

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Институт Естественных наук
Кафедра «Химии»

Утверждено на заседании кафедры
«Химии»
«9» февраля 2021 г, протокол № 7

Заведующий кафедрой



В.А. Алферов

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине (модулю)
«Химия биологически активных веществ»

основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программы бакалавриата

по направлению подготовки
19.03.01 Биотехнология
с направленностью (профилем)
Экобиотехнология

Форма(ы) обучения: очная, заочная


Идентификационный номер образовательной программы: 190301-01-21

Тула 2021 год

ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЯ
методических указаний к лабораторным работам дисциплины (модуля)

Разработчик(и):

Карасева Татьяна Александровна, доцент, к.х.н.
(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)


(подпись)

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел I. БЕЛКИ	4
Цветные реакции на аминокислоты. Анализ аминокислотного состава белков	5
Работа 1. Сравнение аминокислотного состава различных белков	5
Работа 2. Хроматографический метод определения аминокислот	14
Физико-химические свойства белков	18
Работа 3. Определение изоэлектрической точки казеина	18
Работа 4. Определение температуры коагуляции яичного белка	20
Работа 5. Осаждение белков. Денатурация белков	22
Очистка и разделение белков	24
Работа 6. Обессоливание раствора яичного альбумина методом диализа	24
Работа 7. Отделение белка от низкомолекулярных примесей методом геле- фильтрации	26
Работа 8. Разделение смеси белков методом электрофореза в полиакриламидном геле	30
8.1. Нативный ПААГ электрофорез	30
8.2. SDS ПААГ электрофорез	35
Количественное определение белков	37
Работа 9. Количественное определение белка биуретовым методом	37
Работа 10. Количественное определение белка по методу Лоури	40
Работа 11. Количественное определение белка по методу Брэдфорд	42
Тесты и задачи для самоконтроля	44
Раздел II. УГЛЕВОДЫ	47
Работа 12. Качественные реакции на углеводы	47
Работа 13. Энзиматический метод количественного определения глюкозы	54
Работа 14. Колориметрический метод определения сахаров	57
Тесты и задачи для самоконтроля	60
Раздел III. ЛИПИДЫ	62
Работа 15. Качественные реакции на липиды	62
Работа 16. Сравнение ненасыщенности жиров	66
Работа 17. Определение йодного числа	67
Работа 18. Определение состава биосурфактантов методом тонкослойной хроматографии	69
Тесты и задачи для самоконтроля	72
Раздел IV. ФЕРМЕНТЫ	75
Механизм действия ферментов	75
Работа 19. Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов	75
Работа 20. Качественные пробы на присутствие ферментов	78
Специфичность действия ферментов	84
Работа 21. Абсолютная специфичность уреазы	84
Работа 22. Специфичность действия амилазы и сахаразы	85
Зависимость скорости ферментативной реакции от различных факторов	86

Работа 23. Влияние температуры на активность ферментов	86
Работа 24. Влияние ингибиторов на активность ферментов	88
Работа 25. Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной активности	90
Работа 26. Влияние pH на активность амилазы слюны	92
Работа 27. Количественное определение активности грибных амилаз	94
Тесты и задачи для самоконтроля	96
Раздел V. ВИТАМИНЫ	99
Работа 28. Качественные реакции на витамины	99
Работа 29. Количественное определение аскорбиновой кислоты	107
Работа 30. Количественное определение содержания рутина в чае	109
Тесты и задачи для самоконтроля	112
Раздел VI. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ	114
Работа 31. Количественное определение пировиноградной кислоты в мышцах	114
Работа 32. Обнаружение действия животной липазы и определение её активности	117
Работа 33. Экспресс-определение глюкозы в крови с помощью глюкометра	121
Работа 34. Определение общего холестерина в сыворотке крови с помощью набора Ольвекс Диагностикум	125
Работа 35. Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей и качественное определение продуктов из гидролиза	128
Тесты и задачи для самоконтроля	130
Приложение 1. Важнейшие аминокислоты	132
Приложение 2. Моносахариды	133
Приложение 3. Дисахариды и полисахариды	134
Библиографический список	135

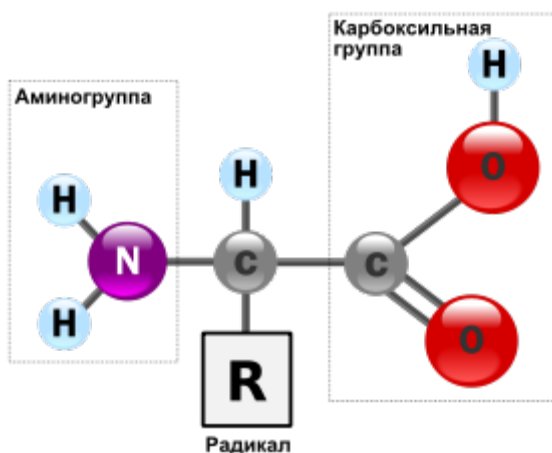
Раздел I. БЕЛКИ

Белки или *протеины* (что в переводе с греческого означает «первые» или «важнейшие») – это биологические полимеры, состоящие из α -аминокислот, соединенных пептидными связями.

Белки делятся на простые и сложные. *Простые белки* состоят только из аминокислотных остатков. *Сложные белки* помимо пептидных цепей содержат в своем составе простетические группы – небелковые вещества, различные по химическому строению (нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, ионы металлов и др.).

Белки, количественно преобладают над всеми макромолекулами, присутствующими в живой клетке, и составляют более половины сухого веса большинства организмов.

Разнообразие существующих в природе белков определяется аминокислотным составом. Все 20 аминокислот, встречающихся в белках, характеризуются общей структурной особенностью – наличием карбоксильной и аминогруппы, связанных с одним и тем же атомом углерода. Различаются же аминокислоты боковыми цепями (R-группами). Общая формула α -аминокислот:



Белки имеют несколько уровней структурной организации: первичный, вторичный, третичный и в некоторых случаях четвертичный.

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА АМИНОКИСЛОТЫ. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ

Работа 1. Сравнение аминокислотного состава различных белков

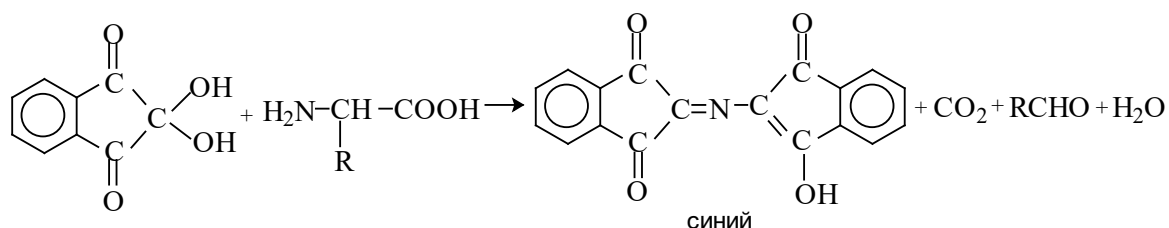
Цель работы – Сравнить питательную ценность различных белков.

Качественные реакции (или цветные реакции) используются в клинико-биохимических лабораториях, фармацевтической практике и биохимических исследованиях для обнаружения присутствия белка и аминокислот в биологических средах, качественного анализа белковых лекарственных средств. Многие качественные реакции положены в основу методов количественного определения белков и аминокислот. Состав аминокислот определяет не только свойства белка, но и его питательную ценность. Биологически полноценными считаются белки, содержащие все незаменимые аминокислоты.

Материал исследования: раствор яичного белка, раствор желатина (коллаген).

Опыт 1. *Нингидриновая реакция*

При взаимодействии α -аминокислот с трикетоним – нингидрином происходит одновременное окислительное дезаминирование и декарбоксилирование с образованием альдегида и окрашенного продукта конденсации.



Реактивы и оборудование: 1% раствор нингидрина в 95% ацетоне, водяная баня, пробирки, пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 0,5 мл растворов белков, добавляют по 2 капли раствора нингидрина, содержимое пробирок тщательно перемешивают и нагревают на водяной бане.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

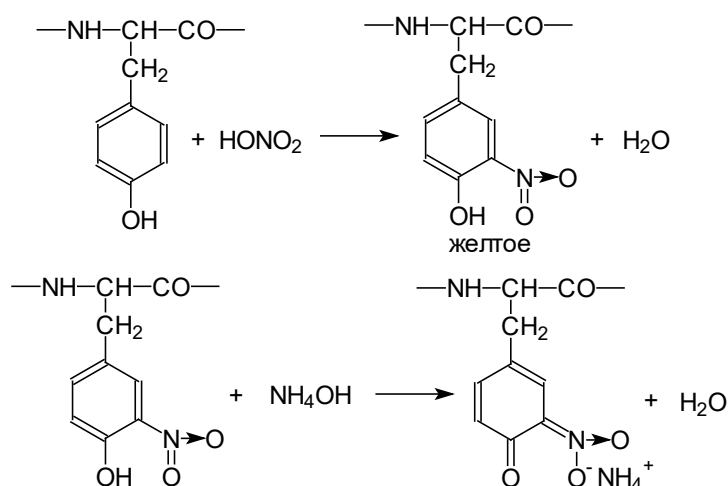
Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о наличии аминокислот в анализируемых белках.

Опыт 2. Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)

Ксантопротеиновая реакция происходит только при наличии ароматических аминокислот в белках (фенилаланина, триптофана, тирозина), поэтому она является качественной на *ароматические аминокислоты*.

При нагревании с концентрированной азотной кислотой белки дают желтое окрашивание за счет образования нитропроизводных ароматических аминокислот. При подщелачивании раствором аммиака желтое окрашивание переходит в оранжевое (образуются аммонийные соли хиноидной структуры):



Реактивы и оборудование: концентрированная азотная кислота; концентрированный раствор аммиака; кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В разные пробирки наливают по 0,5 мл растворов белков. Во все пробирки добавляют по 5 капель концентрированной азотной кислоты и нагревают на водяной бане. Пробирки охлаждают, к охлажденным растворам осторожно прибавляют по 10 капель концентрированного раствора аммиака.

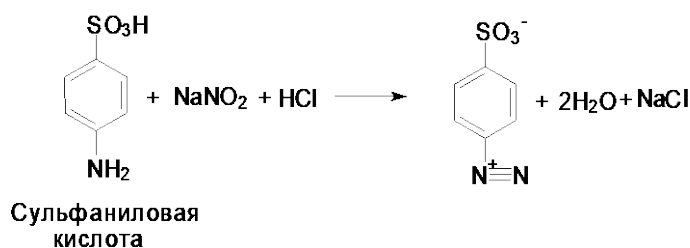
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора			
	Исходный раствор	После добавления HNO_3	После нагревания	После нейтрализации

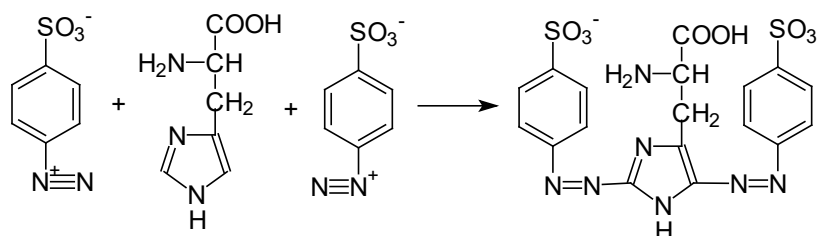
По результатам опыта делают вывод о содержании ароматических аминокислот в анализируемых белках.

Опыт 3. Реакция на гистидин и тирозин (Паули)

При взаимодействии сульфаниловой кислоты в кислой среде с нитритом натрия происходит реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоновая кислота.



При реакции последней с гистидином или тирозином образуется соединение вишнево-красного цвета:



Реактивы и оборудование: 1% раствор сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты, 5% раствор нитрита натрия, 10% раствор карбоната натрия, пробирки, пипетки.

Ход работы.

1. В двух пробирках смешивают по 1 мл раствора сульфаниловой кислоты и по 2 мл раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают. Затем в каждую пробирку добавляют 2 мл анализируемых растворов белков и по 6 мл раствора соды.
2. Описанная выше реакция может быть выполнена иным путем. К небольшому количеству диазореактива (соотношение компонентов см. выше) добав-

ляют несколько капель 10% раствора соды и осторожно по стенке пробирки настилают раствор белка. На границе двух жидкостей появляется окрашенное кольцо.

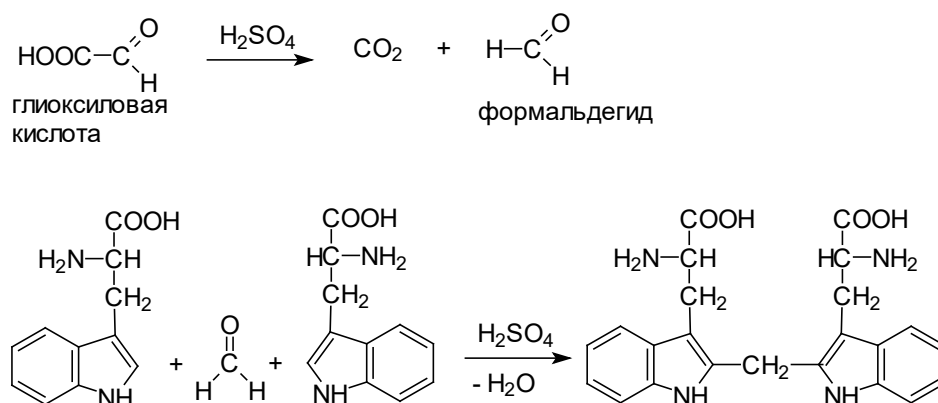
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

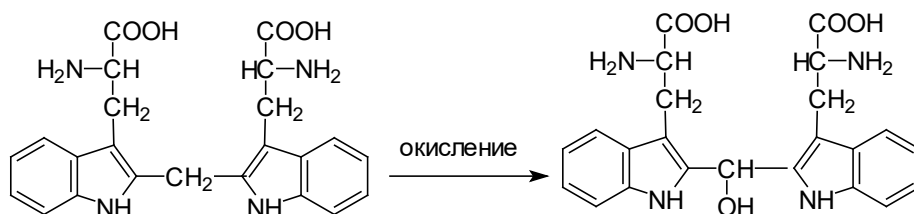
По результатам опыта делают вывод о содержании гистидина или тирозина в анализируемых белках.

Опыт 4. Реакция на триптофан (Гопкинса-Коле или Адамкевича)

Триптофан в этой реакции конденсируется с формальдегидом, выделяющимся из глиоксиловой кислоты под действием концентрированной серной кислоты.



Продукт конденсации окисляется, в присутствии минеральных кислот образуются окрашенные в сине-фиолетовый цвет соли (явление галохромии).



Реактивы и оборудование: раствор глиоксиловой кислоты¹; 0,04М раствор сульфата меди (II); концентрированная серная кислота, концентрированная соляная кислота, ледяная уксусная кислота, кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В пробирки наливают 0,5 мл растворов исследуемых белков. В каждую пробирку добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты, 1 мл раствора глиоксиловой кислоты и по 10 капель раствора сульфата меди (II), перемешивают, и нагревают до растворения образующегося осадка. После охлаждения пробирки приливают 1 мл концентрированной соляной кислоты. Осторожно приливают небольшими порциями по стенкам пробирок 2-3 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы жидкости не смешались. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре.

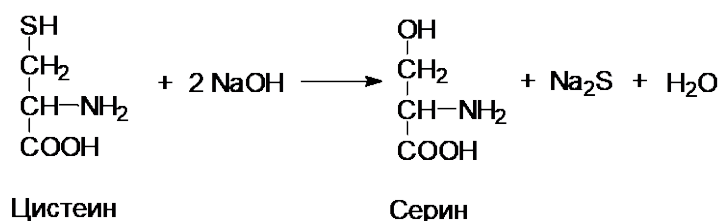
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

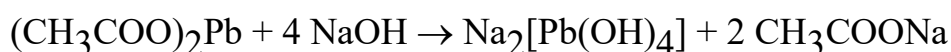
По результатам опыта делают вывод о содержании триптофана в анализируемых белках.

Опыт 5. Реакция на «слабосвязанную серу» в белке (реакция Фоля)

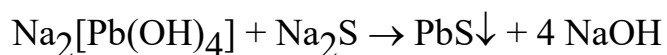
При кипячении цистеина и цистина в щелочной среде от них легко отщепляется сера в виде сероводорода, образующего сульфид натрия:



Образование сульфид-ионов можно обнаружить с помощью ионов свинца, образующих нерастворимый сульфид PbS черного цвета:



¹ Глиоксиловая кислота. К 2 г магния в порошке, слегка увлажненного, приливают при охлаждении 50 мл заранее охлажденного при 0°C насыщенного раствора сукцелиновой кислоты. Осадок оксалата магния отфильтровывают и промывают небольшой порцией воды. Фильтрат подкисляют уксусной кислотой и доводят водой до объема 200 мл. Раствор сохраняют в холодильнике.



Реактивы и оборудование: 30% раствор гидроксида натрия; 1% раствор ацетата свинца; кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 0,5 мл растворов анализируемых белков. В каждую пробирку добавляют по 5 капель раствора гидроксида натрия и по 2-3 капли раствора ацетата свинца и нагревают пробирки на кипящей водяной бане.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании цистеина в анализируемых белках.

Опыт 6. Реакция на триптофан (Вуазена)

Белки, содержащие триптофан, дают в кислой среде в присутствии нитрита натрия и формальдегида сине-фиолетовое окрашивание. В этой реакции триптофан взаимодействует с формальдегидом с образованием продукта конденсации (бис-2-триптофанилметана), который окисляется нитритом натрия до бис-2-триптофанилкарбинола. Последний в присутствии минеральных кислот образует соли сине-фиолетового цвета.

Реактивы и оборудование: 2,5% раствор формальдегида; соляная кислота (плотность не менее 1,175); 0,5% раствор нитрита натрия; пробирки; пипетки.

Ход работы. К 2 мл раствора исследуемого белка добавляют 1 каплю 2,5% раствора формальдегида. К полученной смеси, тщательно перемешивая, добавляют осторожно по каплям 6 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку в ванночке со льдом. Через 10 минут добавляют, перемешивая, 10 капель 0,5% раствора нитрита натрия. Появляется сине-фиолетовая окраска.

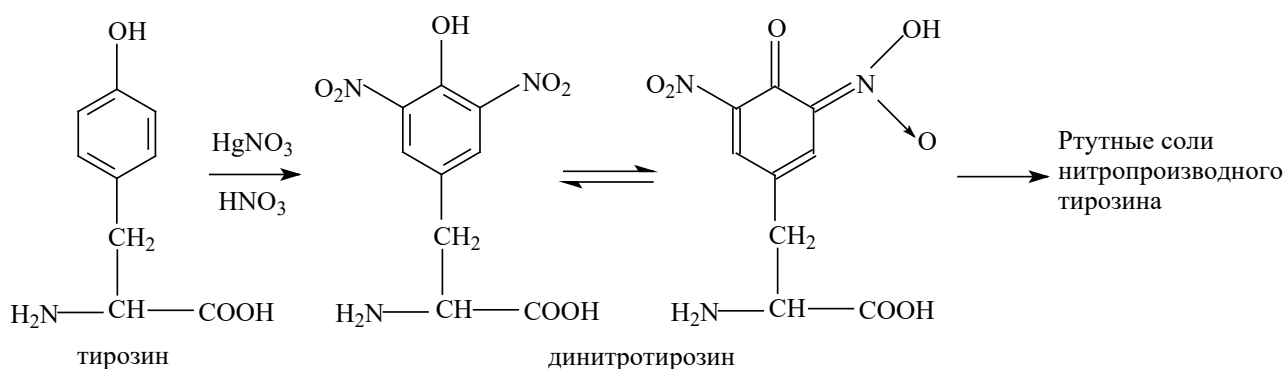
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании триптофана в анализируемых белках.

Опыт 7. Реакция на тирозин (Миллона)

При нагревании растворов большинства белков с реактивом Миллона (состоящим из смеси азотнокислых и азотистых солей ртути, растворенных в концентрированной азотной кислоте) образуется осадок, окрашенный в красный цвет.



Реакция обусловлена присутствием в белке ароматической аминокислоты тирозина, которая дает ртутную соль своего нитропроизводного. Если реакцию проводить с раствором тирозина, то осадок не образуется, жидкость окрашивается в красный цвет.

Эта реакция широко используется для количественного определения тирозина в гидролизатах белка и для определения некоторых производных тирозина.

Реактивы и оборудование: реактив Миллона²; кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В пробирки наливают по 5 капель исследуемых растворов белков. В каждую пробирку добавляют по 2 капли реактива Миллона и осторожно нагревают.

² Одну часть ртути растворяют в двойном по массе количестве азотной кислоты (плотность 1,40) сначала на холоде, затем на водяной бане. Полученный раствор разбавляют двойным объемом воды.

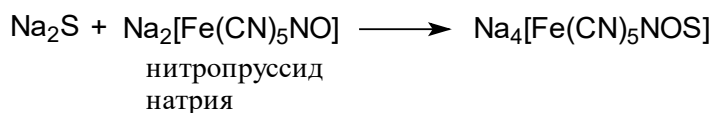
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании цистеина в анализируемых белках.

Опыт 8. *Нитропруссидная реакция*

Если раствор белка обработать щелочью и после охлаждения добавить свежеприготовленный раствор нитропруссид натрия, жидкость окрашивается в красный цвет. Реакция обусловлена присутствием в белке серосодержащих аминокислот, которые при кипячении со щелочью разрушаются с образованием сульфида натрия. Нитропруссид взаимодействует с сульфидом с образованием окрашенного комплекса:



Реактивы и оборудование: 5% раствор нитропруссид натрия; насыщенный раствор сульфата аммония; концентрированный раствор аммиака; пробирки; пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 0,5 мл растворов белков, приливают равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и 2–3 капли нитропруссид натрия. Затем раствор подщелачивают несколькими каплями крепкого раствора аммиака.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

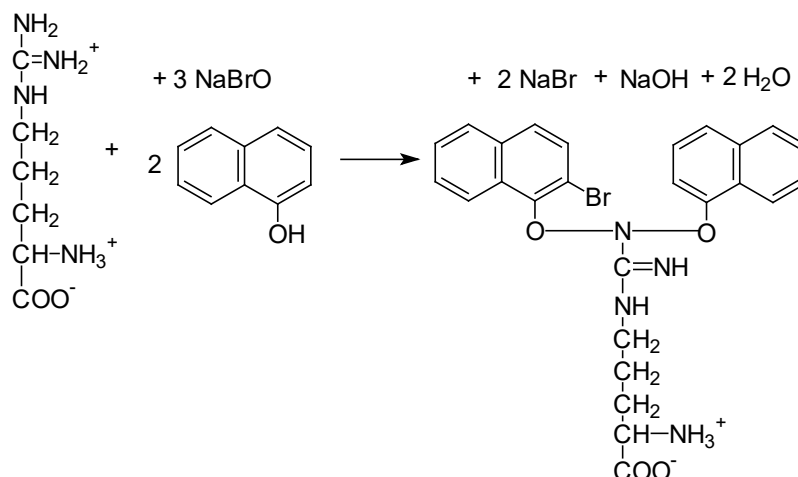
Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании цистеина в анализируемых белках.

Опыт 9. *Реакция на аргинин (Сакагучи)*

При добавлении к раствору белка щелочи, гипобромита и α-нафтола жидкость окрашивается в красный цвет.

Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислоты аргинина (гуанидиноаминовалериановой кислоты). В результате реакции образуется соединение красного цвета, представляющее собой продукт конденсации окисленного аргинина с α -нафтолом. Гипобромит играет роль окислителя и участвует в образовании промежуточного бромамидного соединения аргинина.



Реакция Сакагучи не является строго специфичной. Ее дают и другие монозамещенные гуанидины.

Реактивы и оборудование: 10% раствор гидроксида натрия; 0,2% спиртовой раствор α -нафтола; 2% раствор гипобромида натрия³ насыщенный раствор сульфата аммония; концентрированный раствор аммиака; пробирки; пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 0,5 капль растворов белков и добавляют по 5 капль раствора щелочи, по 3 капли раствора α -нафтола и по каплям раствор гипобромита натрия. Присутствие аммиака и избыток гипобромита мешают реакции.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании аргинина в анализируемых белках.

³ Гипобромид натрия имеет желтую окраску, бесцветный раствор не годится для этой реакции. Раствор следует плотно закрывать пробкой.

Работа 2. Хроматографический метод определения аминокислот

Цель работы – освоить методы разделения аминокислот, основанные на различных физико-химических свойствах аминокислот.

В зависимости от физико-химических факторов, определяющих основной механизм процесса, методы хроматографического анализа делят на четыре основных вида: адсорбционные, распределительные, ионообменные и осадочные.

Хроматографические методы применяют для сорбционно-динамического разделения смеси аминокислот, белков, углеводов, липидов и их метаболитов.

Довольно точным и доступным является метод распределительной хроматографии на бумаге (модификация адсорбционной хроматографии). Метод заключается в том, что каплю смеси аминокислот или гидролизата белка наносят на полоску хроматографической бумаги, конец которой опускают в подходящий органический растворитель. Растворитель засасывается полоской бумаги и увлекает за собой нанесенные на бумагу аминокислоты. Скорость перемещения аминокислот зависит от химического строения аминокислот и их способности растворяться в подвижном и неподвижном растворителе. В качестве подвижного растворителя применяют, например, бутанол, изопропанол, амиловый спирт, водонасыщенный фенол и т.д. Неподвижным растворителем является вода, пары которой насыщают хроматографическую бумагу (внешне бумага остается сухой). Чем меньше растворимость аминокислот в воде и чем больше их растворимость в подвижном растворителе, тем быстрее они движутся вслед за фронтом органического растворителя.

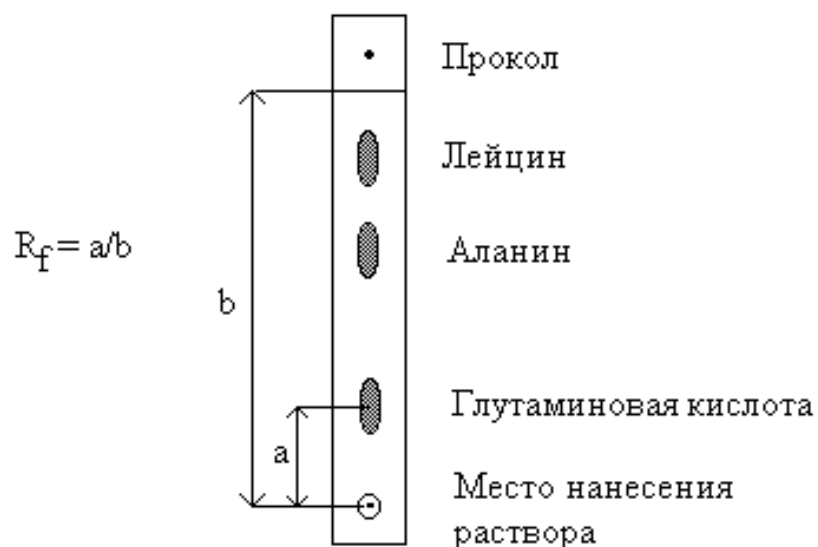


Рисунок 1. Хроматограмма аминокислот

Положение аминокислот на хроматографической бумаге можно обнаружить при помощи цветной реакции с нингидрином. Реакцию проводят путем опрыскивания из пульверизатора высушенной полоски бумаги 0,2 % спиртовым раствором нингидрина с последующим нагреванием до 100°C. Отдельные аминокислоты обнаруживаются в виде пятен, окрашенных в голубой, фиолетовый или оранжевый цвет (в зависимости от химической структуры аминокислоты). Скорость перемещения отдельных аминокислот может быть выражена посредством коэффициента распределения (R_f). Коэффициентом распределения называют отношение пути, пройденного аминокислотой (от места ее нанесения на бумагу до середины пятна на хроматограмме), к расстоянию от места нанесения смеси аминокислот до фронта растворителя:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

где a — расстояние от места нанесения раствора до середины пятна данной аминокислоты, мм; b — путь, пройденный растворителем, мм.

Коэффициент распределения является характерной величиной для каждой аминокислоты и постоянен при данных условиях опыта (растворитель, температура, pH среды, вид бумаги и пр.)

Материал исследования: растворы аминокислот 7,5 мг/мл, смесь аминокислот

Реактивы и оборудование: растворитель (изопропанол:вода=70:30), нингидрин (0,2% раствор в ацетоне), хроматографическая бумага (Silufol UV 254), ножницы, пинцет, капилляры или микропипетки, пульверизатор, хроматографическая камера.

Ход работы

Вырезать пластинку хроматографической бумаги 10 см×10 см. На расстоянии 1 см от нижнего и верхнего края начертить карандашом линию старта и финиша, соответственно. По ширине пластины (на линии старта) наметить 4 точки нанесения аминокислот на равных расстояниях друг от друга.

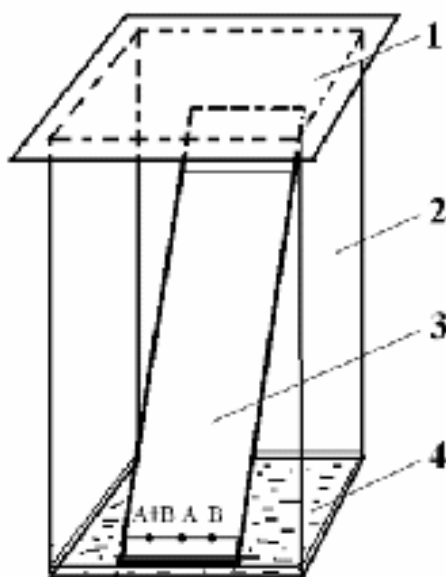


Рисунок 2. Устройство хроматографической камеры (1 – крышка, 2 – хроматографическая камера, 3 – хроматографическая пластина, 4 – растворитель).

