колба коническая на 50 мл.
2. Бюретки на 25 мл.
3. Пипетки на 1; 10 мл.
4. Водяная баня.

Работа 12. Определение активности амилазы по Вольгемуту

Материалы исследования и реактивы

1. Слюна.
2. Крахмал, 0,1 %-ный раствор.
3. Раствор Люголя: 1 %-ный раствор йода в 2 %-ном растворе йодида калия.

Оборудование

1. Штатив с пробирками.
2. Карандаш по стеклу.
3. Термостат, $t = 37^{\circ}\text{C}$.
4. Пипетки на 1; 2 мл.
5. Бюретка на 50 мл.

Работа 13. Определение активности аланинтрансминазы (АлТ) методом

Райтмана–Френкеля

Материалы исследования и реактивы

1. Сыворотка (плазма) крови.
2. Фосфатный буфер, 0,1 М, рН 7,4.
3. Субстратный раствор: 29 мг α -кетоглутаровой кислоты и 1,78 г DL-аланина растворяют в минимальном количестве 1 М раствора NaOH, затем доводят до 100 мл 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,4. Хранят в холодильнике.
4. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина: 20 мг 2,4-ДНФГ растворяют в 200 мл 1 М раствора HCl при нагревании, доводят до 100 мл 1М раствором HCl. На следующий день фильтруют.
5. NaOH, 0,4 М раствор, свободный от карбонатов.
6. Стандартный раствор пировиноградной кислоты (ПВК): 11 мг пирувата натрия растворяют в 10 мл воды, доводят водой до 100 мл. Хранят в холодильнике.

Оборудование

1. Штатив с пробирками.
2. Пипетки на 0,1; 1; 5 мл.
3. Термостат ($t = 37^\circ\text{C}$).
5. ФЭК.

Работа 14. Исследование некоторых свойств ферментов

Материалы исследования и реактивы

1. Слюна.
2. CuSO_4 , 2 %-ный раствор.
3. Крахмал, 0,1 %-ный раствор.
4. Буферные растворы рН 5,0; 7,0; 9,0.
5. NaOH, 10 %-ный раствор.
6. Суспензия соевой муки, 2 %-ная.
7. Фенолфталеин, 1 %-ный спиртовой раствор.
8. NaCl, 2 %-ный раствор.
9. Реактив Люголя (см. работу №11).
10. Дрожжи.
11. Al_2O_3 , порошок.
12. Мочевина, 1 % -ный раствор.
13. Тиомочевина, 1 %-ный раствор.
14. Сахароза, 1 %-ный раствор.

Оборудование

1. Штатив с пробирками.
2. Предметные стекла.
3. Ступки с пестиками.
4. Карандаши по стеклу.
5. Пипетки на 1 мл.
6. Термостат ($t=37^\circ\text{C}$)
7. Стеклянные палочки.
8. Воронки диаметром 5 см.
9. Фильтры бумажные.

10. Бюретки на 50 мл.

Работа 15. Витамины

Материалы исследования и реактивы

1. Тиамин, 5 %-ный раствор.
2. NaOH, 10 %-ный и 30 %-ный растворы.
3. Рибофлавин, 0,025 %-ный раствор.
4. Цинк металлический.
5. Ацетон.
6. Калий железосинеродистый, 5 %-ный раствор.
7. Изобутиловый спирт.
8. HCl концентрированная и 2 %-ный раствор.
9. Дрожжи.
10. Никотиновая кислота, 3%-ный раствор.
11. Медь уксуснокислая, 5 %-ный раствор.
12. Фенолфталеин, 1 %-ный спиртовой раствор.
13. 2,6-дихлорфенол индофенол, 0,001 Н раствор.
14. Высушенная ягода шиповника.
15. Рыбий жир.
16. Серная кислота, концентрированная.
17. Смесь анилина и концентрированной соляной кислоты (15:1).

Оборудование

1. Штатив с пробирками.
2. Пипетки на 1; 5 мл.
3. Ступка с пестиком.
4. Воронка.
5. Колбы мерные на 50 мл.
6. Бюретки на 50 мл.
7. Баня водяная.
8. Флуориметр.
9. Стеклянные палочки.
10. Фильтры бумажные.
11. Колбочки конические (или стаканы) для титрования.
12. Спиртовки.