При использовании пластин для хроматографирования необходимо их предварительно подготовить. Это связано с тем, что адсорбенты пластин при хранении сорбируют не только влагу, но и другие вещества, содержащиеся в воздухе. При использовании неподготовленных пластин в процессе хроматографирования появляется фронт "грязи", который может мешать определению веществ, имеющие большие значения R_f , а некоторые вещества, например вода, могут изменять состав подвижной фазы, изменяя тем самым получаемые значе-

ния R_f . Предварительная подготовка пластин заключается в разгонке пластин растворителем на всю высоту пластинки, с последующей сушкой пластины.

На подготовленную пластину с помощью капилляра или автоматической микропипетки осторожно наносят по 10 мкл (2 раза по 5 мкл) растворов аминокислот или смесь. После нанесения аминокислот пластину слегка подсушивают на воздухе, затем помещают в хроматографическую камеру и ждут поднятия фронта растворителя до линии финиша.

Подсушенную на воздухе пластину обрабатывают из пульверизатора раствором нингидрина и высушивают при температуре 95-110°C. Получают хроматограмму аминокислот. Рассчитывают R_f для всех аминокислот.

Оформление работы. Записывают условия проведения эксперимента, зарисовывают хроматограмму, находят R_f для всех аминокислот, сравнивают с литературными данными. Отмечают цвет аминокислот на хроматограмме.

Таблица 1. Коэффициенты распределения R_f для некоторых аминокислот

Аминокислота	изопропиловый спирт	ацетон	фенол, насыщенный водой	н-бутиловый спирт – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:1)
<i>Глицин</i>	0,743	0,983	0,41	0,34
<i>Аланин</i>	0,984	0,455	0,56	0,39
<i>Валин</i>	0,91	0,385	0,76	0,56
<i>Лейцин</i>	0,92	0,507	0,87	0,72
<i>Треонин</i>	0,98	0,843	0,47	0,36
<i>Лизин</i>	0,764	0,902	0,82	0,16
<i>Аргинин</i>	0,656	0,784	0,90	0,18
<i>Метионин</i>	0,306	0,692	0,83	0,58
<i>Фенилаланин</i>	0,808	0,654	0,87	0,66
<i>Тирозин</i>	0,673	0,623	0,63	0,53
<i>Триптофан</i>	0,805	0,733	0,75	0,62
<i>Аспарагиновая кислота</i>	0,481	0,884	0,15	0,33

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Работа 3. Определение изоэлектрической точки казеина

Цель работы – Выявить зависимость поверхностного заряда белков от pH раствора. Усвоить понятие изоэлектрической точки белка.

Все белки обладают электрическим зарядом. Величина заряда определяется количеством ионогенных групп аминокислот, входящих в состав белка. Суммарный заряд белка изменяется в зависимости от pH и при определенном значении pH (изоэлектрическая точка, pI) равен 0. Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы и белки легко выпадают в осадок. Вследствие этого определение pI белка может быть сведено к определению pH раствора, при котором наблюдается наибольшее помутнение раствора белка. Нахождение изоэлектрической точки для отдельных белков позволяет подобрать условия осаждения для них и разделить белки с разными изоэлектрическими точками при их очистке.

Материал исследования: $\approx 0,4\%$ -ный раствор казеина в 0,2 моль/л растворе ацетата натрия⁴.

Реактивы и оборудование: 0,2 моль/л раствор уксусной кислоты; дистиллированная вода; пробирки; пипетки, фотометр.

Ход работы. Для приготовления буферных растворов с определенным значением pH наливают последовательно в 6 сухих пробирок реактивы в количествах, указанных в таблице.

⁴ Взвешивают 0,4 г немного подсушенного на воздухе казеина и растворяют его в 100 мл 0,2 моль/л раствора ацетата натрия.

№ пробы	Состав пробы, мл			рН смеси
	CH ₃ COOH, 0,2 М	H ₂ O	Раствор казеина в 0,2 М CH ₃ COONa	
1	1,6	0,4	0,2	3,8
2	0,8	1,2	0,2	4,1
3	0,4	1,6	0,2	4,4
4	0,2	1,8	0,2	4,7
5	0,1	1,9	0,2	5,0
6	0,06	1,94	0,2	5,3

После этого смесь в пробирках встряхивают и измеряют оптическую плотность раствора при 590 нм относительно воды. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 мл этилового спирта и снова измеряют оптическую плотность.

Оформление работы. Результаты работы оформить в виде графика зависимости значения рН раствора от оптической плотности до и после добавления этилового спирта.

рН	Оптическая плотность раствора казеина	
	до добавления спирта	после добавления спирта
3,8		
4,1		
4,4		
4,7		
5,0		
5,3		

В выводе отметить изоэлектрическую точку казеина. Сравнить с литературными данными.

Работа 4. Определение температуры коагуляции яичного белка

Цель работы - Освоить метод определения температуры коагуляции белка.

При увеличении температуры белки *денатурируют* (т.е. теряют свою третичную и вторичную структуру), как правило, необратимо. Температура денатурации белков различается. Однако большинство белков животного происхождения денатурируют при температуре выше 40°C, именно поэтому температура 42°C является критической для человеческого организма.

Материал исследования: яичный белок.

Реактивы и оборудование: прибор для определения температуры плавления; пробирка (диаметр 3–4 мм, высота 2–3 см); капилляр или капиллярная пипетка.

Ход работы. Неразбавленный яичный белок вносят в пробирку капилляром или капиллярной пипеткой в таком количестве, чтобы его высота достигла 1 см. Пробирку прикрепляют к термометру прибора для определения температуры плавления и монтируют его в прибор (рис. 3).

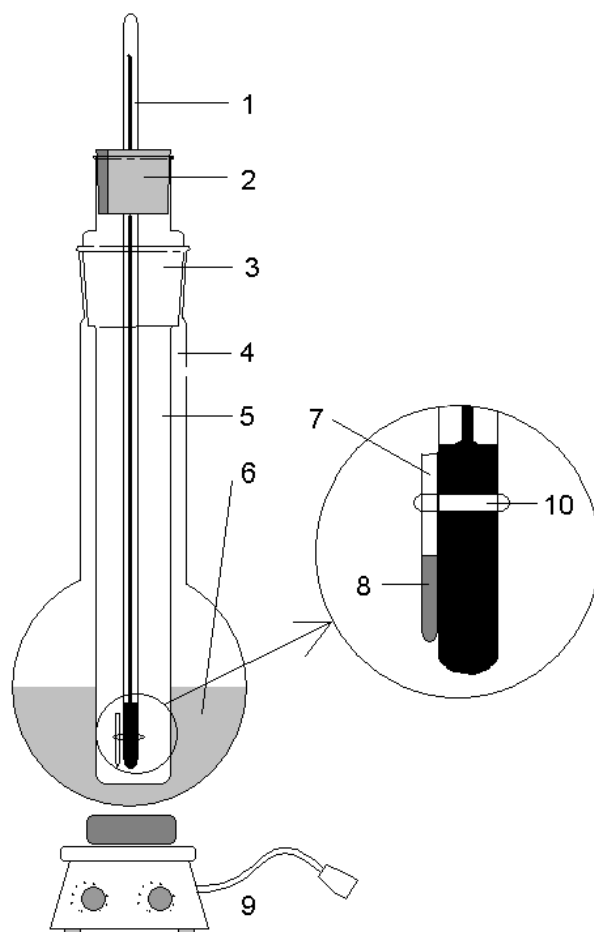


Рисунок 3. Прибор для определения температуры плавления.

1 – термометр; 2 – пробка для крепления термометра с отверстием для сообщения внутреннего пространства колбы и пробирки с атмосферой; 3 – пробка для крепления пробирки; 4 – круглодонная колба; 5 – пробирка; 6 – теплоноситель (глицерин, серная кислота, силиконовое масло, дибутилфталат); 7 – капилляр; 8 – вещество; 9 – колбонагреватель; 10 – резиновое колечко или проволока

Прибор нагревают, отмечают температуру, при которой начинается помутнение белкового раствора, и температуру, при которой происходит полное свертывание белка.

Оформление работы. Полученные данные заносят в лабораторный журнал. Делают выводы.

Работа 5. Осаждение белков. Денатурация белков.

Белки могут быть высажены из раствора не только под действием сильных электролитов, но и с помощью других методов, например: добавлением к раствору белка солей тяжелых металлов, минеральных кислот, а также при нагревании.

Осадочные реакции на белки применяются для обнаружения и количественного определения белков в различных субстратах.

Материал исследования: 1% раствор яичного альбумина.

Реактивы и оборудование: 10 % раствор ацетата свинца, 1% и 10% растворы уксусной кислоты, 10% раствор гидроксида натрия, насыщенный раствор хлорида натрия, водяная баня, штатив с пробирками.

Опыт 1. *Осаждение белков солями тяжелых металлов*

Ход работы. В пробирку к 0,5 мл раствора белка прибавить несколько капель раствора ацетата свинца. При этом происходит помутнение раствора.

Опыт 2. *Осаждение белков при нагревании*

Ход работы. В пять пробирок наливают по 0,5 мл раствора яичного альбумина.

1. В первую пробирку добавляют 1-3 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок при этом не образуется.

2. К раствору белка во второй пробирке добавляют одну каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Выпадает хлопьевидный осадок. Это объясняется тем, что при добавлении к коллоидному раствору белка кислоты мицеллы теряют заряд, белок при этом находится в изоэлектрическом состоянии.

3. Содержимое третьей пробирки нагревают на водяной бане до помутнения раствора.

4. В четвертую пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок не образуется.

5. В пятую пробирку добавляют 1-2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия, нагревают. Выпадает осадок белка.

Оформление работы. Результаты опытов занести в таблицу. Объяснить наблюдаемые явления.

№ пробирки	Среда	Наблюдаемые изменения
1	$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	
2	Кислая (10% раствор CH_3COOH)	
3	Слабокислая (1% раствор CH_3COOH)	
4	Нейтральная	
5	Щелочная (10% раствор NaOH)	
6	Кислая (10% раствор CH_3COOH) + насыщенный раствор NaCl	

ОЧИСТКА И РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Осадки белка, полученного при высаливании, обычно очищают от примесей солей методом *диализа* или *гель-фильтрации*. В основе этих методов лежит различие в молекулярной массе белка и соли.

Работа 6. Обессоливание раствора яичного альбумина методом диализа

Цель работы – освоить методы очистки белка от низкомолекулярных примесей. Провести обессоливание белка методом диализа.

Диализом называется процесс разделения высокомолекулярных веществ и низкомолекулярных веществ с помощью полупроницаемых мембран (целлофана, пергамента и др.). Обладая бóльшим диаметром, белковые молекулы не способны проникать через такие мембраны, в то время как частицы низкомолекулярных веществ легко проходят через них. Способ диализа положен в основу аппарата «искусственная почка», которая применяется для очищения крови от шлаков и токсических веществ.

Материал исследования: 1%-ный раствор яичного альбумина.

Реактивы и оборудование: сульфат аммония, раствор хлорида бария, нингидрин, водяная баня, стакан вместимостью 300 мл, диализная мембрана, стеклянная трубочка диаметром 10 мм, стеклянные палочки, нитки, ножницы, пипетки, пробирки.

Ход работы.

1. Нижний край цилиндрической диализной мембраны завязывают нитками, верхний край собирают вокруг стеклянной трубочки (или пластикового наконечника), обвязав их ниткой или клейкой лентой скотч.

2. Получившийся диализный мешочек привязать к палочке и опускают в стакан с дистиллированной водой (рис. 4).

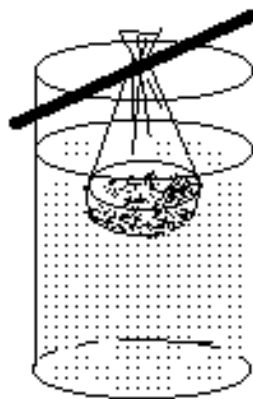


Рисунок 4. Диализатор в рабочем состоянии

3. Через трубочку заполняют мешочек раствором белка, так чтобы уровень жидкости в мешочке был ниже уровня воды в стакане. К раствору белка в мешочке добавляют немного соли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4. Через 1 час от начала диализа берут в две пробирки по 1 мл жидкости из стакана и проводят две реакции:

а) на присутствие ионов SO_4^{2-} : добавляют в первую пробирку раствор BaCl_2 . Наблюдают образование белого осадка.

б) на присутствие белка: добавляют во вторую пробирку кристаллик нингидрина, нагревают на водяной бане, отмечают результат.

5. Жидкость из мешочка разделяют на две пробирки: в одной, проводят нингидриновую реакцию, в другой, реакцию на присутствие ионов SO_4^{2-} .

Оформление работы. В лабораторный журнал зарисовывают диализатор, записывают ход выполнения работы и сделанные реакции.

Результаты оформляют в виде таблицы, отметив знаками «плюс» и «минус» наличие реакции:

Определяемые компоненты	До диализа		После диализа	
	внешняя жидкость	внутренняя жидкость	внешняя жидкость	внутренняя жидкость
Белок				
SO_4^{2-}				

В выводах отметить, какое свойство белка демонстрирует метод диализа.

Работа 7. Отделение белка от низкомолекулярных примесей методом гель-фильтрации

Цель работы – освоить хроматографические методы очистки и разделения белков. Очистить белок от низкомолекулярных примесей методом гель-фильтрации.

Низкомолекулярные вещества из белкового раствора можно удалить достаточно быстро и полно с помощью гель-фильтрации. Разделение веществ этим методом основано на различии в размерах молекул. Крупные молекулы не проникают в поры гранул геля и выходят из колонки в первую очередь, в то время как небольшие молекулы попадают через поры в гранулы, вследствие этого задерживаются на колонке и движутся с меньшей скоростью. Метод гель-фильтрации часто называют разделением веществ по принципу молекулярного сита.



Рисунок 5. Колонка для отделения белков от низкомолекулярных примесей методом гель-фильтрации

Свойствами молекулярного сита обладают многие пористые материалы. Наиболее часто для этой цели применяют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой. Например, гели полисахарида декстрана (коммерческое название – сефадексы). При изготовлении сефадексов полисахаридные цепи декстрана соединяются поперечными сшивками. Существует несколько ти-

пов сефадекса, различающихся как размером и количеством, так и величиной гранул. Это позволяет применять их для разделения веществ с разными размерами молекул. Благодаря высокому содержанию гидроксильных групп гранулы сефадекса легко набухают, образуя гель. Чем выше способность геля к набуханию, тем больше номер сефадекса.

Сефадексы отличаются степенью сшивки молекул декстрана друг с другом. Это находит выражение в различной набухаемости гранул сефадекса и пределах эксклюзии (выражаемой значениями молекулярной массы веществ, еще способных входить внутрь гранул сефадекса), в связи с чем и построена их классификация (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика некоторых видов сефадексов

Марка сефадекса	Предел эксклюзии, в единицах молекулярной массы	Поглощение воды, мл/г	Удельный объем в колонке, см ³ /г	Время полного набухания при комнатной температуре, ч	Диапазон фракционирования белков по молекулярной массе, тыс.
G-25	5000	2,5±0,2	4 – 6	3	1,0 – 5,0
G-50	10000	5,0±0,3	9 – 11	3	1,5 – 30
G-75	50000	7,5±0,5	12 – 15	24	3,0 – 75
G-100	100000	10,0±1,0	15 – 20	48	4,0 – 150
G-150	150000	15,0±0,5	20 – 30	72	5,0 – 300
G-200	200000	20,0±2,0	30 – 40	72	5,0 – 600

Для освобождения белковых растворов от солей обычно используют сефадекс марки G-25.

Применение сефадексов для фракционирования сложных белковых смесей типа тех, что характерны для биологических жидкостей (сыворотка крови, гемолимфа беспозвоночных и т. п.) или экстрактов, полученных из животных и растительных тканей, малоэффективно: удастся лишь разделить смесь белков на несколько групп. Тем не менее, в ряде случаев это первая стадия при выделении индивидуальных белков. Сефадексы применяют также на заключительных этапах очистки белка от примеси сопутствующего белка, если последний достаточно резко отличается от первого по величине молекулярной массы.

В последнее время сефадексы применяют для определения молекулярной массы белков путем сопоставления величин свободного (т. е. не занятого гранулами сефадекса) и элюируемого (т. е. необходимого для выноса белка из колонки) объемов колонки.

Материал исследования: яичный альбумин (1%-ный раствор в 0,5%-ном растворе бихромата калия), голубой декстран 1%-ный раствор.

Реактивы и оборудование: биуретовый реактив, колонка размером 1×25 см с гелем сефадекса G-25 (4 г в 0,09 М растворе хлорида натрия), 0,09 М раствор хлорида натрия, мерный цилиндр, штативы с пробирками «Эппендорф» 1,5 мл, пипетки.

Ход работы.

1. Заполнение колонки⁵.

Заполнение гелем колонки ведут осторожно, заливая его медленно и непрерывно по стенке колонки, что предохраняет его от захвата пузырьков воздуха.

2. Определение объема водной фазы колонки V_o .

Открывают зажим на колонке и сливают 0,09 М раствор NaCl, находящийся над гелем. Зажим закрывают и на поверхность геля очень аккуратно, по стенке, с помощью пипетки наносят 0,5 мл раствора голубого декстрана. Открывают зажим и вытекающую из колонки жидкость собирают в мерный цилиндр и сохраняют до конца опыта. Наблюдают за проникновением нанесенного раствора в гель (поверхность геля не должна оставаться сухой, поэтому по мере вытекания жидкости из колонки раствор NaCl доливают в колонку либо подсоединяют к колонке склянку с раствором).

Заранее готовят пять чистых пробирок. Как только из колонки начнет вытекать окрашенный (голубой) раствор, в эти пробирки собирают окрашенные фракции, по 0,5 мл в каждую пробирку. Элюат из этих пробирок от начала ря-

⁵ 4 г сефадекса предварительно заливают 200 мл 0,09 М раствора хлорида натрия в литровом стакане, хорошо перемешивают и оставляют на 24 часа. Через сутки набухший сефадекс промывают 5 раз 0,09 М раствором хлорида натрия путем декантации. Затем стакан с гелем сефадекса помещают в большой вакуум эксикатор и в течение 1,5 часов деаэрируют под вакуумом, создаваемым водоструйным насосом, после чего гель готов для заполнения колонки.

да, включая пробирку с самой интенсивной окраской, сливают в цилиндр, где уже собраны предыдущие (неокрашенные) фракции. Объем остальных пробирок, в которых окраска начинает ослабевать, не учитывается. Таким образом, объем элюата от начала опыта до появления наиболее яркой голубой окраски составляет объем водной фазы колонки (V_0).

Закончив определение, колонку отмывают от следов голубого декстрана.

3. Обессоливание белкового раствора методом гель-фильтрации.

Перед нанесением раствора белка открывают кран и наблюдают за уменьшением столбика хлорида натрия над слоем сефадекса. Как только над поверхностью геля останется слой жидкости толщиной 1–2 мм, кран закрывают и аккуратно пипеткой наносят на гель 1 мл раствора белка, в который предварительно добавляют 5 мг $K_2Cr_2O_7$. Кран открывают и следят за проникновением раствора в гель. Снова закрывают кран и ополаскивают стенки колонки 1 мл хлорида натрия, открывают кран и позволяют жидкости впитаться в гель. Затем кран закрывают и аккуратно добавляют 4–6 мл хлорида натрия.

В 20 пробирок отмеряют 0,5 мл биуретового реактива. Собирают фракции с колонок по 20 капель (1 мл) в пробирки, содержащие биуретовый реактив. При этом не забывают добавлять в колонку хлорид натрия. Наблюдают за изменением окраски в порциях элюата.

Гель в колонке отмывают водой до полного удаления $K_2Cr_2O_7$.

Оформление работы. Описывают принцип метода и результаты заносят в таблицу. Делают выводы.

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Белок																				
$K_2Cr_2O_7$																				

Работа 8. Разделение смеси белков методом электрофореза в полиакриламидном геле

Цель работы – освоить методы ПААГ-электрофореза для характеристики белков.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле – метод разделения смеси белков в полиакриламидном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью (функцией длины полипептидной цепочки или молекулярной массы, а также укладки белковой молекулы, посттрансляционных модификаций и других факторов). Данный способ фракционирования белков и пептидов широко применяют в современной молекулярной биологии, биохимии, генетике.

Разработано большое количество модификаций электрофореза белков в полиакриламидном геле для решения разных задач и для различных белков и пептидов.

Электрофоретическая подвижность биополимеров в геле зависит от ряда параметров. Скорость миграции пропорциональна заряду молекулы, и в свободной жидкости молекулы с одинаковым удельным зарядом мигрируют с равной скоростью. В случае разделения в среде, имеющей жесткую пространственную матрицу, происходит сегрегация за счет трения о гель. Сила трения зависит от пространственной конфигурации молекулы, в том числе от её размера. Таким образом, в случае электрофоретического разделения нативных белков будет наблюдаться сложная картина их распределения в зависимости от выше-приведенных факторов.

8.1. Нативный ПААГ электрофорез

Материал исследования: растворы белков с концентрацией 1 мг/мл (бычий сывороточный альбумин, человеческий сывороточный альбумин, яичный альбумин, глюкозооксидаза, алкогольоксидаза, пероксидаза хрена или другие белки) и раствор, содержащий смесь перечисленных белков с концентрацией 1 мг/мл каждого белка, белковые маркеры.

Реактивы и оборудование:

Трис (трис(гидроксиметил)аминометан (далее tris-base), трис-гидрохлорид (далее tris-HCl), глицин, акриламид (далее AA), бисакриламид (далее BIS), персульфат аммония (далее PSA), тетраметилэтилендиамин (далее TEMED), глицерин, кумасси ярко голубой G-250, 95% этанол, ледяная уксусная кислота, бромфеноловый синий, 2% раствор агарозы.

Приготовление рабочих растворов

1. 1M Tris-Cl (pH 6,8)

2,46 г tris-HCl и 10,26 г tris-base растворить в колбе на 100 мл и довести до метки дистиллированной водой.

2. 1M Tris-Cl (pH 8,8)

14,56 г tris-HCl и 0,94 г tris-base растворить в колбе на 100 мл и довести до метки дистиллированной водой.

3. 30 % акриламид

Приготовление 30%-ного акриламида:

Реактивы \ Объем 30% акриламида	100 мл	150 мл	200 мл
AA	29,0 г	43,5 г	58,0 г
BIS	1,0 г	1,5 г	2,0 г
H ₂ O	70 г / 70 мл	105 г / 105 мл	140 г / 140 мл

4. 10% PSA

Раствор персульфата аммония готовят в день проведения электрофореза. 0,1 г персульфата аммония, 900 мкл воды.

5. Раствор для окрашивания

0,5 г кумасси ярко голубого G-250, 80 мл этанола, 14 мл ледяной уксусной кислоты, 106 мл воды.

6. Раствор для проявления-1 при окрашивании кумасси G-250

80 мл этанола, 14 мл ледяной уксусной кислоты, 106 мл воды.

7. Раствор для проявления-2 при окрашивании кумасси G-250

10 мл этанола, 14 мл ледяной уксусной кислоты, 176 мл воды.

8. 1х трис-глициновый электродный буфер (pH = 8,8)

Смешать 3,10 г tris-base с 19,3 г глицина и растворить в 1 л воды.

9. 4X загрузочный буфер для нативных образцов

Приготовление 10 мл буфера для нативных образцов:

Tris-HCl (pH 6,8), 1M	2,00 мл
H ₂ O	4,00 мл
Бромфеноловый синий	~1 мг
Глицерин	4,00 мл / 5,0 г

!Все растворы хранить не более 1 месяца при +4⁰C!

Приготовление гелей для электрофореза нативных белков

1. Разрешающий гель

Приготовление 10 мл разрешающего геля с концентрацией AA 7,5%

Рабочие растворы	Объем
AA, 30%	2,5 мл
H ₂ O	3,65 мл
Tris-Cl (pH 8,8)	3,75 мл
PSA	100 мкл
TEMED	15 мкл

2. Концентрирующий гель

Приготовление 5 мл концентрирующего геля с концентрацией AA 5%

Рабочие растворы	Объем
AA, 30%	0,85 мл
H ₂ O	3,40 мл
Tris-Cl (pH 6,8)	0,66 мл
PSA	80 мкл
TEMED	8 мкл

Ход работы.

Электрофоретическая установка представлена на рисунке 6.

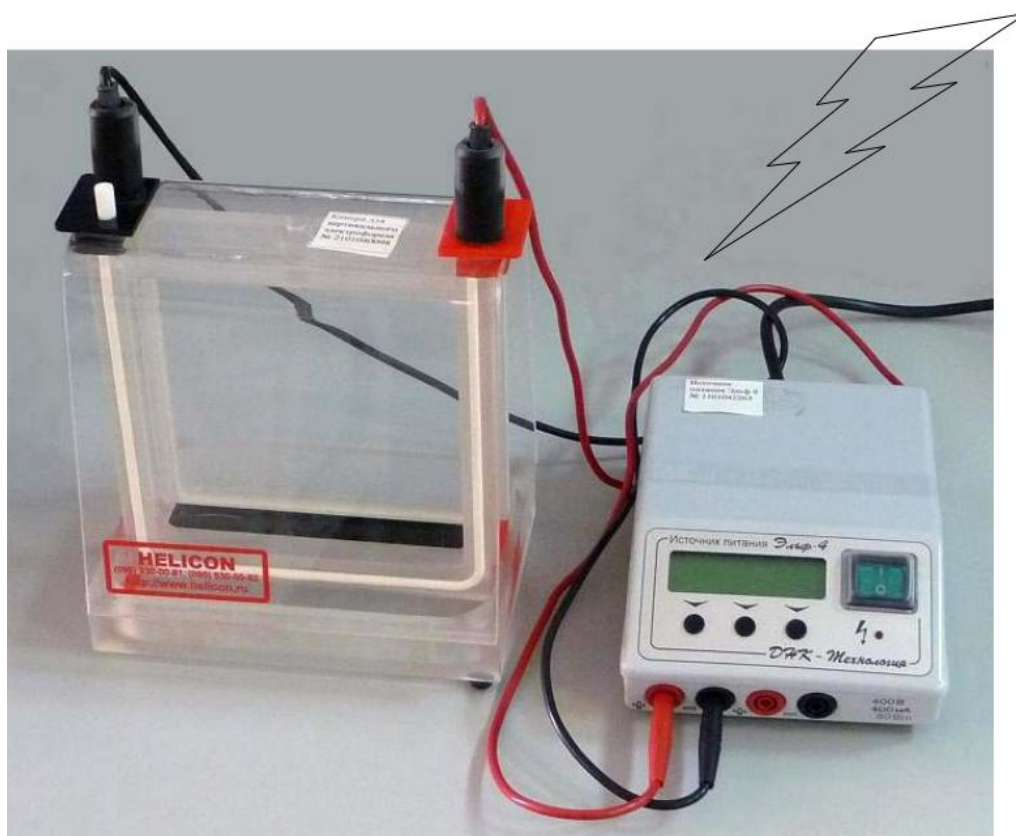


Рисунок 6. Электрофоретическая установка для вертикального электрофореза VE – 2М от фирмы «Helicon» (Москва) с размером стекол слэба (кассеты) 150x122 мм², источник питания «Эльф-4».

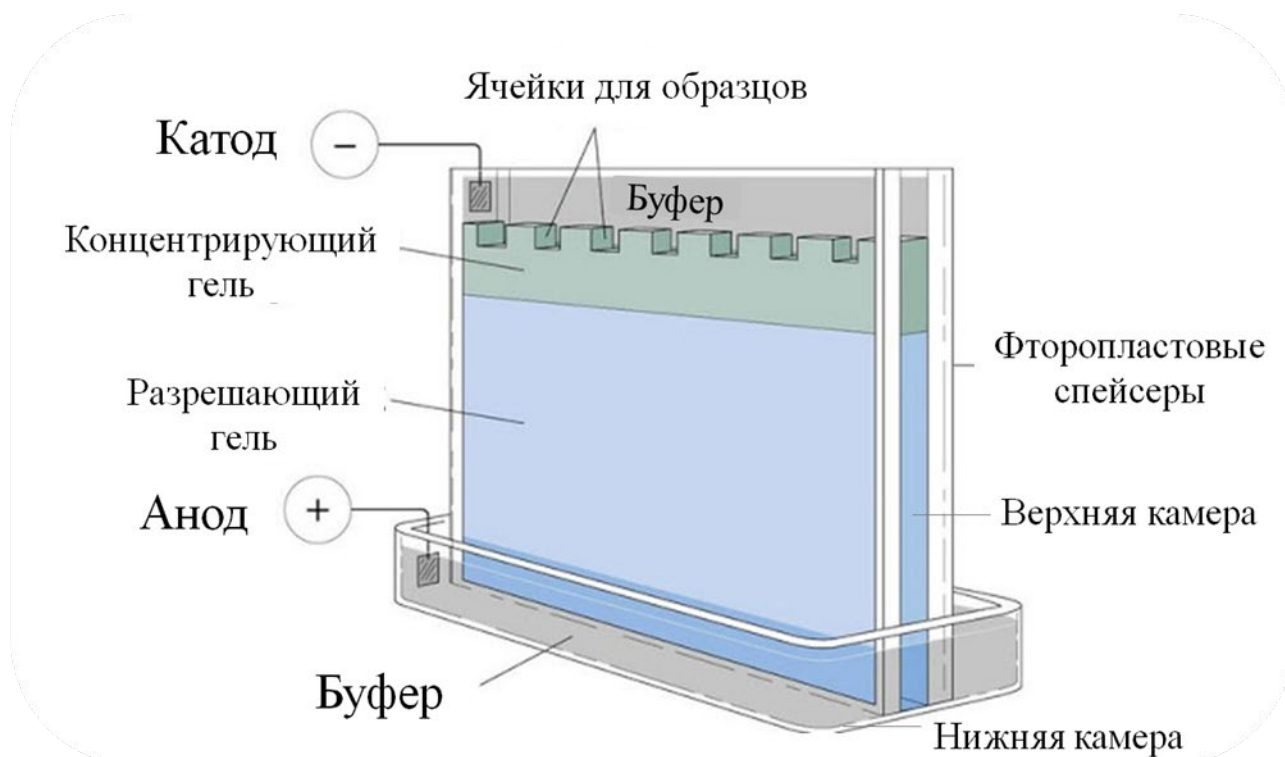


Рисунок 7. Камера для вертикального электрофореза

1. Верхнюю камеру установить на ровную горизонтальную поверхность. Слэб из стекол с вырезом и без выреза со вставленными вдоль его кромок спейсерами (фторопластовые пластинки) выровнять по основанию ячейки и по боковым граням, затем закрепить зажимами. Стекло с вырезом должно находиться с внутренней (обращённой в верхний буфер) стороны слэба. Затем, если нет необходимости использования двух гелей одновременно, вместо второго слэба ставят заглушку из оргстекла.

2. Провести герметизацию слэбов при помощи расплавленного 2%-ного раствора агарозы вдоль кромок и нижнего торца слэба.

3. Отметить маркером уровень, отстоящий от верхнего торца слэба на 2,5 – 3 см (верхний уровень разрешающего геля). Залить свежеприготовленный 7,5% разрешающий гель до метки (акриламид полимеризуется за 5 – 10 мин), сверху наслоить ~200 мкл воды (для определения времени конца полимеризации полезно оставить немного раствора акриламида в стакане).

4. Отсосав наслоенную воду шприцем, до конца заполнить слэб концентрирующим гелем, вставить гребенку и дождаться конца полимеризации, после чего аккуратно извлечь гребенку из установки.

5. Вставить верхнюю ячейку в нижнюю и заполнить обе ячейки электродным буфером.

6. Образцы растворов белков смешать с 4X загрузочным буфером для нативных образцов в соотношении 3:1.

7. В образовавшиеся после извлечения гребенки лунки нанести 30 мкл смеси растворов белков с загрузочным буфером (около 20 мкг белка в лунке).

8. Подключить блок питания к установке для электрофореза. Электрофорез проводить при силе тока 40 – 45 мА и напряжении 175 – 200 В. При этом мощность потребляемая установкой составляет 7 – 9 Вт.

9. Электрофорез проводят до длины пробега фронта красителя 6 – 6,5 см от границы разрешающего геля (70 – 90 мин.).

10. Отключают блок питания и извлекают гель из установки.

11. Помещают гель в раствор для окрашивания на 15 мин., затем перекладывают его последовательно в раствор для проявления-1 (на ночь) и раствор для проявления-2 до полного вымывания красителя.

Оформление работы. Описать принцип метода. Занести рисунок или фотографию электрофореграммы в тетрадь. Сделать выводы.

8.2. SDS ПААГ электрофорез

Материал исследования: растворы белков с концентрацией 1 мг/мл (бычий сывороточный альбумин, яичный альбумин, глюкозооксидаза, алкогольоксидаза, пероксидаза хрена или другие белки) и раствор, содержащий смесь перечисленных белков с концентрацией 1 мг/мл каждого белка, белковые маркеры.

Реактивы и оборудование: Трис (трис(гидроксиметил)аминометан (далее tris-base), трис-гидрохлорид (далее tris-HCl), глицин, акриламид (далее АА), бисакриламид (далее BIS), персульфат аммония (далее PSA), тетраметилэтилендиамин (далее TEMED), глицерин, кумасси ярко голубой G-250, 95% этанол, ледяная уксусная кислота, бромфеноловый синий, β -меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия (SDS), 2% раствор агарозы.

Приготовление рабочих растворов

Растворы 1-7 готовить аналогично 9.1

8. 10 % SDS

Растворить 10 г SDS в 90 мл воды.

9. 5x Tris-глициновый буфер, pH8.3, (хранить основной сток при +4°C, рабочий сток – при NT).

Смешать 15,1 г tris-base с 93,8 г глицина, добавить 50 мл 10% SDS и растворить в 1 л воды. Перед использованием разбавить в 5 раз.

10. 4X загрузочный буфер для образцов

Приготовление 10 мл буфера:

Tris-HCl (pH 6,8), 1M	2,00 мл
β -меркаптоэтанол (14,5M)	280 мкл
SDS, 10%	4,00 мл

Бромфеноловый синий	~1 мг
Глицерин	4,00 мл / 5,0 г

Приготовление гелей для SDS -электрофореза белков

1. Разрешающий гель

Приготовление 10 мл разрешающего геля с концентрацией АА 10%

Рабочие растворы	Объем
АА, 30%	3,33 мл
H ₂ O	2,72 мл
1 М Tris-Cl (pH 8,8)	3,75 мл
10 % PSA	0,10 мл
SDS, 10%	100 мкл
TEMED	15 мкл

1. Концентрирующий гель

Приготовление 5 мл концентрирующего геля с концентрацией АА 5%

Рабочие растворы	Объем
АА, 30%	0,83 мл
H ₂ O	3,40 мл
1 М Tris-Cl (pH 6,8)	0,63 мл
10 % PSA	50 мкл
SDS, 10%	50 мкл
TEMED	15 мкл

Пункты 1-5, 7-11 выполнять аналогично 8.1.

6. Образцы растворов белков смешать с 4X загрузочным буфером в соотношении 3:1, прокипятить при 99° С в течение 10 мин, центрифугировать 2 мин при 14000 об./мин.

Оформление работы. Описать принцип метода. Занести рисунок или фотографию электрофореграммы в тетрадь. Сделать выводы.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Для количественного определения белков в биологических жидкостях чаще всего используются спектральные методы исследования: *фотокolorиметрия и спектрофотометрия*, а также – *рефрактометрический метод*.

Фотокolorиметрические методы основаны на цветных реакциях. Среди них наибольшее применение нашли биуретовая реакция на пептидные группы и реакция Фолина.

Прямой спектрофотометрический метод состоит в измерении светопоглощения раствора белка в ультрафиолетовой области при 200-220 нм и при 280 нм (зона поглощения ароматических аминокислот).

Рефрактометрический метод основан на изменении показателя преломления раствора в зависимости от концентрации белка в нем.

Работа 9. Количественное определение белка биуретовым методом

Цель работы – освоить метод определения белков в биологических жидкостях, применяемый в клинической биохимии.

В основе метода лежит способность белков в щелочной среде давать с раствором сульфата меди фиолетовое окрашивание. Окраска обусловлена образованием комплексов ионов меди с пептидными группами белка. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию белка в растворе. Биуретовую реакцию дают все белки, а также олигопептиды, содержащие не менее двух пептидных связей.

Биуретовая реакция не отличается высокой чувствительностью. Поэтому она применяется в тех случаях, когда содержание белка в исследуемом образце достаточно велико (не ниже нескольких мг/мл).

№	Стандартный 10% раствор белка, мл	0,9% раствор хлорида натрия, мл	концентрация белка, г/л
р-р сравнения	-	0,1	0
1	0,02	0,08	20
2	0,04	0,06	40
3	0,05	0,05	50
4	0,06	0,04	60
5	0,08	0,02	80
6	0,10	-	100

В пробирки добавляют 3,0 мл биуретового реактива. Через 20 минут измеряют оптическую плотность растворов на фотометре относительно раствора сравнения (0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия + 3,0 мл биуретового реактива). Измерение проводят в кювете толщиной 1 см, длина волны 525нм.

Градуировочный график строят с использованием компьютерных программ (MicrosoftExcel или SigmaPlot). По оси ординат откладывают полученные значения оптических плотностей, а по оси абсцисс – концентрацию белка (в г/л).

2. Определение содержания белка в неизвестной пробе.

В пробирку отмеряют 0,1 мл раствора белка с неизвестной концентрацией и 3,0 мл биуретового реактива и через 20 минут измеряют экстинкцию раствора на фотометре относительно раствора сравнения. Содержание белка находят по калибровочному графику.

Оформление работы. Описать принцип метода. Занести полученные экспериментальные данные в тетрадь. Построить градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации стандартного раствора белка. Пользуясь этим графиком, рассчитать содержание белка в испытуемом растворе и записать результат, рассчитать ошибку эксперимента и сделать вывод.

Работа 10. Количественное определение белка по методу Лоури

Цель работы – освоить чувствительный метод количественного определения белков, научиться определять низкие содержания белков в анализируемых образцах по градуировочному графику.

Среди методов, основанных на количественном определении белков посредством цветных реакций, наибольшей чувствительностью обладает метод Лоури. Метод Лоури основан на измерении интенсивности окраски раствора, в котором одновременно осуществляются, по меньшей мере, две цветные реакции на белок: биуретовая реакция и реакция Фолина с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами белковой молекулы. Последняя состоит в восстановлении смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета. Полагают, что в реакциях восстановления принимают участие комплексные соединения меди, возникшие при взаимодействии белка с щелочным раствором медного купороса. Вторая реакция не очень специфична, но весьма чувствительна. Поэтому метод Лоури позволяет вести определения белков в сильно разбавленных растворах (всего несколько десятков микрограммов от 10 до 200 мкг/мл).

Метод Лоури менее специфичен, чем биуретовый, поскольку на интенсивность окраски влияют многие вещества, которые могут содержаться в тканях или в буферных системах, применяемых в биохимических исследованиях. Поэтому для получения абсолютных данных градуировочный график следует строить по тому же белку, который необходимо определить в растворе.

Материал исследования: биологические жидкости (в определяемом объеме должно находиться от 10 до 100 мкг белка).

Реактивы и оборудование: стандартный раствор БСА (бычий сывороточный альбумин), реактив А (2% раствор карбоната натрия в

0,1 н растворе гидроксида натрия), реактив В (0,5% раствор сульфата меди в 1% растворе цитрата натрия), реактив Фолина⁷, фотометр «Эксперт-003».

Ход работы.

Перед определением смешивают 50 мл реактива А и 1 мл реактива В - (раствор С), реактив Фолина разбавляют в 2 раза.

Для построения градуировочного графика применяют стандартный раствор белка БСА с концентрацией 200 мкг/мл, готовят растворы белка с разной концентрацией, как показано в таблице.

№ пр.	станд. 200 мкг/мл раствор БСА, мл	Дистиллиро- ванная вода, мл	Концентра- ция белка, мкг/мл	Содержание белка в про- бе, мкг
р-р сравнения	-	1,00	0	0
1	0,05	0,95	10	10
2	0,20	0,80	40	40
3	0,50	0,50	100	100
4	0,80	0,20	160	160
5	1,00	-	200	200

Одновременно ставят пробирку с пробой неизвестной концентрации.

В каждую пробирку добавляют 5 мл реактива С, перемешивают. Через 10 минут добавляют 0,5 мл разведенного в 2 раза реактива Фолина тщательно перемешивают и помещают в термостат при 37°C на 30 минут для развития окраски. Фотометрируют на фотометре при длине волны 700 нм.

По результатам измерений строят градуировочный график с использованием компьютерных программ (MicrosoftExcel или SigmaPlot) и определяют содержание белка в неизвестной пробе.

Оформление работы. Описать принцип метода Лоури. Результаты измерений, градуировочный график и расчеты занести в рабочую тетрадь. Рассчитать ошибку эксперимента и сделать вывод по работе.

⁷ Реактив Фолина. В круглодонную колбу на 1,5–2 л вносят 100 г вольфрамата натрия $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ или 25 г молибдата натрия $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и в 700 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 50 мл 80%-ного раствора фосфорной кислоты и 100 мл концентрированной HCl . К колбе присоединяют обратный холодильник и кипятят в течение 10 часов, затем прибавляют 150 г Li_2SO_4 , 50 мл воды и 3–4 капли брома. Кипятят без холо-
дильника 15 мин для удаления избытка брома. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят его объем до 1 л водой и фильтруют. Полученный раствор должен быть ярко-желтого цвета. Его хранят в тем-
ной склянке и перед употреблением разбавляют дистиллированной водой 1 : 1.

Работа 11. Количественное определение белка по методу Брэдфорд

Цель работы – освоить чувствительный метод количественного определения белков для микроколичеств анализируемых образцов.

Определение концентрации белка методом Брэдфорд – один из наиболее популярных методов, используемый для определения концентрации белка в растворе. Этот метод, так же, как и метод Лоури, требует построения стандартной градуировочной кривой перед измерением концентрации неизвестного белка. Метод Брэдфорд основан на сдвиге спектра поглощения кумасси (Coomassie Blue) в сторону значений 595 нм прямо пропорционально концентрации содержащегося в растворе белка. Кумасси образует комплекс с белком; этот комплекс измеряют при длине волны 595 нм. Абсорбционная фотометрия комплекса кумасси/белок имеет очень высокую чувствительность и эффективна даже в случае следовых концентраций белков. Чувствительность методов Лоури и Брэдфорд сопоставима, но реагенты метода Лоури обладают большим сродством к глобулинам, а метода Брэдфорд – к альбуминам.

Материал исследования: раствор белка неизвестной концентрации.

Реактивы и оборудование: стандартные растворы белка 0,5 мг/мл и 1 мг/мл, реактив Брэдфорд⁸, фотометр «Эксперт-003».

Ход работы.

Перед определением концентрат реактива Бредфорд разбавляют в 5 раз (в пробирку добавляют 1 мл реактива и 4 мл дистиллированной воды).

1. Построение градуировочного графика.

Для построения градуировочного графика применяют растворы белка с концентрацией 0,5 мг/мл и 1 мг/мл, для построения графика готовят растворы белка согласно таблице:

⁸ Реактив Брэдфорд. 100 мг кумасси G-250 растворить в 50 мл спирта и добавить 100 мл ортофосфорной кислоты, довести до 1 л водой и профильтровать через бумажный фильтр. Внимание! Реагент очень чувствителен к белку (1–2 мг/мл). Все должно быть абсолютно чистым и посуда, и бумажный фильтр, и кюветы и руки, иначе раствор посинеет и придет в негодность. Чистый реактив Брэдфорд имеет коричневый цвет и синее при наличии белка

№ пр.	Концентрация исходного раствора белка, мг/мл	Объем раствора белка, мкл	Дистиллированная вода, мкл	Концентрация белка в пробе, мкг/мл
1	0,5	20	80	100
2	0,5	50	50	250
3	0,5	75	25	375
4	1,0	50	50	500
5	1,0	75	25	750
6	1,0	100	0	1000

Одновременно ставят пробирку с пробой неизвестной концентрации.

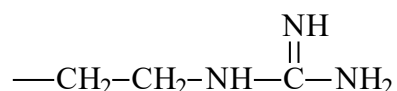
В каждую пробирку добавляют по 5 мл разбавленного реактива Бредфорд. Выдерживают пробирки 15 минут в темном месте и измеряют экстинкцию растворов на фотометре против контрольного раствора (реактив Бредфорд). Измерение проводят в кювете толщиной 1 см, длина волны 590 нм.

2. По построенному градуировочному графику, с использованием компьютерных программ (MicrosoftExcel или SigmaPlot), определяют содержание белка в неизвестной пробе.

Оформление работы. Охарактеризовать принцип метода Бредфорд, результаты измерений, градуировочный график и расчеты занести в рабочую тетрадь.

ТЕСТЫ И ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. На рисунке представлен радикал аминокислоты. Определите, к какой группе аминокислот она относится:



1. гидрофобные
 2. полярные незаряженные
 3. заряженные положительно
 4. заряженные отрицательно
2. Биполярный ион моноаминомонокарбоновой кислоты заряжен:
1. отрицательно
 2. положительно
 3. электронейтрален
3. Единственная аминокислота, содержащая замещенную α -аминогруппу.Destabilizes secondary structure of proteins. This amino acid affects the process of protein coagulation, as it serves as a site for forced bending of the polypeptide chain.
4. Выберите те типы связей, которые стабилизируют третичную структуру белка:
1. Водородная связь между пептидными группами
 2. Связь между α -амино- и α -карбоксильными группами аминокислот
 3. Водородные связи между радикалами аминокислот
 4. Гидрофобные взаимодействия радикалов аминокислот
 5. Ковалентные связи между радикалами цистеина
 6. Электростатическое притяжение между противоположно заряженными боковыми группами аминокислот
5. Укажите аминокислоты, боковые радикалы которых вероятнее всего расположены на поверхности молекулы белка:
1. Аспарагиновая кислота
 2. Фенилаланин

3. Лизин

4. Аланин

6. Четвертичная структура белка:

1. пространственная структура, образованная связями, возникающими между атомами боковых заместителей аминокислотных остатков;
2. порядок чередования аминокислот, соединенных пептидными связями;
3. пространственная структура, образованная слабыми взаимодействиями между контактными поверхностями протомеров;
4. пространственная структура, образованная водородными связями, возникающими между атомами пептидного остова.

7. Какова функция миоглобина в организме?

1. Транспорт кислорода от легких к тканям
2. Компонент буферной системы крови
3. Резервный источник кислорода в мышцах
4. Компонент соединительной ткани

8. Установите соответствие.

- | | |
|------------------------------|--|
| А. Первичная структура белка | 1. Стабилизируется водородными связями между атомами пептидного остова |
| Б. Вторичная структура белка | 2. В ее формировании принимают участие гидрофобные взаимодействия радикалов аминокислот |
| В. Третичная структура белка | 3. Стабилизируется ковалентными связями между α -амино- и α -карбоксильными группами аминокислот |

9. Напишите структурную формулу трипептида, состоящего из аминокислот: тирозина, аргинина и валина. Укажите N- и C-концы пептида, назовите трипептид.

10. Дайте определение первичной структуре белка.

11. Между остатками треонина и глутамина при формировании третичной структуры белка возникает:

1. ионная связь
 2. водородная связь
 3. дисульфидная связь
 4. гидрофобное взаимодействие
12. Напишите все возможные ионные формы указанной аминокислоты лизина при изменении pH среды от сильнокислой к сильнощелочной. Рассчитайте изоэлектрическую точку аминокислоты. Приведите расчеты.
13. Напишите структурные формулы трипептидов Glu-Asp-Pro и Ala-Cis-Gly. Какой из этих трипептидов лучше растворим в воде?
14. Электрофорез аминокислот на бумаге. Каплю раствора, содержащего смесь трех аминокислот (треонин, валин, тирозин), нанесли на полоску бумаги, предварительно смоченную буфером с $\text{pH}=6$, и к концам полоски приложили электрическое напряжение. Какая аминокислота будет двигаться:
1. к аноду;
 2. к катоду;
 3. останется на стартовой точке?

Раздел II. УГЛЕВОДЫ

Углеводы – это природные соединения, имеющие в подавляющем большинстве состав $C_n(H_2O)_m$. Их подразделяют на низкомолекулярные углеводы и продукты их поликонденсации.

Моносахариды – мономеры, из остатков которых состоят углеводы более сложного строения.

Олигосахариды – олигомеры, содержащие от 2 до 10 моносахаридных остатков.

Полисахариды – полимеры, включающие до нескольких тысяч моносахаридных звеньев.

Работа 12. Качественные реакции на углеводы

Цель работы – доказать наличие определенных функциональных групп у углеводов в соответствии с их химическими свойствами.

МОНОСАХАРИДЫ – полигетерофункциональные соединения, в молекуле которых одновременно содержится одна карбонильная группа (альдегидная или кетонная) и несколько гидроксильных групп. Моносахариды, содержащие альдегидную группу, называются альдозами; моносахариды, содержащие кетонную группу (обычно у C_2) - кетозами. За счет внутримолекулярного взаимодействия альдегидной (или кетонной) и гидроксильной групп по механизму нуклеофильного присоединения образуется циклический полуацеталь. Между циклической и линейной формами существует равновесие. Моносахариды вступают в реакции, характерные для многоатомных спиртов. Молекулы в циклической форме подвергаются дегидратации с образованием замещенных фуруролов. Для альдоз характерны реакции окисления.

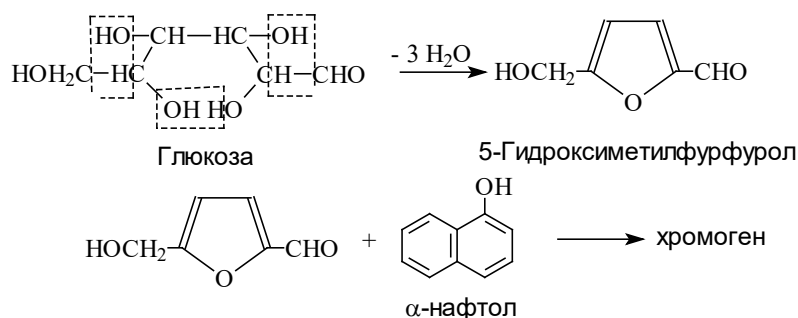
Материал исследования: 5%-ные растворы глюкозы, фруктозы, лактозы, мальтозы и сахарозы, 1%-ный раствор крахмала.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостаты (40°C и 70°C), кипящая водяная баня, 1% раствор крахмала; 1%

раствор сульфата меди; раствор Люголя⁹; реактив Барфреда¹⁰; 25- и 36%-ные растворы соляной кислоты; кристаллический резорцин; концентрированная серная кислота.

Опыт 1. Реакция Победова-Молиша с α -нафтолом

Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, образующиеся из углеводов под действием серной кислоты, конденсируясь с двумя молями сульфированного α -нафтола, дают триметилметановый хромоген, который окисляется серной кислотой в окрашенное хиноидное соединение:



Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, 10%-ный раствор α -нафтола в спирте; концентрированная серная кислота.

Ход работы. В пробирку помещают 1 мл раствора глюкозы или фруктозы, добавляют 2 капли 10% спиртового раствора α -нафтола и по стенке пробирки осторожно без встряхивания приливают 2 мл концентрированной серной кислоты. Серная кислота опускается на дно пробирки и на границе раздела двух фаз образуется кольцо красно-фиолетового цвета.

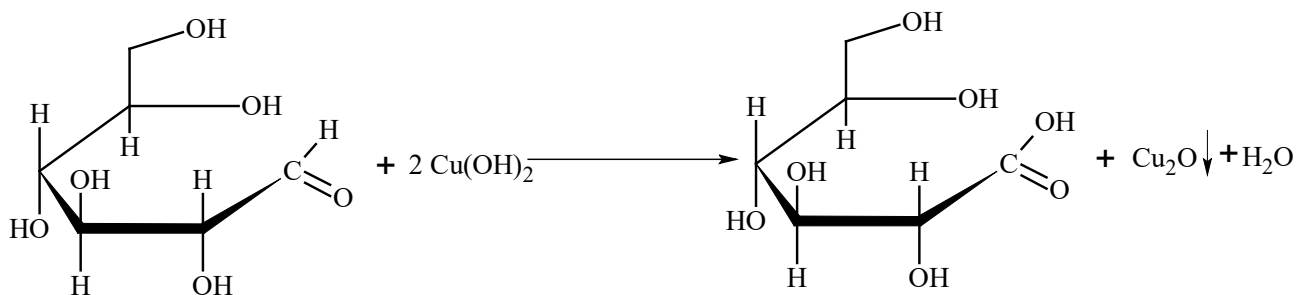
Опыт 2. Реакция Троммера

Моносахариды, благодаря свободной альдегидной группе в линейной форме, способны окисляться, одновременно восстанавливая соли металлов. В щелочной среде происходит изомеризация кетоз в альдозы, поэтому кетозы также способны восстанавливать ионы металлов, но в более жестких условиях. Это свойство используется для ряда качественных и количественных реакций.

⁹ Раствор Люголя - 1 г иода и 2 г KI в 300 мл воды.

¹⁰ Реактив Барфреда. 13,3 г ацетата меди растворяют в 200 мл горячей воды. Фильтруют и к фильтрату прибавляют 1,9 мл ледяной уксусной кислоты.

Растворы глюкозы или фруктозы в щелочной среде восстанавливают при нагревании гидроксид меди (II) в оксид меди (I):



Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, газовая горелка, 5%-ный раствор гидроксида натрия; 5%-ный раствор сульфата меди.

Ход работы. В пробирку к 3 мл 5% раствора глюкозы добавляют 1 мл 5%-ного раствора гидроксида натрия и 5 капель 5%-ного раствора сульфата меди. Выпадает осадок гидроксида меди (II), который при перемешивании растворяется, и раствор приобретает голубой цвет. При его осторожном нагревании в пламени горелки до кипения наблюдается выпадение желтого осадка гидроксида меди (I) или красного осадка оксида меди (I).

Опыт 3. Реакция серебряного зеркала

Свободные альдегидные группы способны окисляться, восстанавливая ионы Ag^+ до свободного металла Ag.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, термостат (50–60°C), 1–2%-ный раствор нитрата серебра; 5%-ный раствор аммиака.

Ход работы. В чистую, промытую щелочью и сполоснутую дистиллированной водой пробирку вливают 1–2 мл 1–2%-ного раствора азотнокислого серебра и по каплям добавляют 5%-ный раствор аммиака до растворения первоначально выпавшего осадка. Затем добавляют 1 мл 1%-ного раствора глюкозы. Пробирку со смесью нагревают термостате (50–60°C) в течение нескольких минут. При этом наблюдается выделение на стенках пробирки восстановленного серебра в виде зеркала.

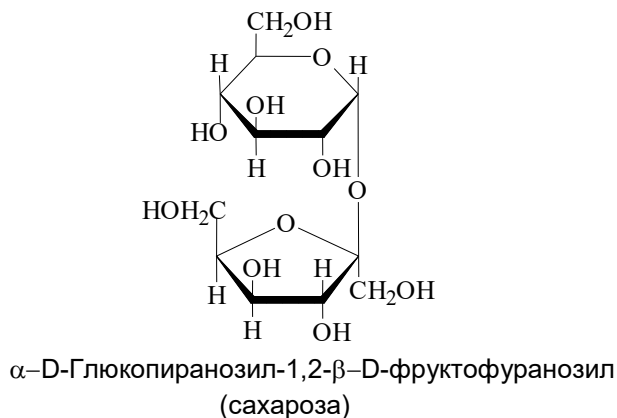
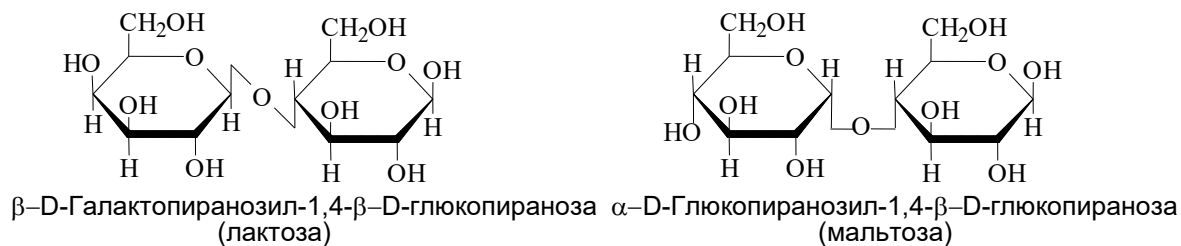
Опыт 4. Реакция Селиванова на кетозы

При нагревании фруктозы или других кетоз с соляной кислотой образуется 5-гидроксиметилфурфурол, который с резорцином образует соединение, окрашенное в вишнево-красный цвет.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, термостат (40°C), 25-ный раствор соляной кислоты; кристаллический резорцин.

Ход работы. В пробирку помещают 5 мл 5%-ного раствора фруктозы, 1 мл 25%-ного раствора соляной кислоты и несколько кристалликов резорцина. Смесь нагревают на водяной бане ($t=40^{\circ}\text{C}$) до появления вишнево-красного цвета.

ДИСАХАРИДЫ. Восстанавливающие дисахариды (например, лактоза, мальтоза) способны окисляться до соответствующих кислот, восстанавливая соли металлов, участвующие в реакциях. Однако, невосстанавливающие дисахариды (например, сахароза) в такие реакции не вступают. Наиболее широко для обнаружения подобных дисахаридов используют методы, в основе которых лежит гидролиз дисахаридов до моносахаридов с последующим обнаружением продуктов гидролиза – моносахаридов.



Опыт 5. Восстанавливающая способность лактозы

Благодаря наличию свободной альдегидной группы в молекулах лактозы и мальтозы эти дисахарида обладают восстанавливающими свойствами и способны участвовать в окислительно-восстановительных реакциях. Они дают положительную реакцию Троммера.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, газовая горелка, 5%-ный раствор гидроксида натрия; 5%-ный раствор сульфата меди.

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл раствора лактозы, затем вносят 1 мл 5% раствора гидроксида натрия и 5 капель 5% раствора сульфата меди. Пробирку осторожно нагревают в пламени горелки до появления красного осадка.

Опыт 6. Определение восстанавливающей способности сахарозы и гидролиз сахарозы

В молекуле сахарозы связь между остатками глюкозы и фруктозы образуется за счет двух гликозидных гидроксильных групп. Сахароза не обладает восстановительными свойствами и не дает реакцию Троммера. После гидролиза сахарозы образуются моносахариды, которые можно обнаружить с помощью реакции Троммера.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, газовая горелка, 5%-ный раствор гидроксида натрия; 5%-ный раствор сульфата меди, концентрированная серная кислота.

Ход работы. В две пробирки наливают по 3 мл 5% раствора сахарозы. В одну добавляют 2 капли концентрированной соляной кислоты и нагревают на водяной бане (100°C) в течение 15 минут для гидролиза сахарозы. Вторая пробирка содержит контрольный раствор сахарозы. Затем в первую пробирку добавляют 1,5 мл 5% раствора гидроксида натрия для нейтрализации и создания щелочной среды. Во вторую приливают 1 мл 5% раствора гидроксида натрия для создания щелочной среды. К содержимому этих пробирок добавляют по 5 капель 5% раствора сульфата меди. Затем нагревают на кипящей водяной бане (проводят реакцию Троммера).

Опыт 7. Реакция Барфреда

Проба Барфреда отличается от всех предыдущих реакций восстановления того или иного реагента тем, что окисление сахара протекает не в щелочной среде, а в среде, близкой к нейтральной. В этих условиях редуцирующие дисахариды в противоположность моносахаридам практически не окисляются, что позволяет отличить их от моносахаридов.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, кипящая водяная баня, реактив Барфреда¹¹.

Ход работы. В две пробирки наливают по 1 мл реактива Барфреда и прибавляют несколько капель раствора лактозы в одну пробирку и несколько капель раствора глюкозы в другую. Смесь нагревают на водяной бане в течение 10 мин.

ПОЛИСАХАРИДЫ отличаются друг от друга:

- а) химической природой повторяющихся моносахарных единиц;
- б) характером связи между отдельными моносахарными единицами;
- в) длиной цепи;
- г) степенью разветвления.