Работа 16. Химическое строение и свойства углеводов

Материал исследования и реактивы

1. Глюкоза, 1 %-ный раствор.
2. NaOH, 10 %-ный раствор.
3. CuSO₄, 2 %-ный раствор
4. Фелингова жидкость.

Готовят два раствора: А – 20,0 г CuSO₄·5H₂O в 500 мл воды; В – 100 г сегнетовой соли и 75 г гидроксида натрия в 500 мл воды. Растворы хранят раздельно. Перед употреблением смешивают равные объемы первого и второго раствора.

5. Серная кислота, концентрированная.
6. Фруктоза, 1 %-ный раствор
7. Реактив Селиванова: 0,05 г резорцина растворяют в 100 мл раствора соляной

- кислоты (1:1).
8. Арабиноза, 1 %-ный раствор.
 9. Орциновый реактив: 0,2 г орцина растворяют в 100 мл 30 %-ного раствора соляной кислоты и добавляют хлорид железа (0,1 г). Раствор хранят в темной склянке.
 10. Сахароза, 1 %-ный раствор.
 11. α -нафтол, 1 %-ный раствор в 70 %-ном растворе этилового спирта.

Работа 17. Количественное определение глюкозы по Халтману

Материал исследования и реактивы

1. Трихлоруксусная кислота, 10 %-ный раствор
2. Кровь.
3. Глюкоза, 200 мг %-ный раствор.
4. о-толуидиновый реактив: 0,15 г тиомочевины растворяют в 94 мл ледяной уксусной кислоты и смешивают с 6 мл свежеперегнанного о-толуидина. Реактив хранится несколько месяцев.

Оборудование

1. Штатив с сухими пробирками.
2. Центрифуга с центрифужными пробирками.
3. Фольга.
4. Водяная баня.
5. Пипетки на 1; 5 мл.
6. ФЭК.
7. Кюветы на 10 мм.

Работа 18. Количественное определение глюкозы глюкозооксидазным методом

Материал исследования и реактивы

1. Кровь или другой исследуемый материал.
2. NaCl, 0,9 %-ный раствор.
3. ZnSO₄, 5 %-ный раствор.
4. NaOH, 1,2 %-ный раствор.
5. Стандартный раствор глюкозы, 180 мг %-ный (10 ммоль в 0,2 %-ном растворе бензойной кислоты).
6. Энзимо-хромогенный реактив: в мерную колбу на 200 мл налить 60–80 мл 0,2 М ацетатного (фосфатного) буферного раствора, pH 4,8, добавить 4 мг глюкозооксидазы (200 – 500 Е) и 2 мг пероксидазы (100 – 200 Е), растворить перемешиванием. Внести 2 мл 1 %-ного спиртового раствора о-толидина и довести объем до метки буфером. Хранить в холодильнике в темной склянке.

Оборудование

1. Штатив с пробирками.
2. Пипетки на 0,1; 1; 5 мл.
3. Мерные колбы на 100 и 200 мл.
4. ФЭК.

Работа 19. Анаэробное окисление углеводов

Материал исследования и реактивы

1. Дрожжи.

2. Сыворотка молока.
3. Глюкоза, 5 %-ный раствор.
4. NaOH, 10 %-ный раствор.
5. Реактив Люголя (см. работу №11).
6. Реактив Уфельмана: готовят 2 %-ный раствор фенола и 5 %-ный раствор хлорного железа. Перед употреблением реактивы смешивают: на 1 мл раствора фенола 1 каплю раствора железа.

Оборудование

1. Бродильные трубки.
2. Ступки с пестиками.
3. Термостат ($t=37^{\circ}\text{C}$).
4. Фильтры бумажные.
5. Воронки диаметром 3–5 см.

Работа 20. Аэробное окисление углеводов

Материал исследования и реактивы.

1. Дрожжи.
2. Трихлоруксусная кислота, 20 %-ный раствор.
3. Резорцин кристаллический.
4. Янтарная кислота, кристаллическая.
5. Окись алюминия.
6. H_2SO_4 концентрированная.
7. Цитрат натрия, кристаллический.

Оборудование

1. Штативы с пробирками.
2. Скальпели.
3. Флуориметр.
4. Карандаш по стеклу.
5. Фильтры бумажные.
6. Воронки с диаметром 3–5 см.
7. Ступки с пестиками.