Полисахариды не содержат свободных альдегидных и кетогрупп, поэтому не обладают восстанавливающей способностью. Полный гидролиз полисахаридов в присутствии кислот или специальных ферментов приводит к образованию моносахаридов, обладающих восстанавливающими свойствами.

Опыт 8. Реакция крахмала с йодом

При взаимодействии крахмала с йодом образуются комплексные адсорбционные соединения, окрашенные в синий цвет. При нагревании разрушается пространственная структура молекул крахмала, и комплекс разрушается, окраска исчезает, но появляется вновь при охлаждении, так как образование строго определенной пространственной структуры молекул крахмала – процесс

¹¹ Реактив Барфреда. 13,3 г ацетата меди растворяют в 200 мл горячей воды. Фильтруют и к фильтрату прибавляют 1,9 мл ледяной уксусной кислоты.

самопроизвольный. Обесцвечивание происходит также и при добавлении щелочи. Исчезновение окраски при добавлении щелочи объясняется тем, что в образовании комплекса принимает участие молекулярный иод.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, кипящая водяная баня; 1% раствор крахмала; раствор Люголя¹²; 10%-ный раствор гидроксида натрия.

Ход работы. В две пробирки помещают по 2 мл 1% раствора крахмала и вносят по 1-2 капли раствора Люголя. Содержимое пробирок перемешивают и наблюдают образование синего окрашивания. Затем в одну пробирку добавляют 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и наблюдают обесцвечивание. Другую пробирку нагревают на водяной бане до исчезновения окраски, затем охлаждают и наблюдают вновь появление окраски.

Опыт 9. Гидролиз крахмала

При нагревании раствора крахмала с минеральными кислотами происходит гидролиз крахмала с образованием глюкозы, которую можно обнаружить характерными реакциями на моносахариды.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, кипящая водяная баня; 1% раствор крахмала; концентрированная соляная кислота, 1%-ный раствор сульфата меди; 5%-ный раствор гидроксида натрия.

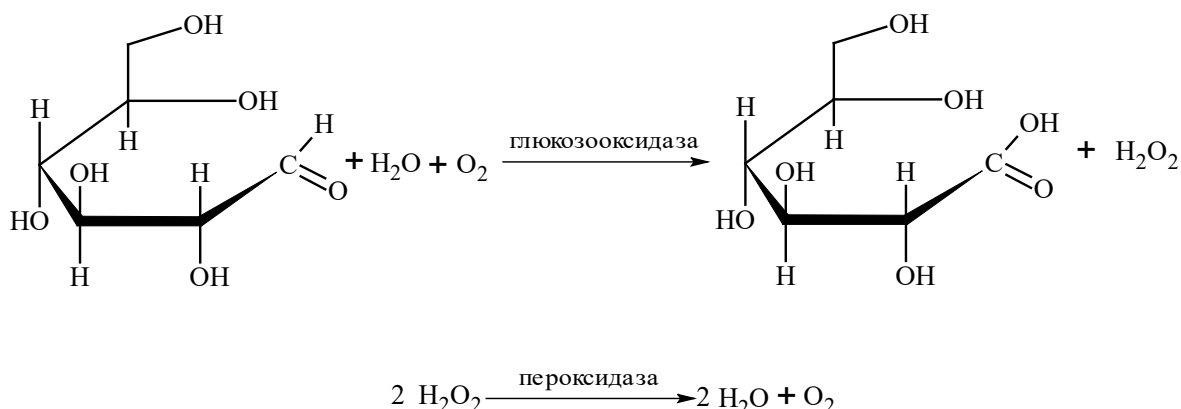
Ход работы. В две пробирки помещают по 3 мл 1% раствора крахмала. В одну из них вносят 3–4 капли концентрированной соляной кислоты и кипятят на водяной бане 15 минут. Вторая пробирка – контрольная. Затем в пробирку с гидролизатом добавляют 1,5 мл 5% раствора гидроксида натрия для нейтрализации и создания щелочной среды, а в пробирку с контрольным раствором добавляют 1 мл 5% раствора гидроксида натрия. В обе пробирки приливают по 5 капель 1%-ного раствора сульфата меди осторожно нагревают на водяной бане.

¹² Раствор Люголя - 1 г иода и 2 г KI в 300 мл воды.

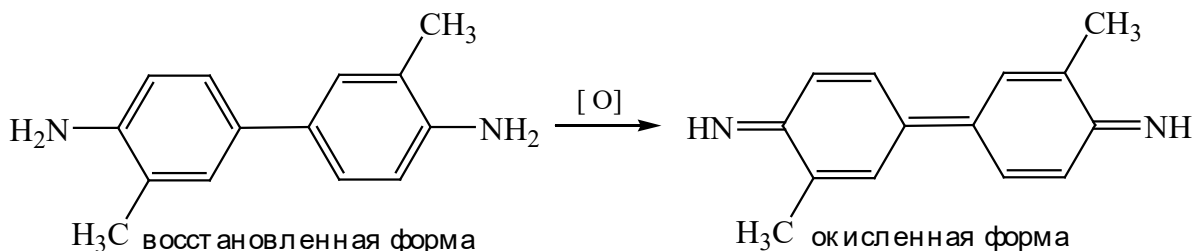
Работа 13. Энзиматический метод количественного определения глюкозы

Цель работы – освоить ферментативные методы анализа на примере определения содержания глюкозы в соках.

Метод предназначен для специфического определения содержания глюкозы в биологических жидкостях после удаления белков в присутствии других сахаров и редуцирующих веществ не углеводной природы. Метод основан на каталитическом действии глюкозооксидазы, ускоряющей окисление β -D-глюкозы кислородом воздуха до глюконо-1,5-лактона, который спонтанно гидролизуется до глюконовой кислоты. Глюкозооксидаза ($M=152\ 000$) относится к флавопротеинам. При окислении глюкозы в ее присутствии образуется пероксид водорода в эквимольном количестве:



Пероксид водорода разлагается ферментом пероксидазой, а выделившийся атомарный кислород окисляет добавленный к реакционной смеси хромогенный кислородный акцептор. В качестве такового применяют *o*-толидин:



Количественное определение глюкозы сводится к измерению экстинкции образовавшейся в опыте окисленной формы красителя и сравнению ее с таковой при использовании стандартного раствора глюкозы. Прямая зависимость между

содержанием глюкозы и интенсивностью окраски сохраняется в пределах от 50 до 400 мг/л.

Реактивы и оборудование: фотометр «Эксперт-003»; секундомер; пипетки; пробирки; 1%-ный раствор перекристаллизованного в абсолютном этаноле *о*-толидина; 0,25 н ацетатный буфер pH=4,8 (4 части 0,25 н уксусной кислоты смешивают с 6 частями 0,25 н ацетата натрия); стандартный раствор глюкозы 400 мкг/мл, приготовленный на насыщенном водном растворе бензойной кислоты; рабочий реактив для определения глюкозы энзиматическим методом¹³.

В ходе реакции развивается окраска, интенсивность которой постепенно возрастает и достигает своего максимума при комнатной температуре через несколько минут после прибавления рабочего реактива (в зависимости от активности препарата глюкозооксидазы). Поэтому предварительно определяют время, необходимое для развития *максимальной* синей окраски по стандартному раствору глюкозы с концентрацией 400 мкг/мл. Для этого регистрируют изменение во времени экстинции раствора глюкозы соответствующей концентрации после добавления рабочего реактива на фотометре при длине волны 655 нм (кювета шириной 10 мм). Сначала экстинция увеличивается, далее остается неизменной в течение нескольких минут, а затем начинает медленно уменьшаться. В соответствии с полученными данными фиксируют время, необходимое для развития максимальной окраски, и используют его в дальнейших опытах.

В пробирки, содержащие по 1 мл раствора глюкозы (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мкг/мл), и в пробирку с анализируемым раствором, поочередно (в определенной последовательности с точным интервалом в 2 минуты), приливают 3 мл рабочего реактива. Фотометрируют полученные растворы та-

¹³ *Рабочий реактив для определения глюкозы энзиматическим методом.* К 70-80 мл 0,25 н. ацетатного буфера (pH=4,8) добавляют 2 мг глюкозооксидазы и 1 мг сухой кристаллической пероксидазы. Смесь перемешивают, приливают 1 мл 1%-ного раствора *о*-толидина и доводят объем пробы до 100 мл ацетатным буфером. Реактив готовят за 1 – 2 ч до употребления. Он может храниться в холодильнике в темных закрытых склянках в течении 1–1,5 месяцев.

ким образом, что бы каждый раствор с рабочим реактивом был выдержан в течение заданного времени.

На основании полученных величин оптической плотности (экстинкции) для всех стандартных растворов глюкозы строят градуировочную зависимость. По построенной градуировочной зависимости рассчитывают количество глюкозы в исследуемых пробах.

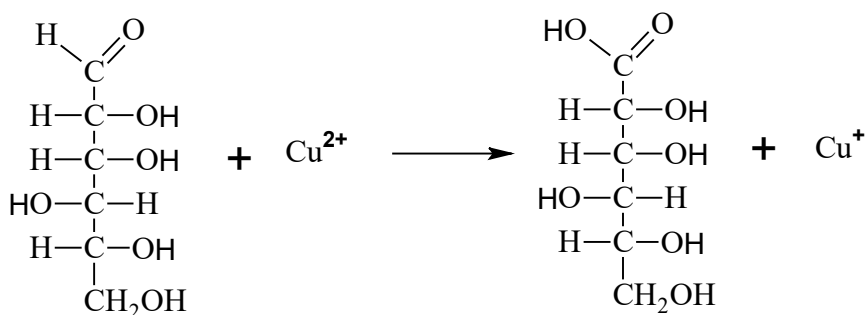
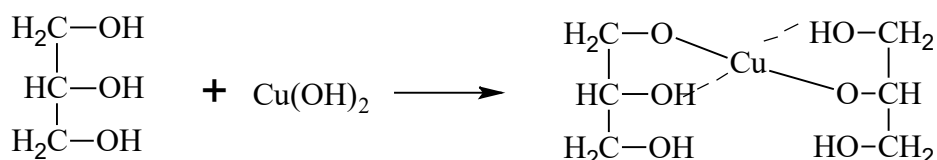
№	Стандартный (400 мкг/мл) раствор глюкозы, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация глюкозы, мкг/мл
1	0,125	0,875	50
2	0,250	0,750	100
3	0,375	0,625	150
4	0,500	0,500	200
5	0,625	0,375	250
6	0,750	0,250	300
7	0,875	0,125	350
8	1,000	-	400

Оформление работы. Описать принцип метода. Результаты измерений и найденное содержание глюкозы в испытуемом растворе занести в рабочую тетрадь.

Работа 14. Колориметрический метод определения сахаров

Все моносахариды (глюкоза, фруктоза и т.д.) и некоторые дисахариды, в том числе мальтоза и лактоза, относятся к группе редуцирующих (восстанавливающих) сахаров, т. е. соединений, способных вступать в реакцию восстановления.

Метод колориметрического определения сахаров основан на восстановлении ионов Cu^{2+} из глицерата меди редуцирующими сахарами до нерастворимого оксида меди(I) (Cu_2O) с изменением окраски с ярко синей до красно-коричневой.



Материалы исследования: растительный материал (яблоко, груша, мандарин и т.д.)

Реактивы и оборудование: раствор глицерата меди (готовят перед проведением анализа): к 40 мл раствора NaOH (0,15 г/мл) прибавляют 1 мл чистого глицерина, тщательно перемешивают, затем прибавляют 80 мл раствора сульфата меди (8 г/л); стандартный раствор глюкозы с концентрацией 5 мг/мл; 1 % раствор HCl ; автоматические пипетки переменного объема; фотометр «Эксперт-003».

Ход работы:

1. Построение градуировочного графика:

В пробирки отмеряют 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мл стандартного раствора глюкозы и доводят объем до 1 мл дистиллированной водой в соответствии с таблицей.

№	Стандартный раствор глюкозы (5 мг/мл), мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация глюкозы, мг/мл
1	0,2	0,8	1
2	0,4	0,6	2
3	0,6	0,4	3
4	0,8	0,2	4
5	1,0	-	5

Перемешивают и прибавляют во все пробирки по 10 мл раствора глицерата меди, снова перемешивают и нагревают пробирки в кипящей водяной бане ровно 6 мин. Вынимают, охлаждают пробирки в холодной воде до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность прозрачного раствора при длине волны 590 нм и толщине светопоглощающего слоя 10 мм.

На основании полученных величин оптической плотности для всех стандартных образцов глюкозы строят градуировочную зависимость.

2. Анализ исследуемого материала.

В ступке со стеклянным песком растирают навеску массой 5 г, взвешенную с точностью до 0,01 г. Затем в ступку приливают 50 мл дистиллированной воды с температурой 70 °С и тщательно перемешивают содержимое. Далее проводят анализ на содержание редуцирующих сахаров, а также суммы моно- и дисахаридов в анализируемом объекте следующим образом:

а) для определения редуцирующих сахаров отбирают в пробирку 500 мкл прозрачной вытяжки, прибавляют 500 мкл воды и 10 мл раствора глицерата меди, перемешивают. Пробирку нагревают на кипящей водяной бане 6 мин, охлаждают до комнатной температуры. После отстаивания отбирают прозрачный раствор и измеряют его оптическую плотность. По градуировочному графику определяют содержание редуцирующих сахаров. Если после кипячения вытяж-

ки полностью произошел переход окраски от синей к красно-бордовой, необходимо отобрать для анализа меньший объем прозрачной вытяжки (100-500 мкл) или провести предварительное разбавление пробы.

б) для определения суммы моно- и дисахаридов 500 мкл прозрачной вытяжки помещают в сухую пробирку, прибавляют 500 мкл 1 % раствора HCl и нагревают на кипящей водяной бане 15 мин. Затем в пробирку добавляют 10 мл глицерата меди и нагревают еще 6 мин. Пробирку охлаждают до комнатной температуры, отстаивают содержимое и измеряют оптическую плотность прозрачного раствора.

Содержание сахаров рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{a \cdot V \cdot 100}{m_{\text{нав}} 1000}$$

где а - содержание сахаров, найденное по калибровочному графику, мг;

V - общий объем вытяжки, мл (равен объему прибавленной воды);

m_{нав} - масса навески, г;

100 – коэффициент перевода в проценты;

1000 – коэффициент перевода грамм в миллиграммы.

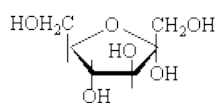
* при расчетах необходимо учесть величину разбавления.

Оформление работы: описать принцип метода и протекающие реакции. Результаты измерений и найденное содержание редуцирующих сахаров и моно- и дисахаридов в испытуемом материале занести в рабочую тетрадь.

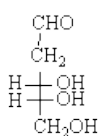
ТЕСТЫ И ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Определите, какая структура соответствует фруктозе?

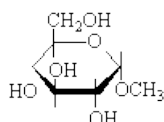
1.



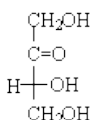
2.



3.



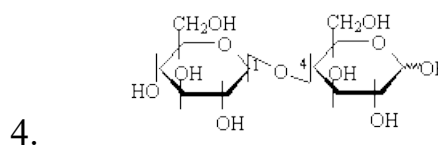
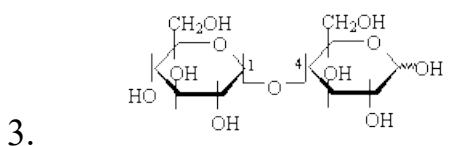
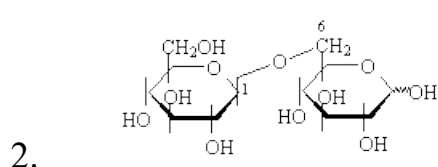
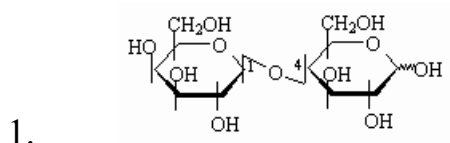
4.



2. Какова функция гликогена?

1. Является компонентом соединительной ткани
 2. Резервный источник глюкозы
 3. Выполняет рецепторные функции на поверхности мембраны
 4. Формирует клеточные стенки бактерий
3. Какое из ниже приведенных утверждений характеризует глюкозу?
1. Обычно находится в фуранозной форме
 2. Кетоза
 3. Атом углерода 2 является аномерным
 4. Является составной частью дисахарида сахарозы
4. Среди перечисленных ниже углеводов выберите полисахарид:
1. Галактоза
 2. Лактоза
 3. Фруктоза
 4. Гликоген
5. Среди перечисленных ниже углеводов выберите дисахарид:
1. Галактоза
 2. Лактоза
 3. Фруктоза
 4. Гликоген
6. Аномеры глюкозы - это:

1. Стереизомеры по 4 атому С
2. Изомеры, являющиеся зеркальным отображением друг друга
3. Изомеры, отличающиеся конфигурацией гликозидного атома углерода
4. Структурные изомеры
7. Среди приведенных структур найдите лактозу:



8. Остатки моносахаридов амилозы:

1. связаны β -1,4-гликозидными связями
2. связаны α -1,4-гликозидными связями
3. являются галактозой
4. являются галактозой и глюкозой
9. Напишите равновесие между линейными и циклическими формами, устанавливающееся при растворении кристаллической D-галактозы.

Раздел III. ЛИПИДЫ

Работа 15. Качественные реакции на липиды

Цель работы – качественно охарактеризовать пищевые липиды.

Липиды – это входящие в состав живых организмов жироподобные вещества, плохо растворимые в воде и хорошо растворимые в неполярных органических растворителях. Под этим названием объединяют разные по химическому строению и биологическим функциям вещества, которые извлекают из растительных и животных тканей путем экстракции неполярными органическими растворителями.

В зависимости от способности к гидролизу с образованием солей высших жирных кислот (мыл) липиды делят на *омыляемые* и *неомыляемые*.

Омыляемые липиды состоят из двух или более структурных компонентов, на которые они расщепляются при гидролизе под действием кислот, щелочей или ферментов липаз. Основными структурными компонентами омыляемых липидов являются спирты и высшие жирные кислоты. Омыляемые липиды более сложного строения могут содержать остатки фосфорной кислоты, аминокислот, а также остатки моно- и олигосахаридов.

К неомыляемым относят липиды, которые не являются производными жирных кислот и не способны к гидролизу. Известны две основные группы неомыляемых липидов: *терпены* и *стероиды*.

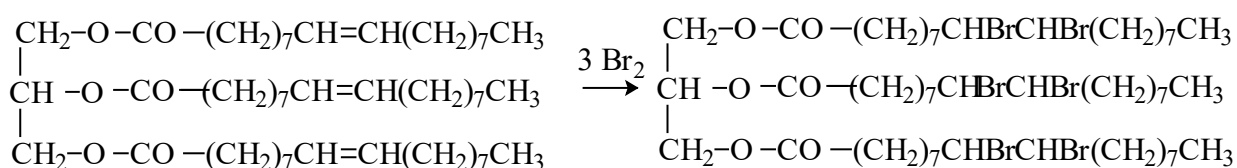
Материал исследования: растительное масло (свежее и прогорклое).

Реактивы и оборудование: 30% раствор гидроксида натрия; раствор Люголя: бромная вода; смесь ледяной уксусной кислоты с хлороформом (2:1); 2% раствора йодида калия; раствор крахмала; смесь концентрированной серной кислоты с формалином (50:1); гидросульфат калия (безводный); аммиачный раствор оксида серебра; фуксинсернистая кислота; фильтровальная бумага; дистиллированная вода; краситель судан III или осмиевая кислота; про-

бирки; пипетки; микроскоп; штатив с лапками; газоотводная трубка; газовая горелка.

Опыт 1. *Обнаружение ненасыщенных жирных кислот в подсолнечном масле*

При добавлении бромной воды к подсолнечному маслу желтая окраска брома исчезает. Реакция обусловлена наличием в растительном масле ненасыщенных жирных кислот.

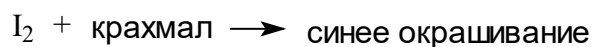
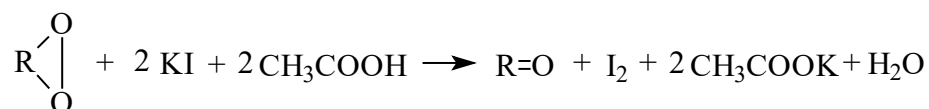


Ход работы. К 3 каплям подсолнечного масла добавляют 2 капли бромной воды, встряхивают. Следят за изменением окраски.

Опыт 2. *Открытие перекисных соединений в растительном масле*

При взбалтывании растительного масла в хлороформе в кислой среде с раствором йодистого калия, жидкость приобретает желтую окраску, которая при добавлении крахмала переходит в синюю.

Реакция обусловлена наличием в масле перекисных соединений, которые окисляют йодистый калий с образованием молекулярного йода:



Реакция может быть использована для количественного определения перекисного числа, которое является показателем несвежести масла.

Ход работы. В одну пробирку берут 2 капли свежего подсолнечного масла, в другую – несвежего. Во все пробирки добавляют по 10 капель смеси ледяной уксусной кислоты с хлороформом (2:1), по 5 капель 2% раствора йодида калия и встряхивают. Во все пробирки добавляют по каплям 0,5% раствора крахмала. Наблюдают за изменением окраски в пробирках. Результаты работы записывают в форме таблицы.

Масло подсолнечное	Окраска жидкости после добавления	
	Йодистого калия	Крахмал
Свежее		
Несвежее		

Опыт 3. *Обнаружение стероидов в растительном масле*

Эти реакции не являются строго специфичными только для холестерина: их дают и другие вещества стероидной природы.

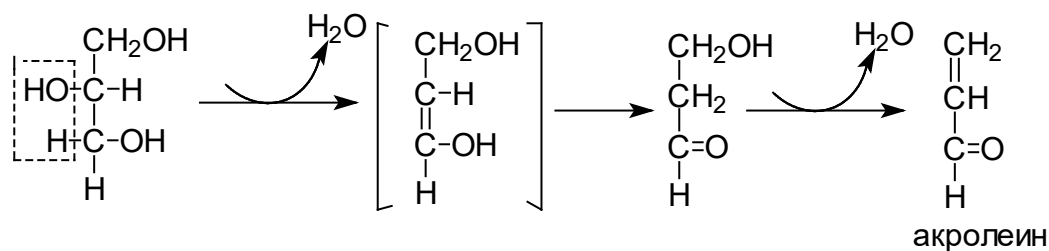
Ход работы. В сухую пробирку вносят 2 капли подсолнечного масла (жира) и 20 капель хлороформа. К раствору масла добавляют 20 капель смеси концентрированной серной кислоты с формалином (50:1) и взбалтывают. Раствор разделяется на два слоя: хлороформный вишневого цвета и слой серной кислоты красно-коричневого цвета с зеленой флюоресценцией. Наблюдают изменение окраски.

Опыт 4. *Омыление жира*

К 2 мл подсолнечного масла приливают 2 мл 30% раствора гидроксида натрия и смесь осторожно кипятят на газу 5-6 мин. Омыление считают законченным, если взятая стеклянной палочкой капля жидкости полностью растворится в дистиллированной воде с образованием обильной пены при встряхивании.

Опыт 5. *Акролеиновая проба*

Акролеиновая проба проводится для обнаружения в липидах глицерина. При нагревании глицерина в присутствии водоотнимающих агентов (гидросульфат калия, борная кислота, сульфат магния) происходит образование непредельного альдегида – акролеина:



Липиды, не содержащие глицерина (воска, стероиды) акролеиновой пробы не дают.

Ход работы. В пробирку вносят 2-3 капли масла (жира) и прибавляют пятикратное количество гидросульфата калия. Нагревают пробирку осторожно, но сильно (в вытяжном шкафу) до появления белых паров. Вносят в пробирку кусочки фильтровальной бумаги, смоченной аммиачным раствором оксида серебра и фуксинсернистой кислотой. Отмечают изменение цвета.

Опыт 6. *Качественная реакция на жиры и масла в тканях*

При добавлении осмиевой кислоты к капле масла, масло окрашивается в черный цвет. Кроме осмиевой кислоты применяют краситель судан III, который окрашивает масла в различные оттенки красного. Эти реактивы пригодны для микрохимических определений. Срезы тканей смачивают одним из них и наблюдают под микроскопом: капли масла в тканях, окрашенные в черный или красный цвет.

Ход работы. Готовят срезы животных и растительных тканей. Наносят на срезы растворы красителей, наблюдают окрашенные срезы под микроскопом. Наблюдаемую картину зарисовывают в тетради.

Работа 16. Сравнение ненасыщенности жиров

Цель работы – сравнить степень ненасыщенности различных жиров и масел.

Ненасыщенность жира зависит от присутствия в его составе непредельных жирных кислот. Ненасыщенные соединения легко присоединяют галогены.

Материал исследования: растительные масла, сливочное масло, животные жиры, маргарин.

Материалы и оборудование: весы, микробюретка, пробирки, пипетка на 3 мл, хлороформ (200 мл), иод (0,001 н) в хлороформе.

Ход работы. Отвешивают в пробирки по 0,5 г жиров. Растворяют каждый жир в 3 мл хлороформа и титруют из микробюретки 0,001 н раствором иода в хлороформе до отчетливо розовой окраски.

Оформление работы. Коротко описать принцип метода. Результаты измерений занести в рабочую тетрадь. Расположить жиры по увеличению ненасыщенности.

Работа 17. Определение йодного числа

Обычно степень ненасыщенности жиров определяют йодным числом. Йодное число измеряют массой йода (г), которое присоединяется к 100 г жира.

Йодное число является одним из наиболее важных химических показателей для масел (жиров). Оно позволяет судить о степени ненасыщенности жира, о склонности его к «высаханию», прогорканию и другим изменениям, а также о пищевой ценности жира.

Материал исследования: растительное масло (подсолнечное, оливковое, кукурузное и др.).

Материалы и оборудование: весы, пробирки, пипетка градуированная на 10 мл, колбы конические на 250 мл с пробками (4 шт), бюретка с красным (25 мл), цилиндр мерный на 100 мл, этиловый, 0,2 н. раствор йода в спирте (96%)¹⁴, раствор тиосульфата натрия (0,1 н.); крахмал (1%).

Ход работы.

В сухую коническую колбу емкостью 250 мл с пришлифованной пробкой помещают исследуемое масло. Навеску масла берут на аналитических весах следующим образом: взвешивают склянку с маслом и пипеткой отбирают из нее в колбу 3–4 капли масла и снова взвешивают. По разности масс определяют массу навески. В колбу добавляют 25 мл спирта. Если масло плохо растворяется, колбу можно погреть на водяной бане. Во второй колбе ставят «холостой опыт» (контроль), т.е. берут в нее 25 мл спирта. В каждую колбу (опыт и контроль) прибавляют по 12,5 мл 0,2 н. спиртового раствора йода (из бюретки), смешивают, приливают по 100 мл дистиллированной воды и хорошо встряхивают, закрыв пробкой. Через 5 мин содержимое колб оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата натрия сначала до появления слабо желтого окрашивания, а потом, прибавив 1 мл раствора крахмала, титруют до исчезновения синего окрашивания.

¹⁴ 5,08 г свежеприготовленного йода переносят в мерную колбу на 200 мл и растворяют в спирте.

Разность между количеством 0,1 н. раствора тиосульфата, затраченного на титрование опыта и контроля, является показателем количества йода, связанного навеской масла.

Оформление работы.

Йодное число (в г) вычисляют по формуле:

$$I = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0127 \cdot 100}{a},$$

где V_1 – объем 0,1 н раствора тиосульфата, пошедшего на титрование контроля, мл;

V_2 - объем 0,1 н раствора тиосульфата, пошедшего на титрование опытной пробы, мл;

0,0127 – титр тиосульфата по йоду;

a – навеска жира, г.

Расхождения в параллельных опытах допускаются лишь в десятых долях получаемых йодных чисел.

Оформление работы. Коротко описать принцип метода. Результаты измерений занести в рабочую тетрадь.

Работа 18. Определение состава биосурфактантов методом тонкослойной хроматографии

Цель работы – охарактеризовать бактериальные биоПАВ гликолипидной природы методом тонкослойной хроматографии.

Биосурфактанты (био-ПАВ) – это поверхностно-активные вещества биологического происхождения. Продуцентами биосурфактантов являются микроорганизмы, растения и животные. По химическому строению поверхностно-активные вещества представляют собой амфифильные молекулы, имеющие тенденцию к образованию конгломератов и активно взаимодействовать с поверхностями различной полярности. Основным химическим свойством ПАВ является дифильность молекулы: одна часть молекулы – гидрофобная или неполярная – обычно представлена углеводородным радикалом, не обладающим сродством к воде; другая часть молекулы – гидрофильная или полярная, обладает высоким сродством к воде.

Таблица 1. Классификация биосурфактантов

Тип биосурфактанта			Микроорганизмы-продуценты
Низкомолекулярные	Гликолипиды	Рамнолипиды	<i>Pseudomonas</i>
		Трегалоллипиды	<i>Rhodococcus</i>
		Софоролипиды	<i>Candida</i>
	Гликопептиды	Орнитин- и серин-содержащие	<i>Flavobacterium, Rhodopseudomonas, Serratia, Pseudomonas</i>
		Сурфактин, грамицидин, полимиксин	<i>Bacillus</i>
		Вискозин, путисолвин	<i>Pseudomonas</i>
Полимерные	Прочие	Жирные кислоты, фосфолипиды, триглицериды	<i>Corynebacterium, Acinetobacter, Micrococcus, Rhodococcus, Candida, Penicillium, Aspergillus</i>
	—	Эмульсан	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
		Аласан	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
		Липосан	<i>Candida lipolytica</i>

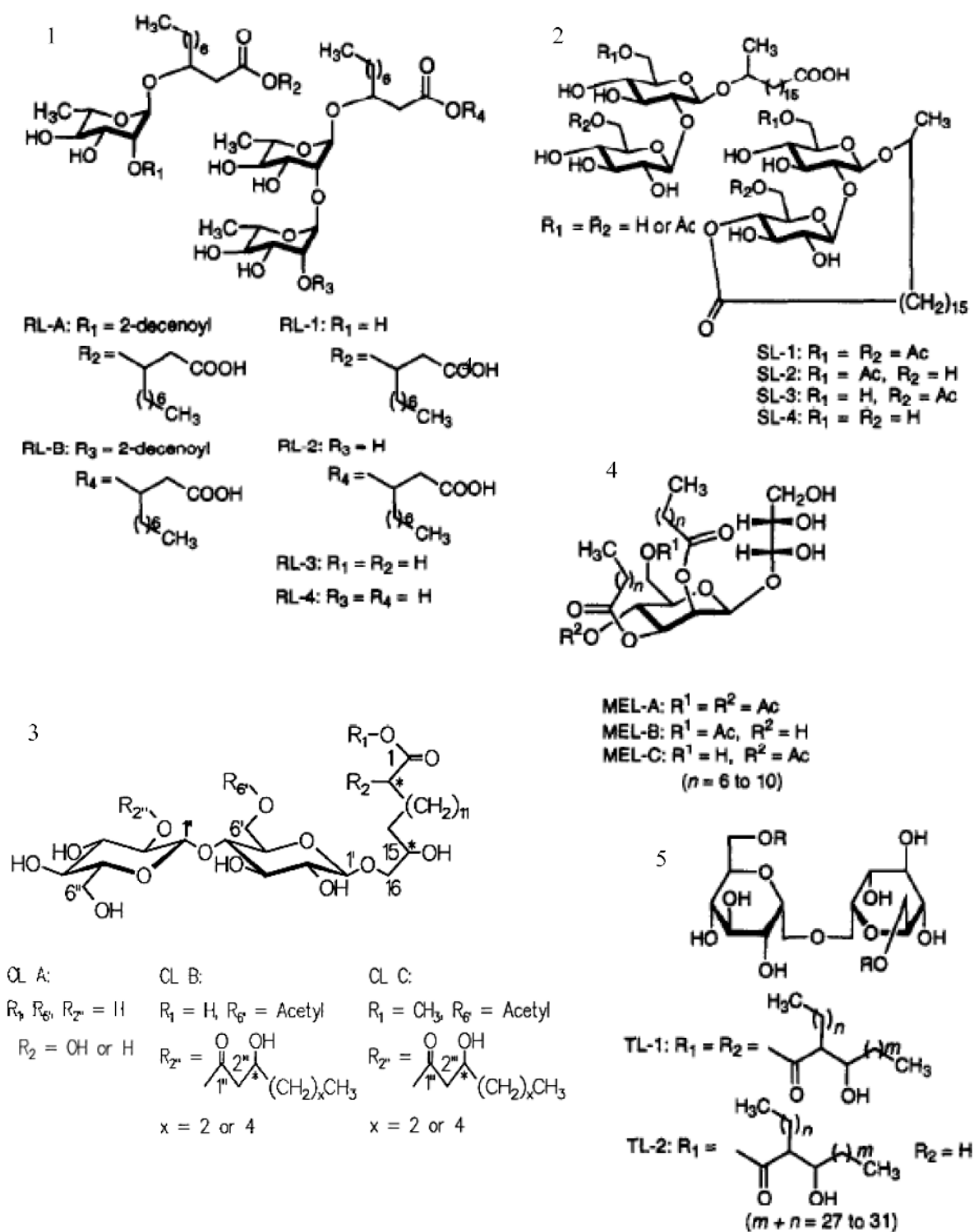


Рис. 3. Химическая структура гликолипидных биосурфактантов

1 – Рамнолипиды RL-1, RL-2, RL-3 и RL-4 из *Pseudomonas aeruginosa*;
 2 – софоролипиды SL-1, SL-2, SL-3 и SL-4 из *Candida bombicola*;
 3 – целлобиозолипиды CL-A, CL-B и CL-C из *Ustilago maydis*; 4 – маннозил-эритритоллипиды MEL-A, MEL-B и MEL-C из *Pseudozyma antarctica*;
 5 – трегалозолипиды TL1 и TL2 из *Rhodococcus erythropolis*.

Реактивы и оборудование: капилляры, хроматографическая камера, установка для проявления хроматограмм нагреванием, стеклянные емкости для приготовления систем хроматографирования и проявления, пинцет, стеклянные чашки Петри, силуфол или другие хроматографические пластины; система для разделения: хлороформ-метано-вода (60-25-4); системы для проявления: 1) концентрированный раствор перманганата калия, 2) система для проявления углеводов¹⁵; экстракты биосурфактантов; стандарты – растворы трегалозы и рамнозы.

Ход работы.

1. На хроматографической пластине карандашом по линейке на 1 см выше нижнего края пластины отмечают линию нанесения образцов. Капиллярами наносят растворы анализируемых веществ по линии разметки на расстоянии 0,7 - 1 см друг от друга. Высушивают растворитель и помещают пластину в заранее подготовленную камеру с системой растворителей, оставляют пластину до тех пор, пока растворители не поднимутся до верхнего края пластины. Пластины высушивают и проявляют.

2. Для обнаружения непредельных соединений пластину пинцетом опускают в раствор перманганата калия, а затем промывают под струей водопроводной воды.

3. Для обнаружения углеводных компонентов в анализируемых соединениях используют специфический обнаружитель - α -нафтол.

4. Хроматограмму опрыскивают раствором α -нафтола до увлажнения слоя силикагеля, высушивают на воздухе и слегка опрыскивают раствором серной кислоты. Нагревают в сушильном шкафу при 120°C до максимального проявления окраски. Гликолипиды (цереброзиды, сульфатиды, ганглиозиды, гли-

¹⁵ **Реагенты.** α -Нафтол. В 100 мл смеси метанол-вода (1:1) растворяют 0.5 г α -нафтола, перекристаллизованного из смеси гексан-хлороформ.

Серная кислота. Концентрированную серную кислоту разбавляют водой в соотношении 10:90 (по объему).

козилдиглицериды и т.д.) проявляются сине-фиолетовыми, другие полярные липиды - желтыми, а холестерин - серо-красными пятнами.

ТЕСТЫ И ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Жирные кислоты имеют следующие точки плавления: стеариновая ($+69,6^{\circ}\text{C}$), олеиновая ($+13,4^{\circ}\text{C}$), линолевая (-5°C), линоленовая (-11°C). Какими структурными особенностями определяется та или иная температура плавления этих кислот?
 1. Разным числом атомов углерода в молекулах кислот
 2. Разной степенью ненасыщенности радикалов жирных кислот
 3. Наличием разных функциональных групп
 4. Разветвленностью углеродного скелета
2. В результате гидролиза молекулы липида образовались: молекула сфингозина, молекула линоленовой кислоты, фосфорная кислота, холин. Написать структурную формулу липида и определить, к какому классу липидов он относится (триацилглицеролы, фосфогицериды, фосфосфинголипиды или гликолипиды).
3. В результате гидролиза молекулы липида образовались: молекула стеариновой кислоты, молекула линолевой кислоты, молекула глицерина, молекула фосфорной кислоты, этаноламин. Написать структурную формулу липида и определить, к какому классу липидов он относится (триацилглицеролы, фосфогицеролы, фосфосфинголипиды или гликолипиды).
4. В результате гидролиза молекулы липида образовались: молекула сфингозина, молекула олеиновой кислоты, фосфорная кислота, этаноламин. Написать структурную формулу липида и определить, к какому классу липидов он относится (триацилглицеролы, фосфогицериды, фосфосфинголипиды или гликолипиды).
5. В результате гидролиза молекулы липида образовались: молекула стеариновой кислоты, две молекулы линолевой кислоты, молекула глицерина. Написать структурную формулу липида и определить, к какому классу липидов

он относится (триацилглицеролы, фосфогицериды, фосфосфинголипиды или гликолипиды).

6. Выберите незаменимую жирную кислоту:

1. стеариновая
2. пальмитиновая
3. олеиновая
4. линоленовая

7. Среди перечисленных жирных кислот выберите насыщенные:

1. масляная
2. олеиновая
3. арахидоновая
4. пальмитиновая

8. Среди перечисленных жирных кислот выберите ненасыщенные:

1. стеариновая
2. олеиновая
3. линоленовая
4. пальмитиновая

9. 1 моль триацилглицерида может присоединить 3 моль брома. Укажите триацилглицериды, удовлетворяющие этому условию:

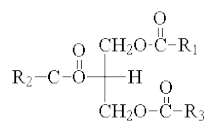
1. триолеиноилглицерин
2. дипальмитоиллиноленоилглицерин
3. тристеароилглицерин
4. трипальмитоилглицерин

10. При полном гидролизе омыляемого липида образовались: глицерин, пальмитиновая кислота, олеиновая кислота, фосфорная кислота и этаноламин. К какому классу омыляемых липидов он относится:

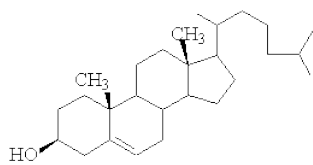
1. гликолипиды
2. фосфосфинголипиды
3. триацилглицериды
4. фосфоглицериды

11. Укажите структуру, соответствующую гликолипидам:

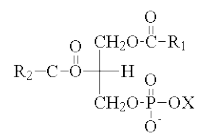
1.



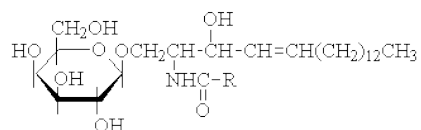
3.



2.



4.



Раздел IV. ФЕРМЕНТЫ

Ферменты (энзимы) – это биологические катализаторы, представляющие собой простые или сложные белки. Простетическая группа сложных белков может быть представлена ионами металлов (*кофакторы*) или различными органическими соединениями (*коферменты*).

Наука, занимающаяся изучением ферментов, называется *энзимологией*.

В трехмерной структуре фермента различают ряд участков, выполняющих определенные функции. Связывание и химическое превращение субстрата происходит в *активном центре* фермента, в котором различают *связывающий* и *каталитический* участки. *Регуляторный* или *аллостерический* центр фермента служит для модификации фермента под действием различных эффекторов.

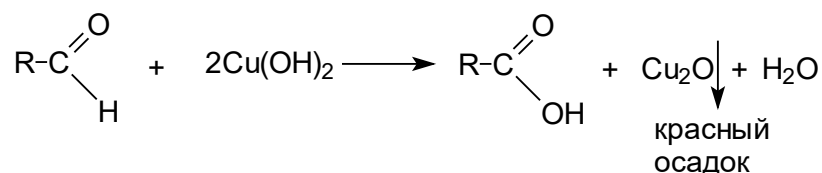
Ферменты содержатся во всех тканях, клетках и биологических жидкостях. Без них не осуществляется ни один химический процесс в организме.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Работа 19. Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов

Главное отличие ферментов от катализаторов небиологической природы состоит в исключительно высокой каталитической активности и ярко выраженной специфичности действия, что обусловлено особенностями строения и механизмом их действия.

Под действием фермента амилазы слюны в ротовой полости начинается процесс переваривания углеводов. Этот фермент эффективно катализирует гидролиз α -(1 \rightarrow 4)-связей в молекуле крахмала, расщепляя полисахарид на олигосахариды и дисахариды - мальтозу и изомальтозу. Мальтоза и изомальтоза являются восстанавливающими дисахаридами могут быть обнаружены по реакции Троммера:



Негидролизированный крахмал можно обнаружить по реакции с йодом, который взаимодействует с крахмалом с образованием синего комплекса.

Ионы водорода (H^+) также являются катализаторами процесса гидролиза. Однако, их действие менее эффективно и неспецифично. В результате гидролиза образуется смесь олигосахаридов и глюкозы. Глюкоза также дает реакцию Троммера.

Цель работы – сравнить эффективность биокатализаторов – ферментов с неорганическими катализаторами.

Материал исследования: раствор амилазы слюны (биологический катализатор), 10% раствор соляной кислоты (неорганический катализатор).

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостат, кипящая водяная баня, раствор Люголя, 10% раствор гидроксида натрия, 1% раствор сульфата меди, крахмал 1% в 0,3% хлориде натрия, дистиллированная вода.

Ход работы.

В три пробирки наливают по 5 мл 1% раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую - 1 мл 10% соляной кислоты, а в третью – 1 мл раствора амилазы. Пробирки 1 и 3 помещают в термостат при $t = 38^\circ\text{C}$, а пробирку 2 – в кипящую водяную баню. Через 15–20 мин все пробирки вынимают, охлаждают и из каждой берут пробы на крахмал и восстанавливающие сахара.

Для этого на предметное стекло наносят по капле раствора из трех пробирок и добавляют к каждой по капле раствора Люголя. По интенсивности окраски делают заключение о степени гидролиза.

Для определения восстанавливающих сахаров из каждой пробирки отбирают по 1 мл раствора и добавляют 0,5 мл раствора гидроксида натрия и 5 капель раствора сульфата меди. Нагревают пробирки до кипения.

Оформление работы. Наблюдают за изменением окраски растворов и записывают наблюдения в таблицу и делают вывод.

№ пробы	реакция на крахмал	реакция Троммера
Проба 1		
Проба 2		
Проба 3		

Работа 20. Качественные пробы на присутствие ферментов

Цель работы – ознакомиться с методами обнаружения ферментов.

Ферменты в биологических препаратах и жидкостях можно обнаружить по появлению продукта реакции, которую катализирует данный фермент.

Опыт 1. *Открытие амилазы в слюне*

Материал исследования: разбавленная слюна.

Реактивы и оборудование: водяная баня, стеклянная воронка, цилиндр на 50 мл, стаканы лабораторные, пробирки, 1% раствор крахмала, реактив Люголя.

Ход работы.

1. Приготовление разбавленной слюны.

Рот ополаскивают 2–3 раза водой для удаления остатков пищи. В мерную пробирку вносят 1 мл слюны и добавляют 9 мл дистиллированной воды.

2. Гидролиз крахмала под действием амилазы слюны.

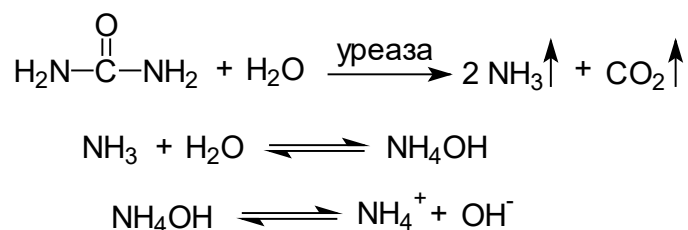
В две пробирки наливают по 5 мл раствора крахмала и в одну из них – 5 мл воды, а в другую – 5 мл раствора слюны. Обе пробирки помещают в водяную баню при 40°C. Через 1 мин от каждой смеси отбирают по капле жидкости и смешивают с каплей реактива Люголя, заранее нанесенного на стеклянную пластинку. Повторяют операцию через 2, 4, 6, 8 мин. Наблюдают за изменением окраски после добавления.

Оформление работы. Результаты наблюдений заносят в таблицу и делают выводы о наличии фермента в слюне.

Время инкубации	Окраска с реактивом Люголя	
	Контрольная проба	Исследуемая проба
1 мин		
2 мин		
4 мин		
6 мин		
8 мин		

Опыт 2. *Открытие уреазы в соевой муке*

Уреаза (карбамид-амидогидролаза; КФ 3.5.1.5) катализирует расщепление мочевины до CO_2 и NH_3 . Появление аммиака смещает рН в щелочную зону, что обнаруживается с помощью индикатора – фенолфталеина.



Материал исследования: уреазы, содержащаяся в соевой муке.

Реактивы и оборудование: термостат, пипетки, пробирки, 1% водный раствор мочевины, 1% спиртовой раствор фенолфталеина.

Ход работы.

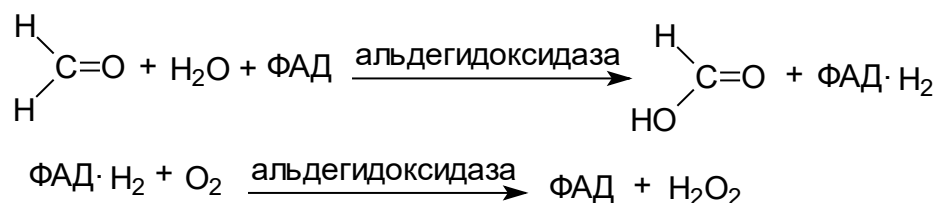
В две пробирки отмеривают по 2 мл 1% раствора мочевины, затем в каждую пробирку добавляют по 2 капли фенолфталеина и по 100 мг соевой муки. Обе пробирки хорошо перемешивают. Одну пробирку ставят в термостат при 38°C на 30 мин. Содержимое второй пробирки кипятят на водяной бане.

Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов и записывают наблюдения в таблицу.

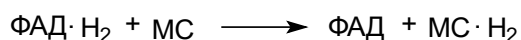
Проба	Наблюдаемая окраска
Свежий раствор уреазы	
Прокипяченный раствор уреазы	

Опыт 3. *Открытие альдегидоксидазы в сыром молоке*

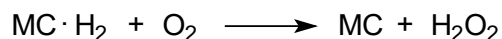
Альдегидоксидаза катализирует реакцию дегидрирования различных альдегидов, например формальдегида. Водород переносится на ФАД, являющийся коферментом данного фермента, а затем на конечный акцептор – кислород:



При добавлении метиленового синего (МС) – искусственного акцептора водорода – в бескислородных условиях образуется его бесцветная восстановленная форма (лейкоформа) $МС \cdot H_2$:



Если бесцветный раствор встряхнуть, то он опять приобретает голубую окраску:



Материал исследования: свежее коровье молоко.

Реактивы и оборудование: термостат, пипетки, пробирки, 0,4% раствор формальдегида, дистиллированная вода, 0,01% раствор метиленового синего.

Ход работы.

В три пробирки наливают по 5 мл свежего коровьего молока. Одну пробирку кипятят в течение 2–3 мин и остужают. В прокипяченную пробу и в одну из некипяченных проб добавляют по 1 мл 0,4% раствора формальдегида, а в другую некипяченную – 1 мл воды. Затем во все три пробирки приливают по 1 мл 0,01% раствора метиленового синего. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и заливают в каждую по 3–4 капли вазелинового масла для предохранения жидкости от соприкосновения с кислородом воздуха. Все пробирки помещают в водяную баню, нагретую до 40°C.

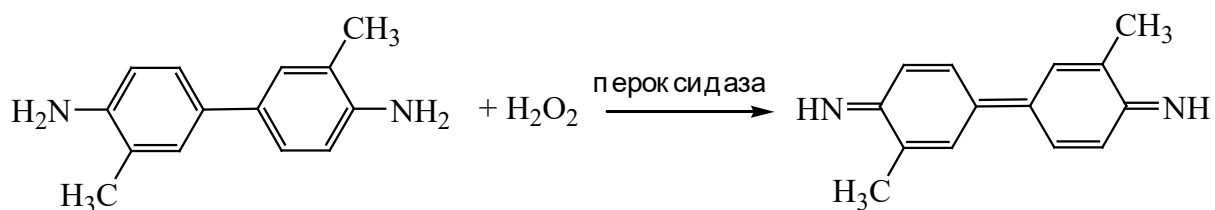
Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов и записывают наблюдения в таблицу.

Молоко	Раствор формальдегида	H ₂ O	Наблюдения
Кипяченое	1 мл	-	
Свежее	1 мл	-	
Свежее	-	1 мл	

Опыт 4. *Открытие пероксидазы в хрене, картофеле, молоке*

Пероксидаза катализирует окислительно-восстановительные реакции и использует H₂O₂ в качестве акцептора атомов водорода. Метод обнаружения

основан на появлении темно-синего окрашивания вследствие окисления о-толидина под действием фермента пероксидазы:



Материал исследования: свежее коровье молоко, сырой картофель, хрен.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, спиртовой раствор о-толидина, 0,5% раствор пероксида водорода.

Ход работы.

- В одну пробирку помещают 1 мл раствора экстракта хрена¹⁶, во вторую - свежего молока, в третью – тертого картофеля. Добавляют во все пробирки по 5 капель спиртового раствора о-толидина и затем 2 капли раствора пероксида водорода.

Оформление работы. Наблюдения записывают в таблицу. Делают выводы о присутствии фермента в исследуемых образцах.

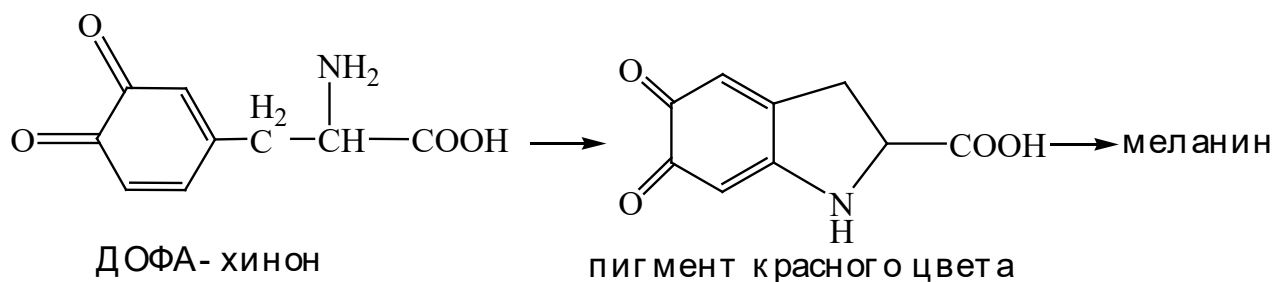
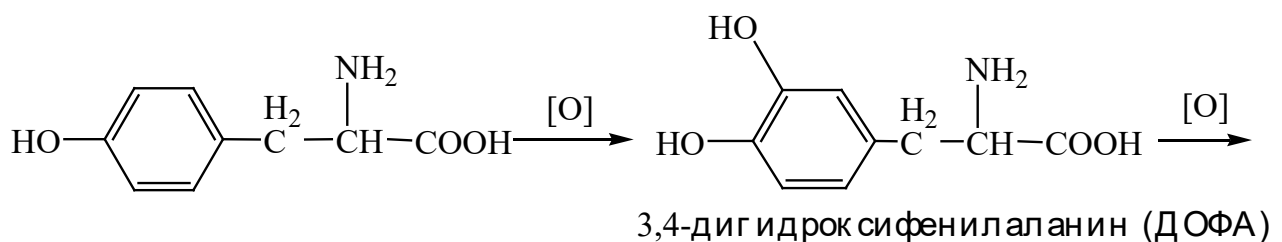
Материал исследования	Наблюдения
Экстракт хрена	
Молоко	
Сырой картофель	

Опыт 5. Обнаружение тирозиназы в картофеле

Качественные реакции на окислительно-восстановительные ферменты позволяют определить участие этих ферментов в окислительно-восстановительных процессах. Фермент тирозиназа (монофенолоксидаза) является металлопорфирином, содержащим медь в активном центре. Фермент обладает групповой специфичностью и катализирует окисление многих фенолов: тирозина, адреналина и др. кислородом воздуха.

¹⁶ корень хрена натирают на мелкой терке и настаивают с небольшим количеством воды в течение 1 ч, после чего фильтруют.

При окислении тирозина образуются продукты красного цвета, которые затем превращаются в черный пигмент – меланин:



Материал исследования: картофель (сырой и вареный).

Реактивы и оборудование: 1% раствор тирозина, пробирки, пипетки.

Ход работы. На поверхность среза сырого и вареного картофеля нанести 1-2 капли раствора тирозина. Наблюдать за изменением окраски.

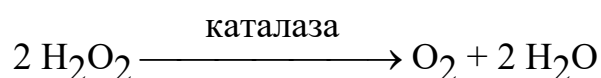
Оформление работы:

При оформлении указывают фермент, кофермент, донор и акцептор электронов в ткани, донор и акцептор электронов в опыте, а также заносят наблюдения в таблицу.

Исследуемый материал	Наблюдения
Сырой картофель	
Вареный картофель	

Опыт 6. Открытие каталазы

Каталаза крови способна катализировать реакции разложения перекиси водорода с выделением кислорода.



Реактивы и оборудование: 1% раствор перекиси водорода, пробирки, пипетки.

Материал: цельная кровь, ферментный препарат алкогольоксидазы.

Ход работы. В одну пробирку налить 1 –2 мл 1% раствора перекиси водорода и добавить 1 каплю ферментного препарата. Происходит бурное пенообразование в результате выделения кислорода.

В другую пробирку к 1-2 мл 1% раствора перекиси водорода добавить 1-2 капли предварительно прокипяченного ферментного препарата. Пенообразование при этом будет отсутствовать.

Оформление работы. При оформлении указывают фермент, кофермент, донор и акцептор электронов, а также заносят наблюдения в таблицу.

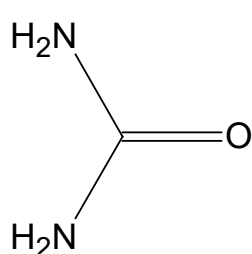
Исследуемый материал	Наблюдения
Ферментный препарат	
Прокипяченный ферментный препарат	

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

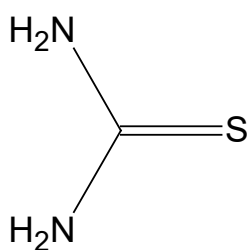
Работа 21. Абсолютная специфичность уреазы

Цель работы – выяснить основные виды субстратной специфичности ферментов.

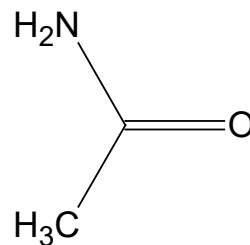
Метод основан на определении аммиака, образующегося под действием уреазы соевой муки на мочевины. Выделение аммиака обнаруживается по запаху и по изменению окраски фенолфталеина. Для подтверждения абсолютной специфичности уреазы сравнивают возможность гидролиза уреазой веществ, сходных по строению с мочевиной:



мочевина



тиомочевина



ацетамид

Материал исследования: соевая мука, соевое молоко.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, 1% раствор тиомочевины, 1% раствор мочевины, 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина или универсальная индикаторная бумага.

Ход работы.

В одну пробирку помещают 1 мл раствора мочевины, во вторую - тиомочевины. В каждую добавляют примерно 100 мг соевой муки и 2 капли раствора фенолфталеина, тщательно перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре.

Оформление работы. Записать наблюдения в таблицу. Написать протекающие в процессе опыта реакции. Сделать вывод.

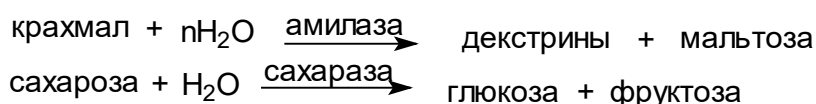
Фермент	Субстрат	Пробы на аммиак	
		фенолфталеин	запах

Работа 22. Специфичность действия амилазы и сахаразы

Цель работы – выяснить основные виды субстратной специфичности ферментов.

Метод основан на сравнительном изучении гидролиза α -амилазой и сахарозой разных субстратов, содержащих гликозидные связи: крахмала и сахарозы.

Ферменты катализируют реакции по схеме:



Материал исследования: раствор амилазы¹⁷, 1% раствор сахаразы

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметное стекло, термостат, 2% раствор сахарозы, 1% раствор крахмала, раствор Люголя, 1% раствор сульфата меди, 10% раствор гидроксида натрия.

Ход работы.

Нумеруют четыре пробирки. В пробирки 1 и 2 наливают 2 мл раствора крахмала; в пробирки 3 и 4 – по 2 мл раствора сахарозы. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 0,5 мл раствора амилазы, а в пробирки 2 и 4 – по 0,5 мл раствора сахаразы. Перемешивают содержимое и ставят на 10 мин в водяную баню при $t = 40^\circ\text{C}$. После охлаждения проводят реакции с йодом на присутствие крахмала в пробах 1 и 2 и восстанавливающих сахаров (реакция Троммера) – в пробах 3 и 4.

Оформление работы. Наблюдения записывают в таблицу и делают вывод о специфичности действия исследуемых ферментов.

№ пробы	Фермент	Субстрат	Проба на крахмал	Реакция Троммера
1	амилаза	крахмал		
2	сахараза	крахмал		
3	амилаза	сахароза		
4	сахараза	сахароза		

¹⁷ Рот ополаскивают водой для удаления остатков пищи. Отмеряют цилиндром 50 мл дистиллированной воды и ополаскивают ею рот в течение 3-5 мин в несколько приемов. Собранную жидкость фильтруют через вату или фильтр.

ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ОТ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ

Ферменты характеризуются высокой каталитической активностью, специфичностью действия, чувствительностью к изменению внешних факторов (температура, pH, ионная сила, действие ингибиторов и активаторов).

Работа 23. Влияние температуры на активность ферментов

Цель работы – выявить зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.

Скорость ферментативных реакций увеличивается при увеличении температуры до определенного предела. При высоких температурах наступает тепловая денатурация ферментов и скорость реакций, которые они катализируют, падает до нуля.

Скорость расщепления крахмала амилазой можно контролировать, используя реакцию крахмала с йодом.

Материал исследования: раствор амилазы слюны

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостат с $t = 40^{\circ}\text{C}$, кипящая водяная баня, баня со льдом, 1% раствор крахмала, реактив Люголя.

Ход работы.

Приготовление раствора амилазы слюны: рот ополаскивают 2–3 раза водой для удаления остатков пищи. В мерную пробирку вносят 1 мл слюны и добавляют 9 мл дистиллированной воды.

Наливают в 4 пробирки по 2 мл раствора крахмала и еще в 4 пробирки по 0,5 мл раствора амилазы. Первую пару пробирок (одна - с ферментом, другая - с крахмалом) помещают в баню со льдом, вторую пару оставляют при комнатной температуре, третью пару пробирок помещают в термостат при 40°C , четвертую - в кипящую водяную баню.

2. Через 5 мин содержимое каждой пары пробирок сливают вместе и оставляют на 5 мин в тех же условиях.

3. Через 1 мин из каждой пробирки отбирают каплю жидкости на предметное стекло и добавляют к ней каплю реактива Люголя. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще на 1 мин и после этого все повторяют. При необходимости увеличивают время инкубации.

4. После исчезновения фиолетового окрашивания записывают время реакции при каждой температуре.

Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов, записывают наблюдения в таблицу и делают вывод.