Работа 21. Химические свойства и обмен липидов

Материал исследования и реактивы

1. Сухой яичный желток, 1 %-ная суспензия: желтки куриных яиц размазывают на стекле и высушивают на воздухе при комнатной температуре. Сухой желток соскабливают скальпелем и растирают в ступке до порошка.
2. Молибденовый реактив (см. работу № 6).
3. Уксусный ангидрид.
4. Молоко.
5. Панкреатин, 5 %-ный раствор.
6. Мозг животных.
7. Гипс.
8. Хлороформ.
9. Серная кислота, концентрированная.
10. Фенолфталеин, 1 %-ный спиртовой раствор.

11. Карбонат натрия, 1 %-ный раствор.

Оборудование

1. Штативы с сухими пробирками.
2. Ступка с пестиками.
3. Шпатели.
4. Пробки для пробирок.
5. Термостат.
6. Предметные стекла.
7. Скальпели.
8. Фильтры бумажные.
9. Воронки с диаметром 3–5 см.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Тема 1. БЕЛКИ И ИХ СВОЙСТВА	4
<i>Работа 1.</i> Сравнение строения и аминокислотного состава различных белков с помощью цветных реакций.....	4
<i>Работа 2.</i> Разделение аминокислот хроматографическим методом.....	10
<i>Работа 3.</i> Осаждение белков.....	11
<i>Работа 4.</i> Определение изоэлектрической точки белка.....	14
<i>Работа 5.</i> Количественное определение белка по Горналу.....	15
<i>Работа 6.</i> Обессоливание белкового раствора при помощи гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-25.....	16
<i>Работа 7.</i> Сложные белки.....	19
Тема 2. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ	22
<i>Работа 8.</i> Количественное определение ДНК методом Шмидта–Таннгаузера.....	22
<i>Работа 9.</i> Количественное определение ДНК методом Дише	25
<i>Работа 10.</i> Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот по А.С. Спирину.....	26
Контрольные вопросы и упражнения по темам 1 и 2.....	27
Тема 3. ФЕРМЕНТЫ И ВИТАМИНЫ.....	28
<i>Работа 11.</i> Определение активности каталазы по Баху и Зубковой.....	29
<i>Работа 12.</i> Определение активности амилазы по Вольгемуту.....	30
<i>Работа 13.</i> Определение активности аланинтрансаминазы (АлТ) методом Райтмана–Френкеля.....	30
<i>Работа 14.</i> Исследование некоторых свойств ферментов.....	32
<i>Работа 15.</i> Витамины.....	36
Контрольные вопросы и упражнения по теме 3.....	42
Тема 4. УГЛЕВОДЫ, ИХ СВОЙСТВА И ОБМЕН.....	42
<i>Работа 16.</i> Химическое строение и свойства углеводов.....	43
<i>Работа 17.</i> Количественное определение глюкозы по Халтману.....	46
<i>Работа 18.</i> Количественное определение глюкозы глюкозооксидазным методом.....	47
<i>Работа 19.</i> Анаэробное окисление углеводов.....	48
<i>Работа 20.</i> Аэробное окисление углеводов.....	49
Контрольные вопросы и упражнения по теме 4.....	50
Тема 5. ЛИПИДЫ.....	50
<i>Работа 21.</i> Химические свойства и обмен липидов.....	51
Контрольные вопросы и упражнения по теме 5.....	52
Контрольные вопросы по курсу биохимии.....	53
Список рекомендуемой литературы.....	55
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	56
Приложение 1. Правила работы в химической лаборатории.....	57
Приложение 2. Правила работы на фотоэлектроколориметре.....	58
Приложение 3. Реактивы и оборудование.....	62

Учебное издание

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
К МАЛОМУ ПРАКТИКУМУ ПО БИОХИМИИ

Издание пятое,
переработанное и дополненное

Под редакцией заслуженного деятеля науки РФ,
доктора биологических наук, профессора *В.В. Игнатова*

Составители:

С.А. Коннова, А.А. Галицкая, Е.В. Плешакова, Е.С. Тучина

Технический редактор Л.В. Агальцова
Корректор Ю.И. Астахова
Оригинал макет подготовила С.А. Коннова

Подписано в печать 07.04.2005.
Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Усл.печ.л. 3,49(3,75). Уч.-изд.л. 3,3. Тираж 300 экз. Заказ

Издательство Саратовского университета.
410012, Саратов, Астраханская, 83.
Типография Издательства Саратовского университета.
410012, Саратов, Астраханская, 83.