№ пробы	Температура инкубации, °С	Время реакции, мин
1	0	
2	20	
3	40	
4	100	

Работа 24. Влияние ингибиторов на активность ферментов

Цель работы – оценить влияние тяжелых металлов на активность ферментов

Ионы меди - ингибиторы фермента амилазы. При добавлении Cu^{2+} к реакционной смеси снижается скорость ферментативной реакции. Степень расщепления крахмала амилазой контролируют, используя реакцию крахмала с йодом.

Материал исследования: раствор амилазы слюны

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостат с температурой 40°C, 1% раствор крахмала, 1% раствор сульфата меди, реактив Люголя.

Ход работы.

Приготовление раствора амилазы слюны: рот ополаскивают 2–3 раза водой для удаления остатков пищи. В мерную пробирку вносят 1 мл слюны и добавляют 9 мл дистиллированной воды.

1. В две пробирки наливают по 1 мл раствора крахмала. В одну пробирку добавляют 5 капель раствора сульфата меди, в другую - 5 капель воды, затем в обе пробирки добавляют по 1 мл раствора амилазы и засекают на секундомере время от начала реакции.

2. Полноту прохождения гидролиза контролируют по раствору в пробирке без ингибитора. Для этого через каждую минуту отбирают пипеткой каплю реакционной массы на предметное стекло и добавляют к ней каплю реактива Люголя. Как только начнет исчезать синее окрашивание в контрольном растворе, проверяют степень прохождения ферментативного гидролиза в пробирке с ингибитором.

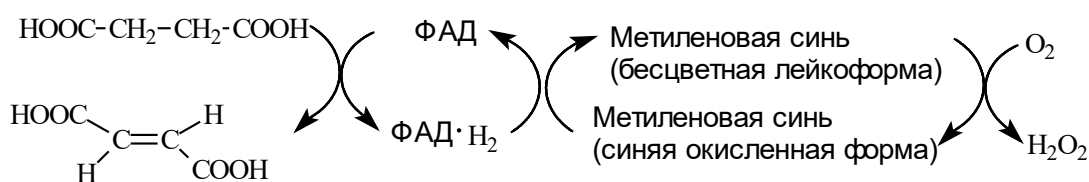
Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов, записывают наблюдения в таблицу и делают вывод.

Фермент	Субстрат	Время инкубации, мин	Окраска раствора после добавления йода	
			без ингибитора	с ингибитором
Амилаза	Крахмал	1		
		2		
		3		
		4		

Работа 25. Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной активности

Цель работы – рассмотреть механизмы конкурентного ингибирования ферментов.

Сукцинатдегидрогеназа мышц является железофлавопротеином, одним из компонентов цепи переноса электронов. Этот фермент локализован в митохондриях. Субстратом сукцинатдегидрогеназы является янтарная кислота, которая окисляется до фумаровой кислоты. В роли искусственного акцептора атомов водорода выступает метиленовая синь. Окисленная форма метиленового синего окрашена в синий цвет, а восстановленная лейкоформа бесцветна. Малоновая кислота является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы. При добавлении к реакционной смеси ингибитора, синяя окраска исчезает медленнее.



Реактивы и оборудование: дистиллированная вода, 0,01 н раствор янтарной кислоты (нейтрализованный NaOH до pH 7,0), 0,01 н раствор малоновой кислоты (нейтрализованный NaOH до pH 7,0), 0,05% раствор метиленового синего, вазелиновое масло, фосфатный буфер (pH 6,8), ножницы, ступка, пробирки, пипетки, термостат.

Материал исследования: мышечная ткань.

Ход работы. Для получения ферментного препарата 1-2 г свежей мышцы, измельченной ножницами, растирают в ступке. Полученную массу равномерно распределяют в три пробирки.

Затем в пробирки приливают реактивы по схеме, приведенной в таблице:

№ пробы	Буфер (V, мл)	Янтарная кислота (V, мл)	H ₂ O (V, мл)	Малоновая кислота (V, мл)	Метиленовая синь (V, мкл)
1 (субстрат)	1	1	1	-	100
2 (субстрат и ингибитор)	1	1	-	1	100
3 (без субстрата и без ингибитора)	1	-	2	-	100

Содержимое пробирок тщательно перемешивают.

В заполненные пробирки слоем около 1 см наливают вазелиновое масло, чтобы избежать окисления красителя кислородом воздуха. Пробирки помещают в термостат при 40 °С на 5-20 мин. (зависит от активности фермента).

Оформление работы:

При оформлении указывают фермент, кофермент, субстрат, ингибитор, донор и акцептор электронов в ткани, донор и акцептор электронов в опыте, а также заносят в тетрадь таблицу, добавив графу с наблюдениями.

Работа 26. Влияние pH на активность амилазы слюны

Цель работы – выявить влияние водородного показателя на ферментативную активность.

Оптимум pH для действия амилазы слюны можно определить при взаимодействии ее с крахмалом при различных значениях pH среды. О степени расщепления крахмала можно судить по реакции крахмала с раствором йода в течение времени. При оптимальном значении pH расщепление крахмала происходит полностью (фиолетовая окраска с йодом отсутствует). По мере удаления от точки оптимального pH в кислую или щелочную зону расщепление крахмала произойдет только частично до стадии декстринов (красно-бурая или фиолетовая окраска) или крахмал вообще расщепляться не будет (синяя окраска.)

Материал исследования: амилаза слюны.

Реактивы: крахмал, раствор Люголя; дистиллированная вода; растворы фосфатного буфера с разным значением pH (5,4 — 8,0).

Оборудование: стеклянные палочки; пипетки, пробирки; предметные стекла.

Ход работы.

Приготовление раствора амилазы слюны: рот ополаскивают 2–3 раза водой для удаления остатков пищи. В мерную пробирку вносят 1 мл слюны и добавляют 9 мл дистиллированной воды.

1. Перед началом работы определяют активность амилазы слюны. Для этого смешивают 1 мл раствора крахмала и 0,5 мл разбавленной 1: 10 слюны. Через каждые 2 мин отбирают по 1 капле этой смеси и смешивают ее с каплей раствора йода на предметном стекле. Крахмал должен полностью расщепляться приблизительно за 10 мин (появляется желтая окраска при пробе с йодом). Если расщепление происходит быстрее, слюну надо развести еще в 2, 3 или 4 раза.

2. В восемь пронумерованных пробирок добавляют по 2 мл фосфатного буфера с различным pH (от 5,4 до 8,0):

№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	5,4	5,8	6,2	6,6	6,8	7,0	7,4	8,0

Следует помнить, что при отмеривании разных буферных растворов нельзя пользоваться одной пипеткой. Необходимо использовать каждый раз чистую пипетку (или наливать из бюретки).

3. В каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора крахмала и по 0,5 мл приготовленного раствора слюны (разбавленного в зависимости от активности амилазы 1:10; 1:20; 1:50; см. п. 1). Содержимое пробирок хорошо взбалтывают.

4. Через 1 мин из каждой пробирки отбирают каплю жидкости на предметное стекло и добавляют к ней каплю раствора йода. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще на 1 мин и после этого все повторяют. Определяют время реакции в каждой пробирке до появления красноватого окрашивания.

Оформление работы. Наблюдения заносят в лабораторный журнал в виде таблицы.

pH	5,4	5,8	6,2	6,6	6,8	7,0	7,4	8,0
Время реакции, мин								

Делают вывод об активности фермента при различных значениях pH среды.

Работа 27. Количественное определение активности грибных амилаз

Цель работы – освоить методы определения активности амилаз, используемые в пищевой промышленности.

Иногда для характеристики ферментных препаратов используют условные единицы активности. Так, для осахаривания зерна в процессе получения спирта используют ферментные препараты – грибные амилазы. Для сравнительного определения активности грибных амилаз используют метод Вольгемута. Метод основан на выявлении предельного разбавления раствора амилазы, при котором еще происходит в стандартных условиях расщепление определенного количества крахмала до эритродекстрина. Условные единицы активности амилаз выражают амилазным числом. Метод Вольгемута используют также для определения амилазной активности в биологических жидкостях.

Материал исследования: разбавленный (1:50) препарат грибных амилаз для использования на спиртовых заводах

Реактивы: 1%-ный крахмал в 1%-ном хлориде натрия; 10%-ная серная кислота; раствор Люголя.

Оборудование: термостат на 37°C; штатив лабораторный с пробирками; пипетки.

Ход работы.

Нумеруют 12 пробирок и вносят в каждую из них по 1 мл воды. Далее в пробирку 1 добавляют 1 мл препарата амилаз и хорошо перемешивают. Затем 1 мл жидкости из пробирки 1 переносят в пробирку 2. Жидкость в пробирке 2 также тщательно перемешивают и 1 мл жидкости из нее переносят в пробирку 3 и т.д. Из последней (12-й) пробирки 1 мл смеси выливают. В каждую пробирку вносят по 2 мл 1%-ного раствора крахмала. Все пробирки помещают в термостат при 37°C на 30 мин, а затем в них прибавляют по 1 мл 10%-ной серной кислоты (для прекращения действия фермента) и по 1-2 капли раствора Люголя.

Оформление работы. Наблюдения заносят в лабораторный журнал в виде таблицы, обозначая синюю, красную и желтую окраску буквами «с», «к» и «ж».

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Разведение вытяжки в пробирках	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/65	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Окраска раствора												

Отмечают, при каком разведении произошел полный гидролиз крахмала, т. е. находят пробирку с желтой окраской, за которой следует пробирка с красно-фиолетовой окраской (неполный гидролиз). Допустим, что найденная граница лежит между пробирками 7 и 8 (т. е. в пробирке 7 раствор окрашен в желтый цвет). Умножив величину разбавления (в данном случае 128) на 2 (количество миллилитров раствора крахмала в опыте), получим амилазное число для данного ферментного препарата: $128 \times 2 = 256$, т. е. под влиянием амилаз, содержащихся в 1 мл неразбавленной вытяжки, произошло расщепление 256 мл 1%-ного раствора крахмала.

ТЕСТЫ И ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Простые ферменты состоят из:

1. аминокислот
2. аминокислот и углеводов
3. липидов
4. углеводов
5. аминокислот и небелковых компонентов
6. липидов и углеводов

2. Какие из перечисленных ниже утверждений характеризуют апофермент?

1. Представляет собой комплекс белка и кофактора
2. Обладает высокой каталитической активностью
3. Представляет собой неорганический ион
4. Обладает низкой активностью или совсем неактивно

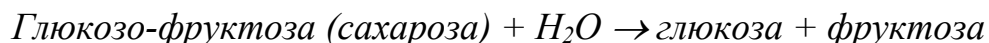
3. Константа Михаэлиса численно равна такой концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна:

1. Максимальной
2. $1/5$ максимальной
3. $1/2$ максимальной
4. $1/10$ максимальной

4. Чем обусловлена субстратная специфичность фермента? Выберите наиболее полный ответ.

1. Набором определенных функциональных групп в активном центре фермента
2. Химическим соответствием активного центра субстрату
3. Наличием кофермента
4. Пространственным соответствием активного центра субстрату
5. Комплементарностью активного центра субстрату

5. Укажите класс фермента катализирующего следующую реакцию:



6. Выберите особенности, характерные для обратимого конкурентного ингибирования:

1. ингибитор связан с ферментом прочными ковалентными связями
2. ингибитор связан с ферментом слабыми нековалентными связями
3. ингибитор является структурным аналогом субстрата
4. ингибитор не является структурным аналогом субстрата

7. Активность ферментов в присутствии ингибиторов может быть снижена. Укажите причину, выбрав наиболее полный и правильный ответ.

1. Взаимодействие ингибитора с функциональными группами активного центра
2. Взаимодействие ингибитора с функциональными группами вне активного центра
3. Конформационные изменения молекул фермента
4. Взаимодействие ингибитора с субстратом

8. Выберите причину конформационных изменений, приводящих к активации аллостерических ферментов:

1. Химическая модификация ферментов
2. Гидролиз пептидных связей
3. Кооперативное взаимодействие субъединиц
4. Диссоциация кофермента

9. Фермент сахараза может катализировать следующие реакции:

1. Глюкозо-фруктоза (сахароза) + $H_2O \rightarrow$ глюкоза + фруктоза
2. Фруктозо-глюкозо-галактоза (рафиноза) + $2H_2O \rightarrow$ глюкоза + фруктоза + галактоза

10. Для сахарозы $K_M = 0,05$, для рафинозы $K_M = 2,0$. В каком случае при одинаковой концентрации субстратов скорость реакции будет больше?

Сладкий вкус зерен в свежесобранных початках кукурузы обусловлен высоким содержанием в них сахара. Кукуруза, которую продают через несколько дней после сбора, имеет более низкую сахаристость, так как около 50% свободного

сахара в зернах превращается в крахмал в течение одного дня хранения. Чтобы сохранить сладкий вкус свежесобранной кукурузы, очищенные початки помещают на несколько минут в кипящую воду («бланшируют»), а затем охлаждают в холодной воде. Кукуруза, обработанная таким образом и хранящаяся в замороженном виде, сохраняет свой сладкий вкус. В чем биологическая основа этой обработки?

11. Что характерно для ферментов, обладающих абсолютной субстратной специфичностью?

1. Катализируют один тип реакций с несколькими сходными субстратами
2. Катализируют один тип реакций с одним субстратом
3. Имеют конформацию активного центра, способную к изменениям
4. Соединение субстрата с активным центром осуществляется по принципу комплементарности

12. Подберите способ регуляции активности для фермента:

Пепсиноген + H_2O → пепсин + пептид

1. аллостерическая регуляция
2. регуляция путем фосфорилирования и дефосфорилирования
3. путем частичного протеолиза

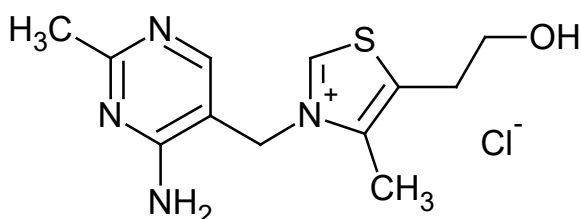
Раздел V. ВИТАМИНЫ

Работа 28. Качественные реакции на витамины

Цель работы – ознакомиться с методами качественного определения витаминов в продуктах.

Качественные реакции используются для обнаружения витаминов. Эти реакции положены в основу количественного определения витаминов в различных источниках.

Опыт 1. Реакции на тиамин (витамин В₁)



В витамине В₁ имеется два гетероциклических кольца: пиримидиновое и тиазоловое, которые могут вступать в специфические для ароматических соединений реакции с участием гетероатомов.

Диазореакция на тиамин – образование сложного окрашенного соединения витамина В₁ с диазобензосульфокислотой.

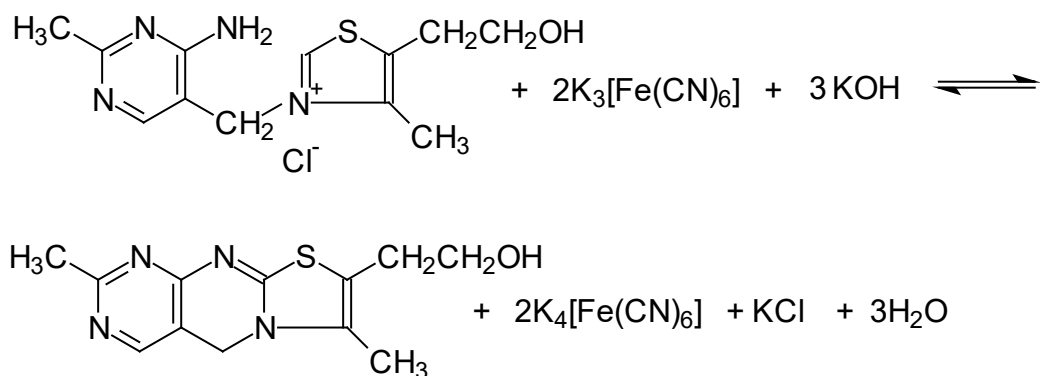
Материал исследования: раствор или порошок тиамина.

Реактивы и оборудование: 1% раствор сульфаниловой кислоты в HCl; 5% раствор нитрита натрия; 10% раствор карбоната натрия; стеклянная посуда; пипетки.

Ход работы. К 5 каплям раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 5 капель раствора нитрита натрия и таким образом получают диазореактив. К диазореактиву прибавляют небольшое количество порошка тиамина (на кончике стеклянной палочки) и осторожно по стенкам пробирки 5-7 капель раствора карбоната натрия.

Реакция окисления тиамина в тиохром

При окислении тиамина образуется соединение (тиохром), обладающее голубой флуоресценцией в УФ-лучах.



Материал исследования: раствор или порошок тиамина.

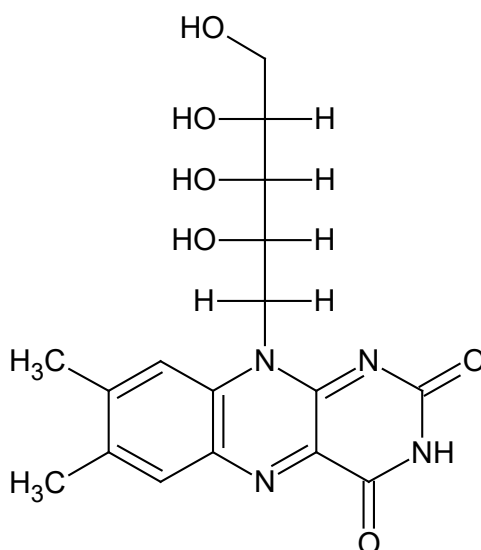
Реактивы и оборудование: 5% раствор гексацианоферрата (III) калия; 30% раствор гидроксида калия.

Ход работы. К 5 каплям раствора тиамина прибавляют 5 капель раствора гексацианоферрата (III) калия, 5 капель раствора гидроксида калия.

Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Химическая структура и название витамина	Кофермент	Биологическая роль	Качественная реакция	Цвет раствора или флуоресценция	
				до реакции	после реакции

Опыт 2. Реакция на рибофлавин (витамин В₂)



Окисленная форма витамина В₂ представляет собой желтое флуоресцирующее в УФ-лучах вещество. Реакция на рибофлавин основана на его способности легко восстанавливаться. При восстановлении витамина В₂ образуется родофлавин красного цвета, а затем бесцветный лейкофлавин, который не флуоресцирует.

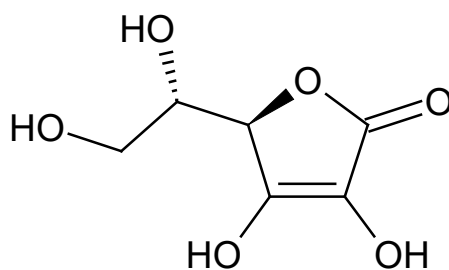
Реактивы и оборудование: концентрированная соляная кислота, кусочки цинка, УФ-лампа.

Ход работы. К 10 каплям раствора рибофлавина прибавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и опускают зернышко металлического цинка.

Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Химическая структура и название витамина	Кофермент	Биологическая роль	Качественная реакция	Цвет раствора или флуоресценция	
				до реакции	после реакции

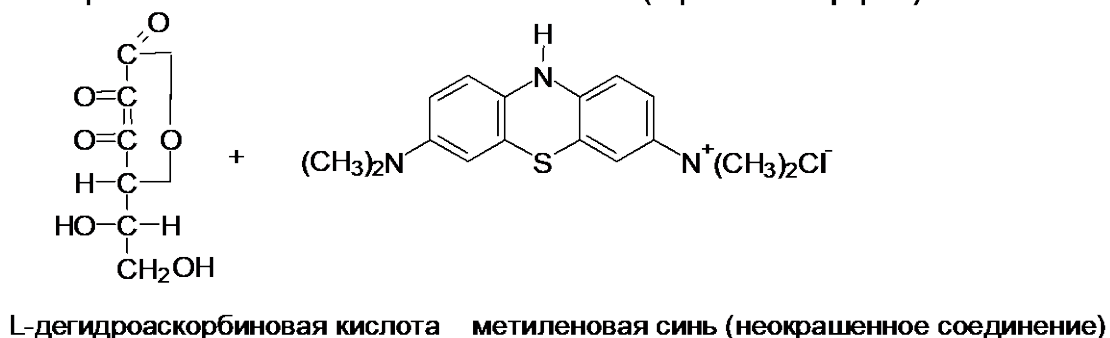
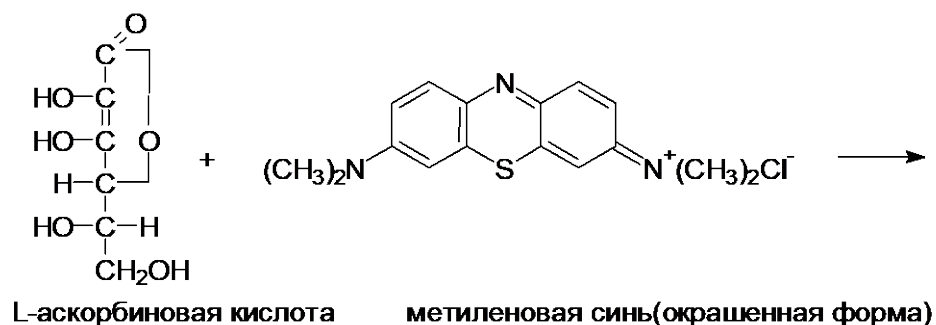
Опыт 3. Качественные реакции на аскорбиновую кислоту (витамин С)



Качественные реакции на витамин С основаны на его способности легко вступать в окислительно-восстановительные реакции, и восстанавливать метиленовую синь, 2,6-дихлорфенолиндофенол, гексацианоферрат (III) калия, нитрат серебра и др.

Материал исследования: раствор витамина С, фруктовые и овощные соки и др.

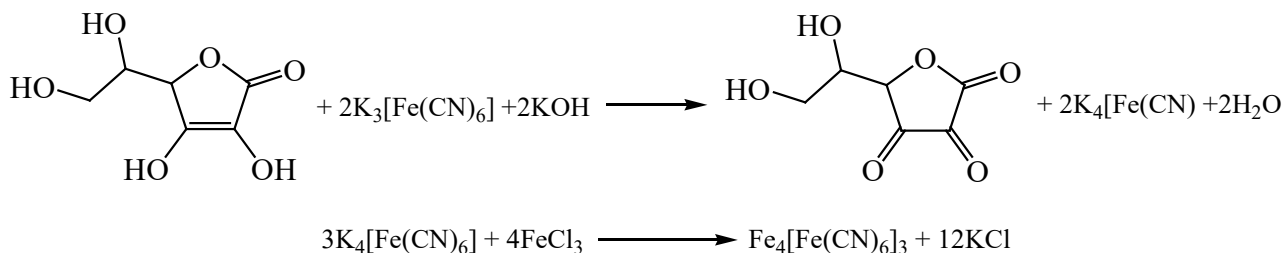
Взаимодействие витамина С с метиленовой синью



Реактивы и оборудование: 0,01% раствор метиленового голубого, термостат, пробирка с пробкой.

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл исследуемого раствора (например, сока) и прибавляют 1 мл раствора метиленовой сини, перемешивают и закрывают пробкой для предохранения от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробирку помещают в термостат при 37-40 °С. Через некоторое время наблюдают обесцвечивание раствора в пробирке за счет восстановления метиленовой сини в лейкоформу. При этом аскорбиновая кислота превращается в дегидроаскорбиновую. Если затем бесцветный раствор метиленовой сини энергично встряхнуть, то раствор вновь приобретает синий цвет.

Реакция витамина С с гексацианоферратом (III) калия



Реактивы и оборудование: раствор гексацианоферрата (III) калия, 5% раствор гидроксида натрия, 10% раствор соляной кислоты, раствор хлорида железа (III).

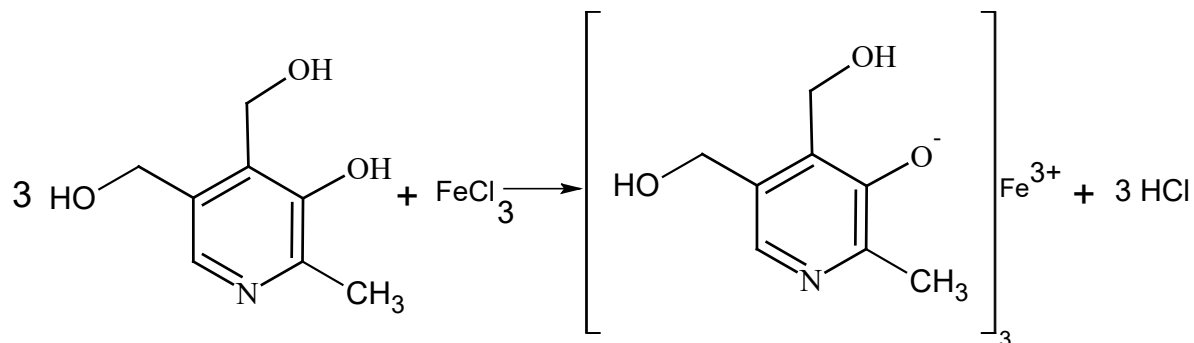
Ход работы. К 1 мл анализируемого раствора добавить 2 капли раствора щелочи, 6-8 капель раствора гексацианоферрата (III) калия и энергично встряхнуть содержимое пробирки. Затем в пробирку добавляют 6-8 капель кислоты и 1-2 капли раствора хлорида железа (III).

Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Структура витамина	Биологическая роль	Наблюдения

Опыт 4. *Феррихлоридная проба на пиридоксин (витамин В₆)*

Цветная реакция на витамин В₆ обусловлена образованием окрашенного в красный цвет комплекса, возникающего при взаимодействии витамина В₆ с хлорным железом.

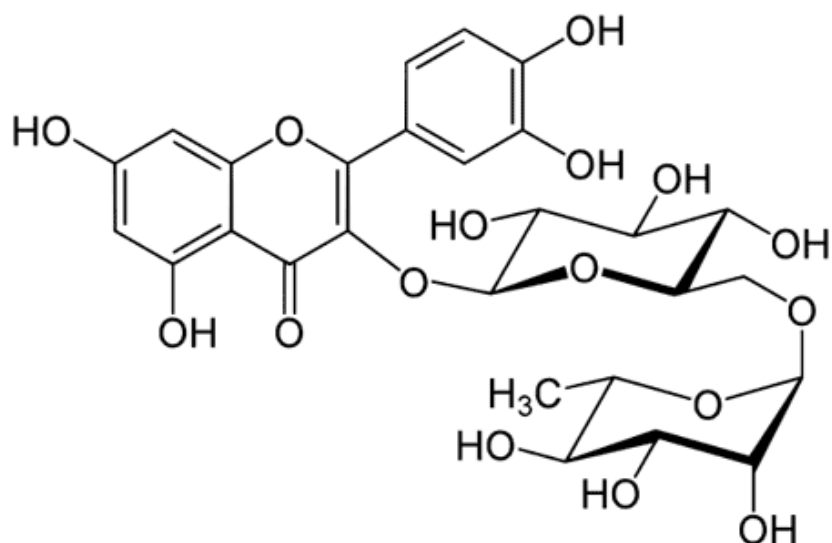


Реактивы и оборудование: хлорное железо, 5% раствор. Штатив с пробирками, пипетки вместимостью 1,0 и 5,0 мл.

Материал исследования: 5% водный раствор пиридоксина.

Ход работы. К 5 мл водного раствора пиридоксина добавляют 1 мл 5% раствора хлорного железа. Содержимое пробирки встряхивают, раствор приобретает красную окраску.

Опыт 5. *Качественная реакция на рутин (витамин Р)*



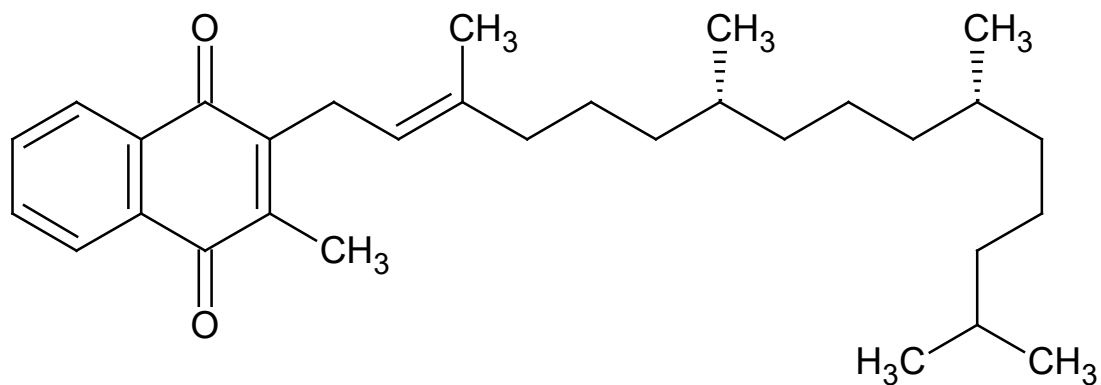
Метод основан на взаимодействии пирокатехинов с хлоридом железа (III) с образованием комплексного соединения зеленого цвета.

Реактивы и оборудование: хлорид железа (III), аналитические весы

Материал исследования: зеленый чай.

Ход работы: на аналитических весах взвешивают 100 мг зеленого чая, добавляют 15 мл дистиллированной воды и кипятят в течение 3 минут. После остывания отбирают в пробирку 1 мл экстракта и добавляют несколько кристалликов хлорида железа (III). Перемешивают и разводят в 2-3 раза дистиллированной водой. Развивается зеленое окрашивание.

Опыт 6. *Реакция на викасол (витамин К)*



В щелочной среде викасол способен образовывать с цистеином окрашенное соединение.

Материал исследования: спиртовой раствор викасола.

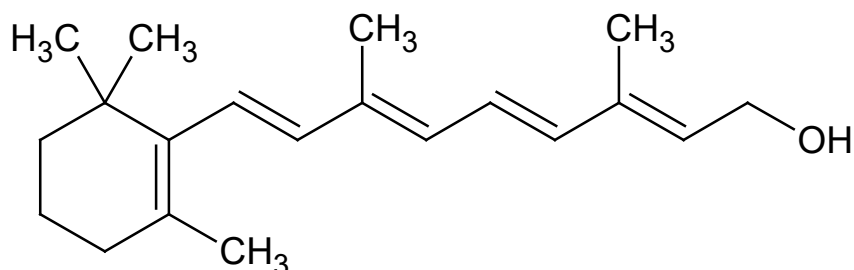
Реактивы и оборудование: 10% раствор гидроксида натрия, 0,025% раствор цистеина.

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл раствора викасола (или 0,2% раствора метионина), затем прибавляют 2 капли раствора цистеина и 2 капли щелочи.

Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Структура витамина	Биологическая роль	Наблюдения

Опыт 7. Качественные реакции на ретинол (витамин А)



Материал исследования: растительное масло, рыбий жир, растительный экстракт.

Реакция с сульфатом железа (II)

Реактивы и оборудование: насыщенный раствор сульфата железа (II) в ледяной уксусной кислоте (свежеприготовленный), концентрированная серная кислота.

Ход работы. К 1-2 каплям растительного масла или рыбьего жира или 1 мл растительного экстракта в гексане или ацетоне добавляют 5-10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II) (в случае ацетонового экстракта добавляют смесь уксусной кислоты и ангидрида) и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Каротины дают зеленоватое окрашивание.

Реакция с серной кислотой (реакция Друммонда)

В основе данной реакции лежит способность серной кислоты отнимать от витамина А воду с образованием цветных продуктов.

Реактивы и оборудование: концентрированная серная кислота.

Ход работы. 1 каплю растительного масла растворяют в 4-5 каплях хлороформа и прибавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты.

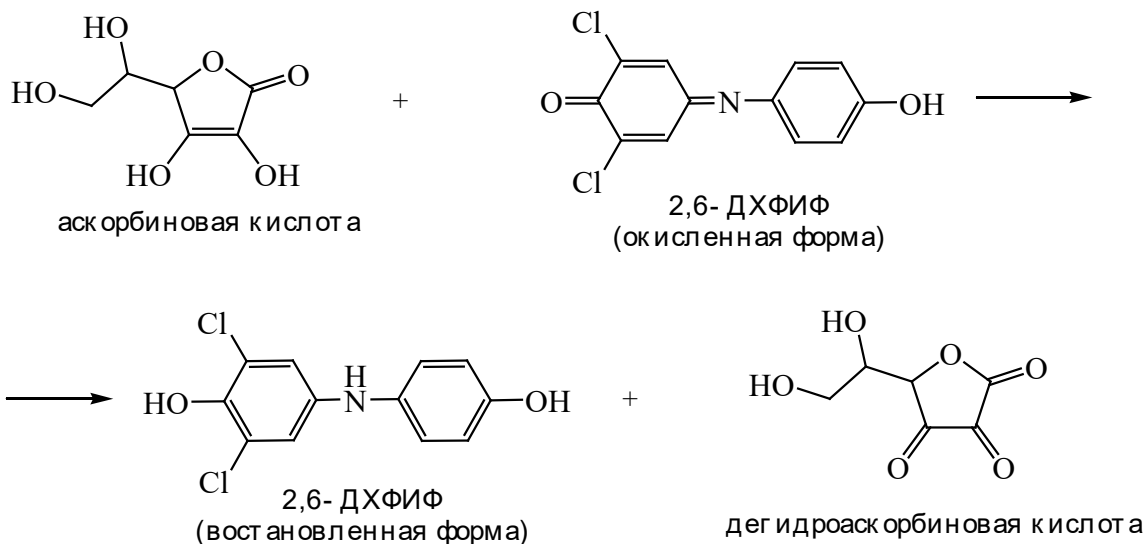
Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Структура витамина	Биологическая роль	Наблюдения

Работа 29. Количественное определение аскорбиновой кислоты

Цель работы – освоить метод количественного определения витамина С в продуктах.

Принцип метода количественного определения витамина С основан на его способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ):



Окисленная форма 2,6-дихлорфенолиндофенола в щелочной и нейтральной среде имеет синюю окраску, в кислой – красную; восстановленная форма ДХФИФ – бесцветная.

По данному методу определяют только восстановленную форму аскорбиновой кислоты.

Реактивы и оборудование: 0,0005 М раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 5% раствор соляной кислоты, кварцевый песок, ступка и пестик; мерные колбы на 100 мл; коническая колба на 50 мл; микробюретка; воронка; фильтровальная бумага.

Ход работы.

Приготовление экстракта из растительного материала. Нарезают 10 г исследуемого материала (капуста, морковь, лимон, шиповник) мелкими кусочками и переносят в ступку. Тщательно растирают, добавляя маленькими порциями 5%-ный раствор соляной кислоты до получения жидкой кашицы. Смесь количественно переносят в мерную колбу на 100 мл. Ступку и пестик тщательно обмывают 5%-ным раствором соляной кислоты, которую

сливают в ту же мерную колбу, следя за тем, чтобы были затрачены все 50 мл соляной кислоты (конечная концентрация ее должна быть 2,5%) После этого содержимое мерной колбы доводят до метки дистиллированной водой, хорошо перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр. Полученный экстракт должен быть совершенно прозрачным.

Определение содержания аскорбиновой кислоты в экстракте. В коническую колбу на 50 мл берут пипеткой 10 мл полученного экстракта растительного материала. Содержимое колбы титруют 0,0005 М раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Работу повторяют с новой порцией того же экстракта.

Оформление работы. Результаты титрования записывают в лабораторный журнал. На основании средней величины титрования, полученной из 2 – 3 определений, вычисляют количество витамина С по формуле:

$$c = 100 \times C_{\text{ДХФИФ}} \times V_{\text{ДХФИФ}} \times M_{\text{аск.к-ты}}$$

где c – содержание аскорбиновой кислоты (в мг на 100 г исследуемого продукта);

$C_{\text{ДХФИФ}}$ – концентрация 2,6-дихлорфенолиндофенола (моль/л);

V – затраченный при титровании объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (мл);

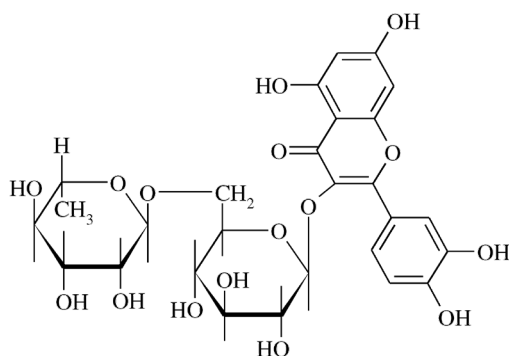
$M_{\text{аск.к-ты}}$ – молярная масса аскорбиновой кислоты (г/моль).

Делают вывод о содержании витамина С в исследуемом образце.

Работа 30. Количественное определение содержания рутина в чае

Цель работы - определить содержание витамина Р в различных сортах чая

В чайных листьях содержится около трехсот ингредиентов, включая белки, жиры, более 10 видов витаминов, а также танин, кофеин и эфирные масла. Поэтому чай питает организм, регулирует физиологические процессы и обладает общим оздоровительным воздействием. Достаточно большое количество его благотворных влияний приписывается содержащемуся в его составе витамину Р (рутину), который стабилизирует основное вещество соединительной ткани путем ингибирования гиалуронидазы, участвует в окислительно-восстановительных процессах организма (синергист витамина С), стимулирует желчеотделение. Суточная потребность составляет 25—50 мг.

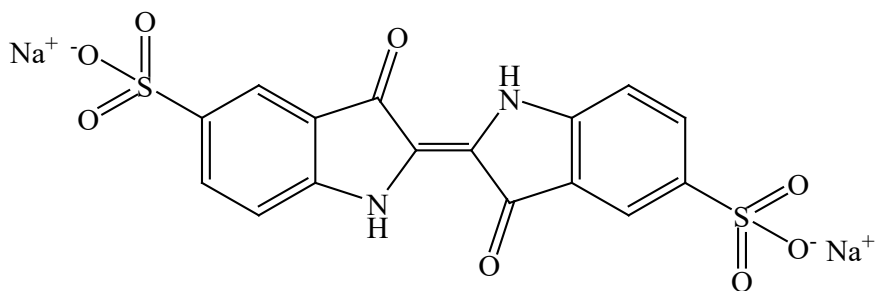


Структурная формула рутина

Недостаток рутина в организме характеризуется следующими проявлениями: общая слабость, быстрая утомляемость, боль в конечностях, мелкие геморрагии в зонах волосяных мешочков на коже. Основными источниками являются цитрусовые, красный перец, черная смородина, шиповник, зеленый чай, гречиха, вишня.

Для количественного определения витамина Р в чае используется методика Левенталья – титрование перманганатом калия в присутствии индигокармина.

Индигокармин — динатриевая соль индиго-5,5'-дисульфокислоты. Индигокармин применяется в химии как окислительно-восстановительный и кислотно-основной индикатор (интервал рН области перехода от синей формы к жёлтой — 11,6-14,0).



Структурная формула индигокармина

Характерной особенностью является то, что при настаивании чая для сортов зеленого чая характерно увеличение степени экстракции витамина Р. Для черных чаев отмечается увеличение экстракции рутина на 5—10 минуте, с последующим уменьшением его содержания в экстракте вследствие его разрушения. При повторном заваривании чая экстракция витамина Р уменьшается. В среднем содержание витамина Р в сортах зеленого чая больше, чем в сортах черного чая.

Реактивы и оборудование: черные и зеленые чаи различных торговых марок (4 вида), 0,1% раствор индикатора - индигокармин в 20% растворе этилового спирта, 0,05 Н раствор перманганата калия.

Ход работы.

Навеску 100 мг каждого сорта чая переносят в термостойкие стаканчики и приливают 50 мл горячей дистиллированной воды. Производят экстракцию в течение 5 мин. Затем охлаждают каждый стаканчик с экстрактом чая до комнатной температуры.

Затем 10 мл экстракта чая переносят в коническую колбу для титрования, добавляют 10 мл дистиллированной воды и 5 капель индикатора индигокармин (появляется зеленое окрашивание). Приступают к процессу титрования: к содержимому конической колбы добавляют по каплям такое количество перманганата калия, чтобы раствор в колбе приобрел устойчивую желтую окраску. Титрование проводят по 3 раза с каждым экстрактом чая.

Определяют процентное содержание рутина по формуле:

$$X = \frac{3,2 * V_1 * V_2 * 100}{V_3 * m * 1000}$$

X – содержание витамина Р в препарате, г (%)

V₁ – объем 0,05 н раствора перманганата калия, пошедшего на титрование, мл

3,2 стандартный коэффициент пересчета, т.к. 1 мл 0,05 Н раствора КМnО₄ окисляет 3,2 мкг рутина

V₂ – объем, в котором растворена навеска чая (50 мл)

V₃ – объем экстракта, отобранный для анализа (10 мл)

100 – множитель для расчета процентного содержания

1000 – множитель для перевода микрограммов в миллиграммы

m – масса навески, мг

ТЕСТЫ И ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В состав какого кофермента входит витамин В₂?
 1. тиаминпирофосфат
 2. НАД⁺
 3. ФАД
 4. кофермент А.
2. В состав какого кофермента входит витамин ниацин?
 1. тиаминпирофосфат
 2. НАД⁺
 3. ФАД
 4. кофермент А
 5. пиридоксальфосфат
3. В состав какого кофермента входит витамин пантотеновая кислота?
 1. тиаминпирофосфат
 2. НАД⁺
 3. ФАД
 4. кофермент А
 5. пиридоксальфосфат
4. В состав какого кофермента входит витамин В₆?
 1. тиаминпирофосфат
 2. НАД⁺
 3. ФАД
 4. кофермент А
 5. пиридоксальфосфат
5. В состав какого кофермента входит витамин В₁?
 1. тиаминпирофосфат
 2. НАД⁺
 3. ФАД
 4. кофермент А

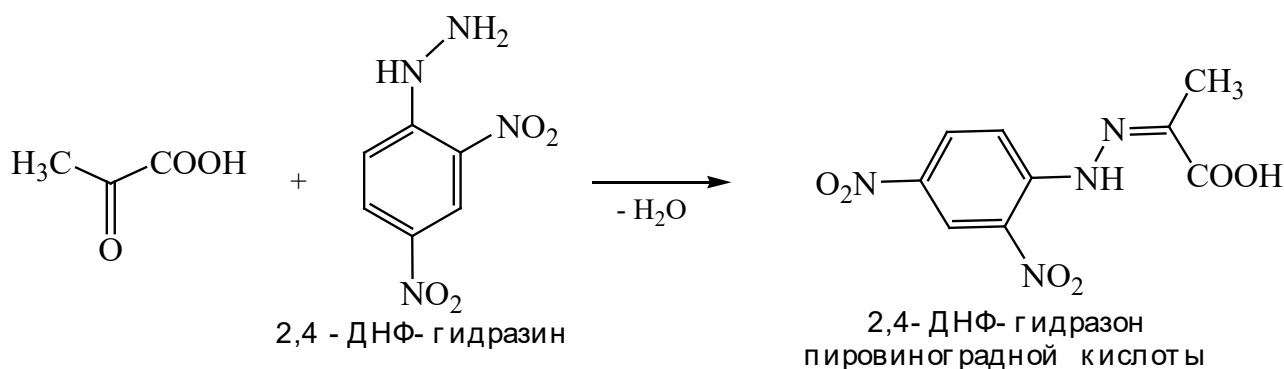
5. пиридоксальфосфат
6. В каких реакциях требуется витамин С в качестве кофактора?
 1. гидрирование
 2. гидроксилирование
 3. карбоксилирование
 4. метилирование
7. Для нормального световосприятия необходим:
 1. ретинол
 2. токоферол
 3. рибофлавин
 4. викасол
 5. холекальциферол
8. В состав коферментов пируватдегидрогеназного комплекса входят витамины:
 1. тиамин
 2. пиридоксин
 3. филлохинон
 4. рибофлавин
 5. цианкобаламин

Раздел VI. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

Работа 31. Количественное определение пировиноградной кислоты в мышцах

Цель работы – освоить метод определения конечного метаболита гликолиза – пирувата.

Пировиноградная кислота взаимодействует с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием гидразона пировиноградной кислоты, который в щелочной среде имеет красный цвет. Интенсивность окраски раствора пропорциональна содержанию пирувата.



Материал исследования: мышечная ткань.

Реактивы и оборудование: центрифуга, фотометр, пробирки, пипетки, 10% раствор трихлоруксусной кислоты, 0,1% раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 2 м соляной кислоте, фосфатный буфер (рН 6,8), толуол, 10% раствор карбоната натрия, 1,5М раствор гидроксида натрия, дистиллированная вода, стандартный раствор пирувата натрия (5 мг/л).

Ход работы.

1. *Приготовление мышечного экстракта.* Взвешивают 1 г мышечной ткани свежего мяса (на технических весах) и помещают в охлаждённую ступку, мышцы измельчают ножницами. Отмеряют 5 мл охлаждённого буферного фосфатного раствора и заливают им взятую навеску, растирают в ступке до получения гомогенной массы. После этого полученный экстракт переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3 000 об/мин в течение 10 минут. Необходимо две пробирки с пробками. В одну пробирку отбирают 1 мл экс-

тракта, в другую пробирку помещают 1 мл стандартного раствора пирувата натрия. Приливают в обе пробирки по 4 мл раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и центрифугируют. Надосадочную жидкость используют в качестве исходного материала для определения пировиноградной кислоты.

2. *Образование 2,4-динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты.* Осторожно отобрать 2,5 мл надосадочной жидкости из каждой пробирки в новые пробирки. Добавить по 0,5 мл воды и по 1 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Перемешать, закрыть пробкой каждую пробирку и оставить в темном месте на 10 мин (для образования гидрозина пировиноградной кислоты).

3. *Экстракция и колориметрирование 2,4-динитрофенилгидрозонов пировиноградной кислоты.* К реакционной смеси добавляют 2 мл толуола, пробирку закрыть пробкой и ее содержимое тщательно встряхнуть в течение 3 мин. Пробу на 5 мин оставить для расслоения жидкости. После этого осторожно с помощью шприца и пипетки удалить нижний водяной слой. К толуоловому экстракту добавить 1,5 мл 10%-ного раствора натрия карбоната и хорошо взболтать, снова дать разделиться слоям жидкости. На этом этапе гидрозон пировиноградной кислоты переходит в содовый раствор. Из нижнего содового раствора отбирают 1,25 мл, вносят в чистую пробирку, прибавляют 1,25 мл 1,5 моль/л раствора гидроксида натрия. Развивается красное окрашивание. Колориметрирование проводят в кювете 1 см ($\lambda = 470$ нм) против 10 % раствора трихлоруксусной кислоты.

4. *Расчет содержания пировиноградной кислоты в мышечной массе.*

Содержание пировиноградной кислоты рассчитывается по формуле:

$$X = D_x \cdot C_{ст} \cdot 6 / 100 \cdot D_{ст}, \quad \text{где}$$

D_x – значение оптической плотности опытной пробы

$D_{ст}$ – значение оптической плотности стандартной пробы

X - количество пирувата в мг/г;

$C_{ст}$ - количество пирувата в мг/дл в стандартной пробе;

10 - расчет на 1 л

Содержание пировиноградной кислоты в ммоль/л рассчитывается по формуле:

$$C = \frac{X}{88}, \quad \text{где}$$

X - количество пирувата в мг/л;

88 - молярная масса пировиноградной кислоты, мг/ммоль;

C - содержание пирувата в ммоль/л.

Практическое значение работы.

Пировиноградная кислота — промежуточный продукт углеводного и белкового обменов. Она тесно связана с обменом тиамин. Тиамин в форме тиаминдифосфата является коферментом декарбоксилаз, участвующих в окислительном декарбоксилировании пировиноградной кислоты. При недостатке тиамин в крови и моче повышается концентрация пировиноградной кислоты со всеми последующими патологическими явлениями.

Оформление работы. Заносят в тетрадь принцип метода, рассчитывают содержание пирувата в мышцах и делают вывод.

Работа 32. Обнаружение действия животной липазы и определение её активности

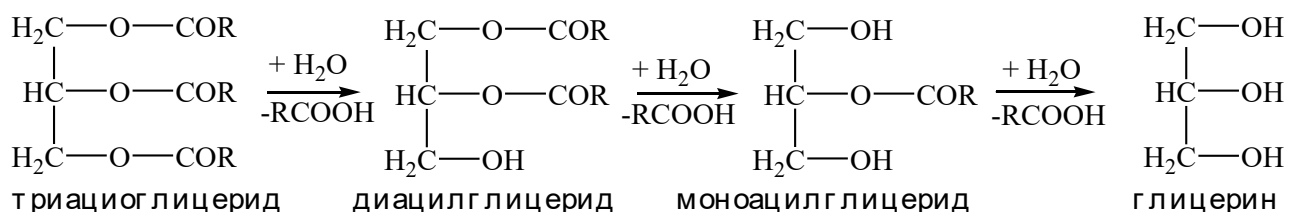
Цель работы - установить значимость фермента животной липазы для процесса пищеварения. Освоить метод определения активности животной липазы.

Жиры, или триацилглицерины, практически не всасываются в пищеварительном тракте. В тонкой кишке происходит их гидролиз, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой.

Панкреатическая липаза поступает в кишечник в виде неактивного предшественника – пролипазы. В просвете кишечника происходит активация пролипазы путем образования комплекса с низкомолекулярным белком – колипазой. Последняя присоединяется к пролипазе в молярном отношении 2:1. В результате липаза становится активной и устойчивой к действию трипсина.

Активная липаза катализирует гидролиз эфирных связей в $\alpha(1)$ - и $\alpha'(3)$ -положениях, в результате образуется β -моноацилглицерид и освобождаются две жирные кислоты. В панкреатическом соке помимо липазы содержится моноглицеридная изомераза – фермент, катализирующий внутримолекулярный перенос ацила из β -положения моноацилглицерида в α -положение. А эфирная связь в α -положении чувствительна к действию панкреатической липазы.

Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, моноацилглицерида) всасываются в стенках кишечника. В процессе переваривания и всасывания липидов важную роль играют желчные кислоты. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов переваривания. Липаза один из ферментов подкласса 1 класса гидролаз. Ферменты, входящие в состав этого подкласса, действуют в присутствии воды на сложно-эфирные связи. Липаза катализирует гидролиз нейтрального жира.



Значительная часть населения страдает ожирением, которое, в свою очередь, провоцирует развитие болезней сердечно-сосудистой системы. Для лечения этих заболеваний необходимо понимание механизма их развития, что невозможно без знания нормальных процессов обмена липидов.

Причиной расстройств метаболизма липидов в организме часто является нарушение их пищеварения и всасывания, что в значительной мере зависит от присутствия желчных кислот. Это сопровождается стеатореей (*повышенное выведения жиров из организма с калом*), развитием гиповитаминозов жирорастворимых витаминов.

Принцип метода: При воздействии липазы на эмульгированные жиры молока происходит их гидролиз. Гидролиз жира сопровождается образованием свободных насыщенных жирных кислот (пальмитиновая, миристиновая, стеариновая и т.д.), количество которых постоянно увеличивается. Их определяют титрованием NaOH в присутствии фенолфталеина, который при нейтрализации кислот приобретает слабо-розовый цвет.

Материал: молоко, разведенное водой в соотношении 1:10

Реактивы и оборудование: 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина; 0,01н раствор NaOH; раствор панкреатина (6 мг/мл), содержащий липазу, колбы конические на 100 мл, пипетки, пробирки, бюретки, термостат.

Ход работы.

1. Определение кислотности молока.

В конические колбы наливают 5 мл разбавленного молока (1:10), добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют 0,01н раствором NaOH по каплям из бюретки до появления слабо-розового цвета (**НЕ ПЕРЕТИТРОВАТЬ!!!**). При первом титровании нейтрализуются органические кислоты – молочная и дру-

гие, которые присутствуют в молоке до начала действия липазы. Данные 2 титрований записывают в таблицу.

2. Определение активности липазы

В 6 пробирок наливают по 5 мл разбавленного молока и 0,5 мл раствора панктеатина. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и ставят в термостат (температура 38 -40 °С). Каждые 10 минут из термостата вынимают по 2 пробирки, добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют 0,01н раствором NaOH по каплям из бюретки до появления слабо-розового цвета (интенсивность окраски должна быть одинаковой для всех проб). Данные титрования записывают в таблицу.

Промежуток времени	V (NaOH), мл		
	№1	№2	Средний
до начала гидролиза			
через 10 мин			
через 20 мин			
через 30мин			
через 40мин			
через 50мин			

Оформление работы. На основании полученных данных изобразите графически динамику расщепления жира липазой, где по оси абсцисс откладывают время в минутах, а по оси ординат – объемом 0,01н раствора NaOH, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный промежуток времени, после предварительного вычитания количества щелочи, израсходованной на титрование контрольной пробы.

Выразите активность липазы как концентрацию карбоксильных групп жирных кислот, образовавшихся в 100 мл молока за все время исследования, пользуясь следующей формулой:

$$C = \frac{4,5 \times C_{NaOH} \times \Delta V_{NaOH}}{V_{\text{молока}}}$$

где С - концентрация жирных кислот, образующихся в 100 мл молока (г/100мл);

C_{NaOH} - концентрация раствора NaOH (0,01н);

ΔV_{NaOH} – разность объемов раствора NaOH, израсходованный на титрование 5 мл молока за все время инкубации и контрольной пробы, мл;

$V_{\text{молока}}$ - объем молока в титруемой пробе, (5мл).

Работа 33. Экспресс-определение глюкозы в крови с помощью глюкометра

Глюкометры применяются для количественного определения глюкозы в крови людьми, страдающими сахарным диабетом, в домашних условиях, а также медицинским персоналом в медучреждениях в качестве средства отслеживания уровня глюкозы в крови. Для людей, страдающих сахарным диабетом, определение содержания глюкозы в крови – необходимый ежедневный анализ.

В России наибольшее распространение получили глюкометры «One Touch» (Johnson and Johnson, USA), «Accu-Check» (Roche, Франция), «Elite» (Байер, Германия), «Саттелит» (ЭЛТА, Россия).

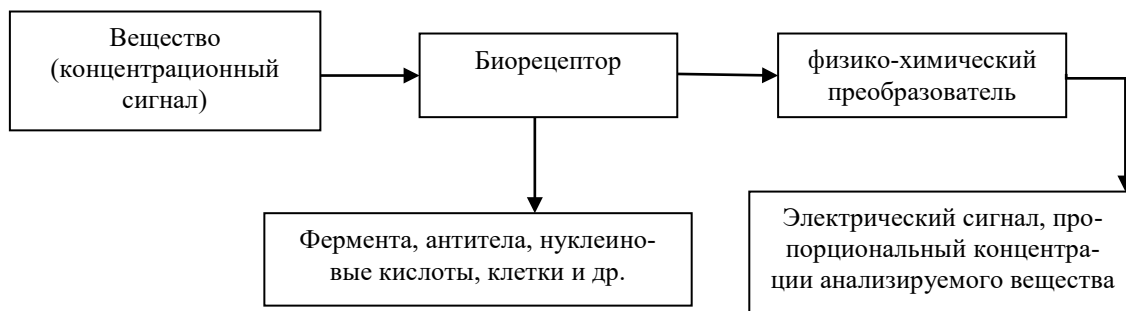


Рисунок 9. Глюкометр «One Touch Select»

Глюкометр «One Touch» по принципу функционирования представляет собой биосенсор.

Биосенсоры – это аналитические устройства, использующие биологический материал для «узнавания» определенных молекул и выдающие информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала. Большинство биосенсоров ориентированы на анализ биологических жидкостей, например крови.

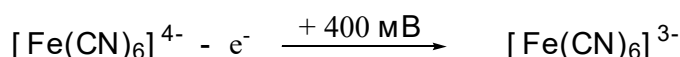
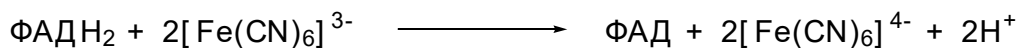
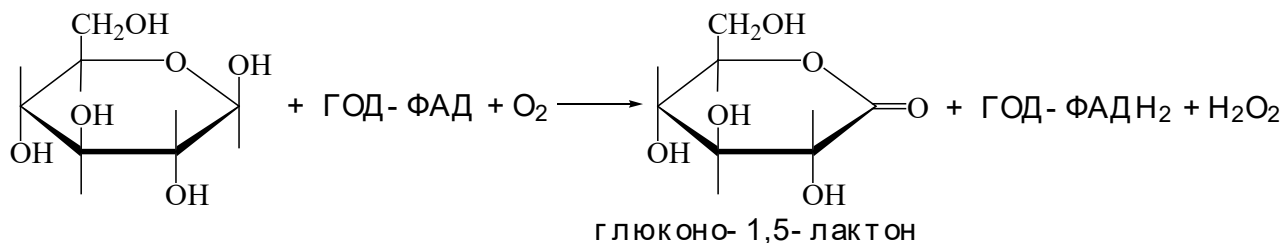
Принципиальная схема биосенсора:



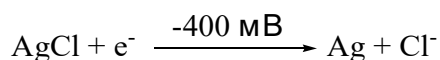
Амперометрические медиаторные ферментные биосенсоры нашли применение в клинической биохимии. Так, самые распространенные глюкометры для домашнего использования представляют собой миниатюрные амперометрические биосенсоры с одноразовыми электродами (тест-полосками), изготовленными печатным методом. На полимерной подложке тест-полоски расположены три электрода: электрод сравнения в виде серебряной нити с добавлением хлорида калия а поверхности нити (хлорсеребряный электрод), вспомогательный графитовый электрод и рабочий графитовый электрод. На поверхности рабочего графитового электрода иммобилизован фермент глюкозооксидаза, гексацианоферрат (III) калия (феррицианид) – медиатор электронного транспорта и соли для создания буферной системы. Полунепроницаемая полимерная мембрана ограничивает доступ форменных элементов крови и белков плазмы к поверхности электрода, что позволяет проводить анализ без пробоподготовки. Высокая чувствительность метода позволила оптимизировать объем пробы до 1-2 мкл (капля).

Принцип биосенсорного определения глюкозы в крови с помощью медиаторного глюкозооксидазного электрода представлен на схеме:

Анод: (подается потенциал +0,4В относительно электрода сравнения):



Катод:



Ток окисления медиатора пропорционален содержанию глюкозы в анализируемом образце крови.

Реактивы и оборудование: глюкометр, инструкция по пользованию, новый стерильный ланцет.

Ход работы. Для глюкометра «One Touch Ultra»:

Для глюкометров других производителей и моделей ход анализа может отличаться! Смотрите инструкцию!

- 1) *Взятие пробы крови.* Каплю крови можно получить как из кончика пальца, так и из предплечья. Вымойте руки и место прокола теплой водой с мылом и тщательно просушите. Проколите палец или предплечье ланцетом. Плотнo прижмите ручку для прокалывания к месту прокола. Нажмите кнопку спуска. Слегка помассируйте поверхность, пока не образуется капля крови достаточного размера. Объем полученной крови должен составлять не менее 1 мкл, иначе получится неправильный результат.
- 2) *Введение тест-полоски.* Возьмите тест-полоску из флакона. Прежде, чем вводить тест-полоску в прибор, проверьте номер кода на флаконе с тест-полосками. Немедленно закройте флакон крышкой. Введите тест-полоску контактными полосами и лицевой стороной вверх. Тест

полоска должна войти до упора. Прибор включится, и на короткий промежуток времени возникнет изображение контрольного экрана. Убедитесь, что номер кода на экране прибора *соответствует* номера кода на флаконе с тест-полосками.

- 3) *Нанесение капли крови.* Когда на экране глюкометра появится мигающий символ капли крови к узкому каналу у верхнего края тест-полоски и удерживайте тест-полоску у края капли крови, пока контрольное поле не заполнится целиком и прибор начнет обратный отсчет.
- 4) *Получение результата.* Результат определения глюкозы в крови появится по окончании отсчета прибором секунд от 5 до 1. Выключите прибор, вынув тест-полоску. Глюкометры «One Touch Ultra» имеют диапазон измерений 1,1 – 33,3 ммоль/л.

Оформление работы: Опишите принцип метода, ход работы и занесите полученные значения содержания глюкозы в крови в лабораторную тетрадь. Сделайте выводы об уровне глюкозы в крови в лабораторную тетрадь. Сделайте выводы об уровне глюкозы в крови у испытуемого.

Содержание глюкозы в крови для людей, не страдающих сахарным диабетом, зависит от времени, прошедшего после последнего приема пищи:

<i>время</i>	<i>диапазон, моль/л</i>
до еды	менее 5,6
через 2 часа после еды	менее 7,8

Сравните полученный результат с соответствующим результатом из таблицы. Сделайте вывод о соответствии полученного результата нормальному уровню глюкозы в крови.

Работа 34. Определение общего холестерина в сыворотке крови с помощью набора Ольвекс Диагностикум

Холестерин является компонентом клеточных мембран, предшественником стероидных гормонов и желчных кислот. Содержание холестерина в крови повышается при заболеваниях таких как: гиперлиппротеинемия, полигенная гиперхолестеринемия злокачественных опухолей поджелудочной железы, алкоголизме. Снижение уровня холестерина отмечено при дефиците α -липопротеинов, гипертиреозе, недостаточности питания. Определение уровня холестерина используется при диагностике нарушений липидного обмена, а также при выявлении факторов риска атеросклероза и ишемической болезни сердца.

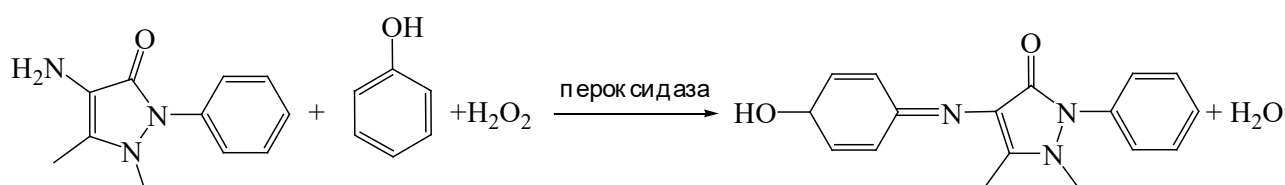
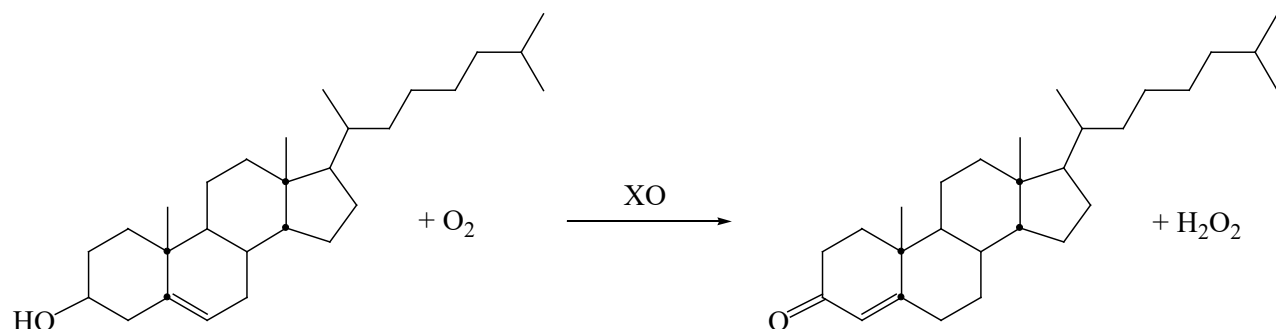
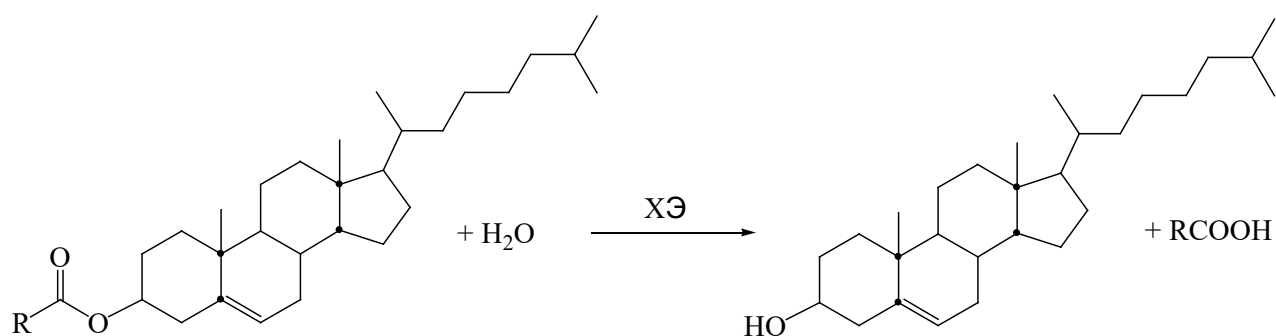
Принцип метода. Холестерин из состава эфиров высвобождается под действием фермента холестеролэстеразы (ХЭ). При участии фермента холестериноксидазы (ХО) холестерин окисляется до 4-холестен-3-она. Образующаяся перекись водорода, при участии фермента пероксидазы, способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминовый краситель). Интенсивность окраски реакционной смеси пропорциональна содержанию холестерина в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 490-540 нм.

Реактивы и оборудование: набор реагентов для определения концентрации общего холестерина в сыворотке энзиматическим колориметрическим методом по реакции Триндера¹⁸; фотометр «Эксперт-003»; кювета с толщиной слоя 1 см; штатив с пробирками.

¹⁸ Состав набора:

- реагент №1 – 0,1М фосфатный буфер pH 7,5; фенол – 20 мМ, детергенты, стабилизаторы;
- реагент №2 – лиофилизат ферментов (концентрация в рабочем реагенте: холестеринэстераза – 400 Ед/л, холестеролоксидаза – 250 Ед/л, пероксидаза – 500 Ед/л, 4-аминоантипирин (краситель) – 0,4 мМ);
- калибратор – раствор холестерина 5,17 мМ.

Рабочий реагент получают смешиванием реагента №1 и реагента №2. Аналитические характеристики набора: линейность – 0,5-25,8 мМ; коэффициент вариации – не более 5%.



Ход работы.

Подготовьте пробы в соответствии с таблицей:

Проба	сыворотка, мкл	калибратор, мкл	H ₂ O _{дист} , мкл	рабочий реагент, мл
опытная	20	-	-	2,0
калибровочная	-	20	-	2,0
контрольная	-	-	20	2,0

Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют в течение 15 мин. при комнатной температуре (18-25°C) или 10 мин. при температуре 37°C. После окончания инкубации измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб относительно контрольной пробы при длине волны 490-540 нм. Окраска растворов стабильна не менее 1 часа после окончания инкубации при хранении проб в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Расчет концентрации холестерина провести по формуле:

$$C = \frac{A_{\text{пробы}}}{A_{\text{калибровочнойпробы}}} \times 5,17 \text{ ммоль / л ,}$$

где $A_{\text{пробы}}$ – оптическая плотность исследуемой пробы;

$A_{\text{калибровочной пробы}}$ – оптическая плотность калибровочной пробы;

5,17 ммоль/л – концентрация холестерина в калибраторе.

Оформление работы: сравните полученный результат с соответствующим результатом из таблицы. Сделайте вывод о соответствии полученного результата нормальному уровню общего холестерина по таблице:

нормальные показатели	до 5,17 ммоль/л
пограничные показатели	5,17 – 6,5 ммоль/л
патологические показатели	свыше 6,5 ммоль/л

Работа 35. Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей и качественное определение продуктов из гидролиза

Цель работы – Выделить дрожжевые рибонуклеопротеины и охарактеризовать основные структурные компоненты.

Нуклеиновые кислоты в клетке находятся в виде нуклеопротеинов. При частичном гидролизе нуклеопротеины распадаются на белки (гистоны) и нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК). ДНК и РНК, имея сходное строение, несколько отличаются по составным компонентам. Специфическими реакциями можно выявить основные компоненты нуклеиновых кислот. При полном гидролизе нуклеиновые кислоты распадаются на составляющие компоненты: гетероциклические основания (пуриновые или пиримидиновые), остатки сахара (рибозу или дезоксирибозу) и остатки фосфорной кислоты.

Материал исследования: свежие пекарские дрожжи.

Реактивы и оборудование: 10% раствор серной кислоты, 0,4% и 10% растворы гидроксида натрия, 1% раствор сульфата меди (II), аммиак концентрированный, молибденовый реактив¹⁹, 1% раствор нитрата серебра, песок, диэтиловый эфир, ступка, пробирки, круглодонные колбы, обратные холодильники, песчаные бани, воронки, фильтры.

Ход работы.

Опыт 1. *Выделение рибонуклеопротеинов (РНП)*

10 г дрожжей смешивают в ступке со смесью из 2 мл диэтилового эфира и 2 мл воды, добавляют 5 г песка и тщательно растирают, приливая к растертой массе небольшими порциями 40-50 мл 0,4% раствора гидроксида натрия. Растирание продолжают еще 15-20 мин. После этого осадок отфильтровывают или отделяют центрифугированием (10 минут при 10000 об.). Центрифугат сливают в стакан и к нему прибавляют небольшими порциями (по 0,1 мл) 10%-ную кислоту до слабокислой реакции (0,5 мл). Полученный осадок нуклеопротеинов

¹⁹ Молибденовый реактив. Смешивают 15% раствор молибдата аммония с азотной кислотой (конц.) в отношении 110:90.

отделяют центрифугированием (10 минут при 10000 об.).

Опыт 2. Биуретовая реакция на полипептиды

К 5 каплям гидролизата добавляют биуретовый реактив. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Опыт 3. Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу

К 5 каплям гидролизата добавляют 20 капель 10% раствора гидроксида натрия и 10 капель 1% раствора сульфата меди (II) до появления осадка гидроксида меди (II). Пробирку нагревают до выпадения осадка.

Опыт 4. Серебряная проба на пуриновые основания

10 капель гидролизата нейтрализуют 1 каплей концентрированного аммиака и добавляют 5 капель 1% раствора нитрата серебра. При стоянии через 3–5 мин выпадает небольшой рыхлый осадок серебряных соединений пуриновых оснований, окрашенный в бурый цвет.

Опыт 5. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

К 20 каплям молибденового реактива (раствор молибдата аммония в азотной кислоте) добавляют 2 - 3 капли гидролизата и кипятят несколько минут на открытом огне. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорномолибденового аммония:



Оформление работы. Результаты лабораторной работы записывают в тетрадь в виде таблицы.

Компоненты нуклеопroteина	Качественная реакция	Наблюдения

ТЕСТЫ И ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Установите соответствие.

Функция:

- | | |
|--|----------|
| 1. Структурные компоненты рибосом | Б. и-РНК |
| 2. Матрица для синтеза белка | В. т-РНК |
| 3. Матрица для синтеза и-РНК | Г. р-РНК |
| 4. Перенос аминокислот к месту синтеза белка на рибосомы | Д. ДНК |

2. Из перечисленных пар азотистых оснований выберите комплементарные пары, обеспечивающие формирование вторичной структуры РНК:

1. гуанин – урацил
2. аденин – урацил
3. гуанин – цитозин
4. тимин – аденин

3. Молекулы ДНК:

1. Построены из дезоксирибонуклеотидов
2. Состоят из двух антипараллельных цепей
3. Содержат равное количество азотистых оснований аденина и урацила
4. Содержат равное количество азотистых оснований цитозина и гуанина
5. Содержат остатки рибозы

4. Установите соответствие.

При формировании вторичной структуры в нуклеиновых кислотах образуются комплементарные пары:

1. А=У	А. ДНК
2. А=Т	Б. РНК
3. Г≡Ц	В. Характерно для ДНК и РНК
4. Ц=А	Г. Не характерно для нуклеиновых кислот

5. Свойства генетического кода:

1. Каждый кодон шифрует одну аминокислоту
2. Каждую аминокислоту шифрует только один кодон

3. Одну аминокислоту могут кодировать несколько кодонов
6. Напишите структурную формулу дезоксицитидин-3'-фосфата.

7. Сравните состав нуклеотидов ЦМФ и дГМФ:

- | | |
|------------|-------------------------------------|
| 1. ЦМФ | А. Содержит пуриновое основание |
| 2. дГМФ | Б. Содержит пиримидиновое основание |
| 3. Оба | В. Содержит пентозу |
| 4. Ни один | Г. Содержит пирофосфат |

8. Дана цепь ДНК - достройте вторую цепь.

А—А—Т—Ц—Г—Г—Т—Т—А—Ц

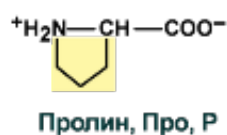
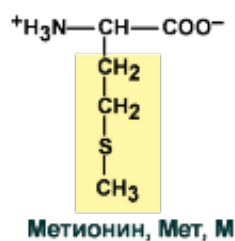
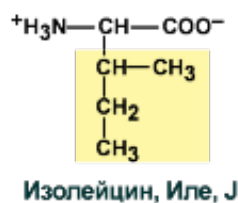
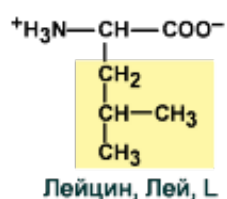
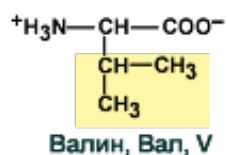
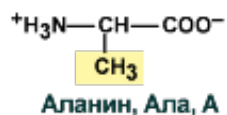
9. Заполните таблицу.

Сравнительная характеристика ДНК и РНК.

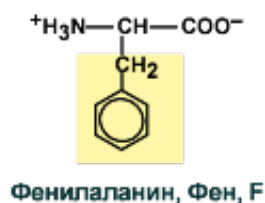
Признаки	ДНК	РНК
1. Количество цепей		
2. Азотистые основания в нуклеотидах		
3. Пентозы		
4. Нахождение в клетке		
5. Функции		

Приложение 1. Важнейшие аминокислоты

Неполярные Алифатические

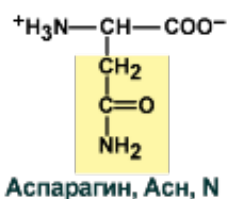
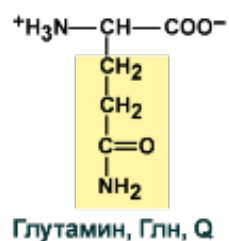
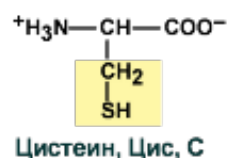
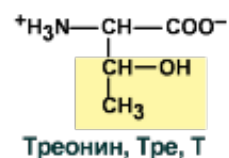
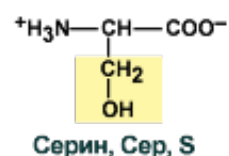
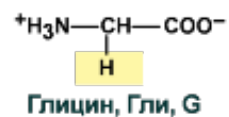


Ароматические

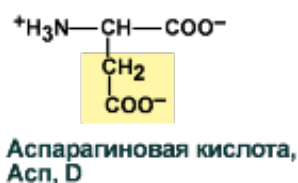
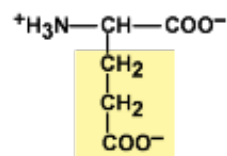


Полярные

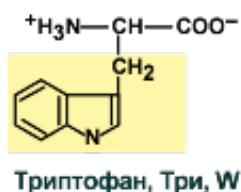
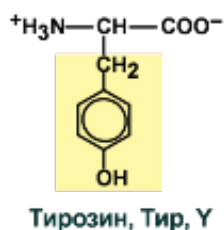
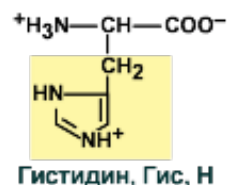
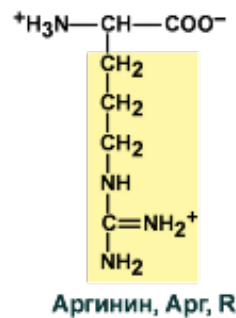
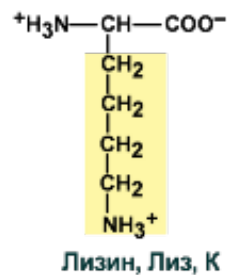
Незаряженные



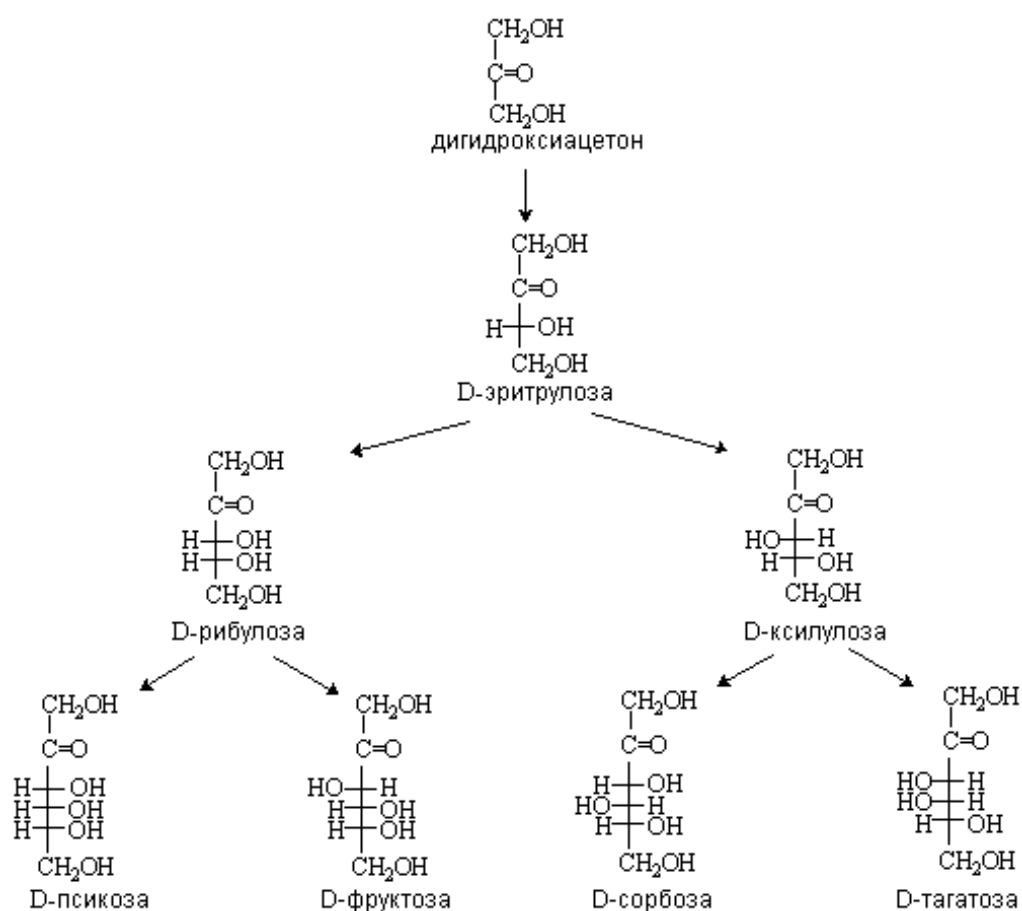
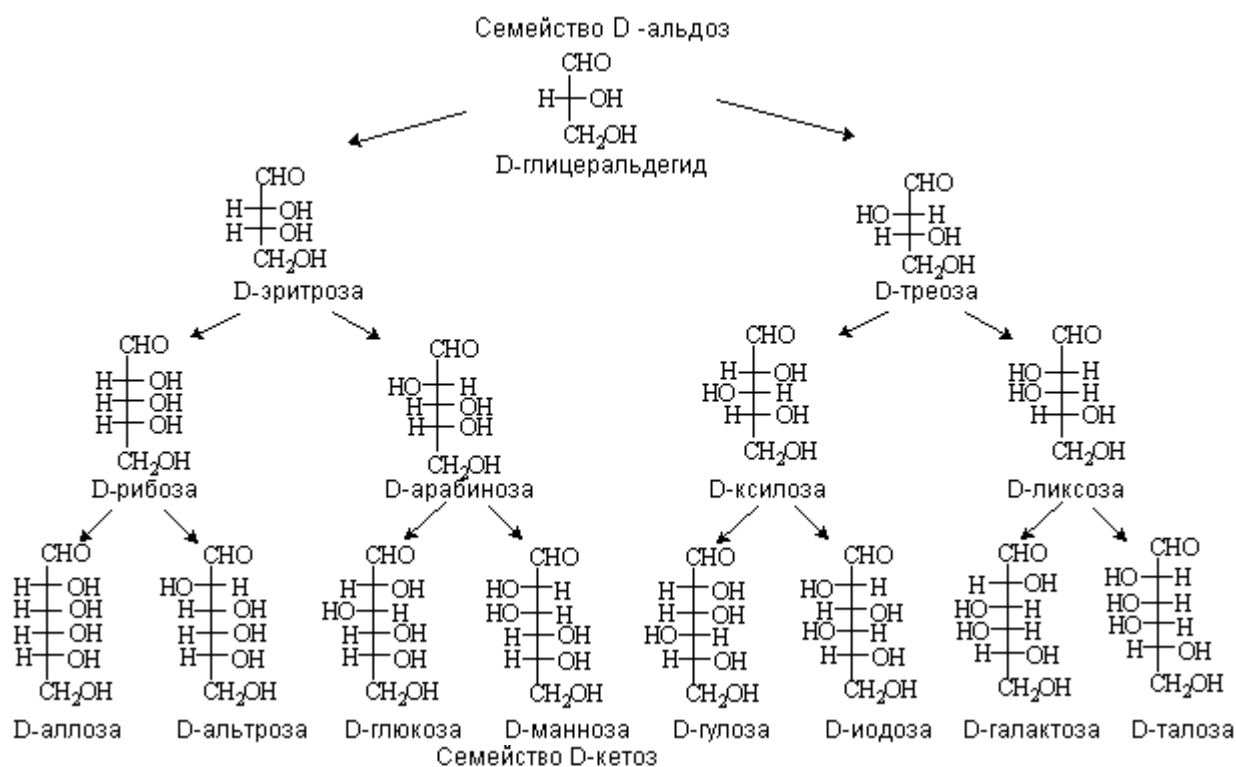
Отрицательно заряженные



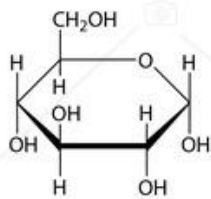
Положительно заряженные



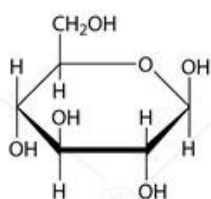
Приложение 2. Моносахариды



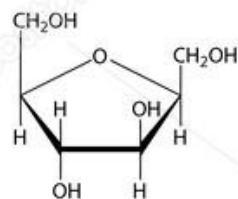
Приложение 3. Дисахариды и полисахариды



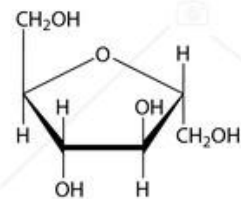
Alpha-D-Glucose



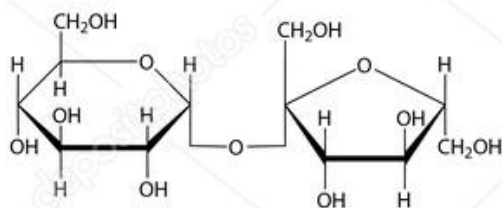
Beta-D-Glucose



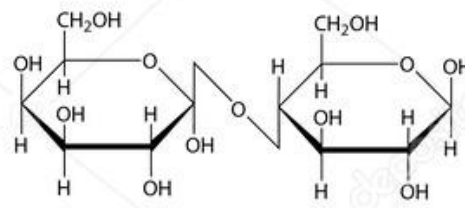
Alpha-D-Fructose



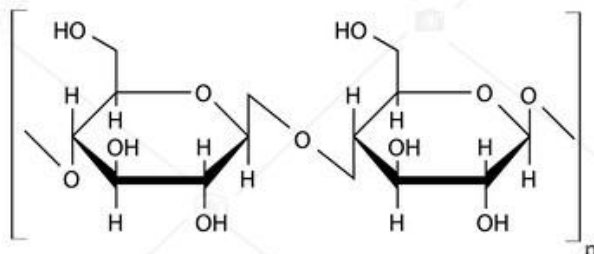
Beta-D-Fructose



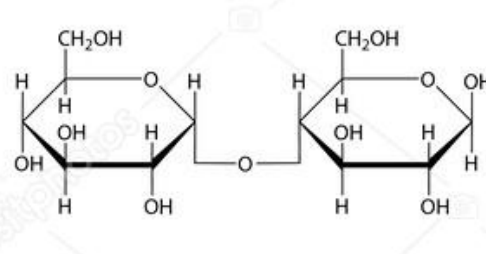
Sucrose (saccharose)



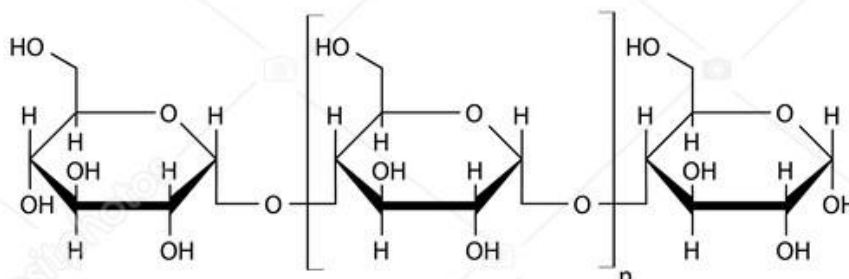
Lactose



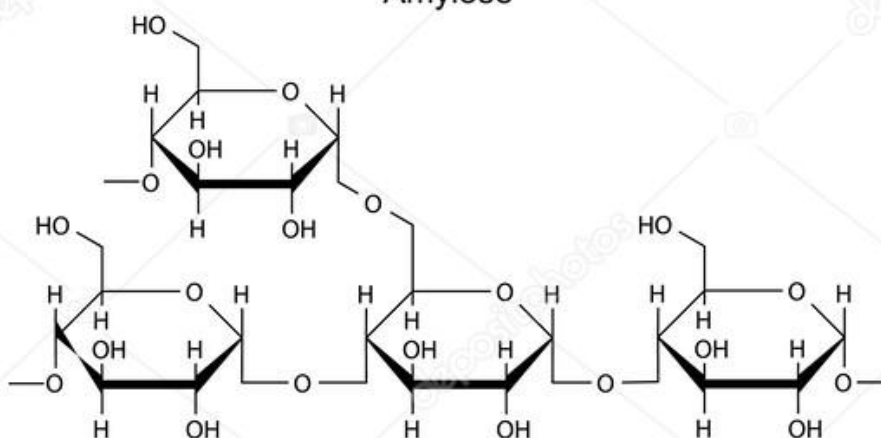
Cellulose



Maltose



Amylose



Amylopectin

Библиографический список

Основная литература

1. Ауэрман, Т. Л. Основы биохимии : учебное пособие / Т. Л. Ауэрман, Т. Г. Генералова, Г. М. Сусянок .— Москва : Инфра-М, 2016 .— 400 с.
2. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник для вузов / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина .— 3-е изд., испр. — М. : Высш. шк., 2000 .— 479 с.
3. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рём. — М. : Мир, 2000. — 469 с.
4. Комов, В. П. Биохимия : учебник для академического бакалавриата / В. П. Комов, В. Н. Шведова ; под общ. ред. В. П. Комова ; Санкт-Петербург. гос. химико-фармацевт. акад. — 4-е изд., испр. и доп. — Москва : Юрайт, 2015 .— 640 с.
5. Коницев, А.С. Молекулярная биология: учебник для студ.пед.вузов / А.С. Коницев, Г.А.Севастьянова. — 3-е изд., стер. - М.: Издательский центр «Академия», 2008. — 400с.
6. Марри, Р. Биохимия человека : в 2 т. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Радзуэлл; пер. с англ. В. В. Борисова, Е. В. Дайниченко; под ред. Л. М. Гиномдана .— М. : МИР, 1993 М. : Мир, 1993.
7. Николаев, А. Я. Биологическая химия : учебник для мед. вузов / А. Я. Николаев .— 3-е изд., перераб. и доп. — М. : Мед. информ. агентство, 2007 .— 566 с.
8. Спирин, А. С. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка : учебник для вузов / А. С. Спирин .— М. : Академия, 2011 .— 496 с. : ил
9. Строителев, В.В. Сборник задач по биологической химии : учебное пособие / В. В. Строителев, О. Н. Понаморева ; ТулГУ .— Тула : Изд-во ТулГУ, 2016 .— 118 с.
- 10.Эллиот, В. Биохимия и молекулярная биология : Учебное пособие для вузов / Пер.с англ.:О.В.Добрыниной и др.; Под ред.:А.И.Арчакова и др. — М. : Изд-во НИИ биомедицинской химии РАМН;ООО "Материк-Альфа", 2000 .— 372 с.

Дополнительная литература

- 11.Алейникова, Т.Л. Биохимия : учебник для вузов / Алейникова Т.Л. [и др.]; под ред.Е.С.Северина .— 3-е изд.,испр. — М. : ГЭОТАР-МЕД, 2006 .— 784с.
12. Гринстейн, Б. Наглядная биохимия : Пер.с англ. / Б.Гринстейн,А.Гринстейн .— М. : ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000 .— 119с.
- 13.Сингер М. Гены и геномы : в 2 т. / М. Сингер, П. Берг. — М. : Мир, 1998.
- 14.Северин, С.Е. Биологическая химия с упражнениями и задачами : учебник для высшего профессионального образования / С. Е. Северин [и др.] ; под ред. С. Е. Северина .— 2-е изд., испр. и доп. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013 .— 624 с.

- 15.Тюкавкина, Н. А. Биоорганическая химия : учебник для мед. вузов / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков, С. Э. Зурабян .— Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015 .— 416 с.
- 16.Щербаков, В.Г. Биохимия : учебник для вузов / В.Г.Щербаков;под ред.В.Г.Щербакова .— 3-е изд.,испр.и доп. — СПб. : ГИОРД, 2005 .— 472с.