

Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
ПЕТРОЗАВОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

Методические указания к лабораторным работам
и вопросы для самостоятельной подготовки
студентов 2-го курса эколого-биологического факультета

Петрозаводск
Издательство ПетрГУ
2007

Рассмотрены и утверждены к печати на заседании редакционной комиссии по отрасли науки и техники «биология» 11 сентября 2007 г.

Печатаются по решению
редакционно-издательского совета
Петрозаводского государственного университета

Составители
М. Н. Яковлева, канд. биол. наук;
В. В. Осташкова, канд. биол. наук;
Я. П. Нижник, канд. хим. наук

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящие методические указания содержат лабораторные работы по биологической химии, выполняемые студентами 2-го курса эколого-биологического факультета в процессе изучения предмета. На лабораторных занятиях студенты овладевают методами экспериментальных исследований, закрепляют теоретические знания, анализируют полученные на практических занятиях результаты. В каждой лабораторной работе излагаются цель и задачи, поставленные перед студентом, принцип используемого метода, ход работы, предлагается проанализировать результаты проведенных исследований и сделать выводы. Вопросы, представленные в конце каждого раздела, способствуют лучшему усвоению теоретического материала при самоподготовке.

РАЗДЕЛ 1 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОХИМИИ

РАБОТА 1. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВ В РАСТВОРАХ. ПРИНЦИП И ТЕХНИКА КОЛОРИМЕТРИРОВАНИЯ. УСТРОЙСТВО И ПРАВИЛА РАБОТЫ НА КФК-2

Цель работы: ознакомиться с одним из наиболее распространенных в биохимии методов количественного определения веществ в исследуемом растворе.

Задачи:

- ознакомиться с основными принципами и правилами работы на КФК-2;
- измерить оптическую плотность двух окрашенных растворов;
- подобрать наиболее оптимальную длину волны и размер кюветы для определения оптической плотности предложенных растворов.

Фотометрия – метод количественного анализа, основанный на определении концентрации вещества по спектру поглощения, испускания или флуоресценции.

В зависимости от характера возникающих изменений выделяется несколько видов фотометрии (колориметрия, нефелометрия, турбидиметрия, флуориметрия, рефрактометрия, поляриметрия и др.). Фотометрические методы анализа характеризуются высокой чувствительностью, достигающей 10^{-4} - 10^{-6} % определяемого элемента в твердых образцах и 10^{-5} - 10^{-7} % – в водных растворах. Колориметрический метод получил самое широкое распространение – среди биохимических методов количественного определения веществ в биологических объектах.

Принцип метода. В основе этого метода лежит закон Бугера – Ламберта – Бера (1852), согласно которому существует прямо пропорциональная зависимость между концентрацией вещества в окрашенном растворе и степенью поглощения лучей света данным раствором. Интенсивность поглощения света зависит не только от количества и природы растворенного вещества, но и от толщины слоя раствора, длины волны падающего света, температуры раствора.

Степень поглощения света окрашенным раствором выражается оптической плотностью (экстинкцией), под которой понимают логарифм отношения интенсивности света, падающего на раствор, к интенсивности света, прошедшего через раствор. Величина оптической плотности обозначается буквой E или D . Чем больше оптическая плотность, тем меньше света пропускает раствор. Для определения оптической плотности или светопропускания используют фотоэлектроколориметры.

1. Устройство фотоэлектроколориметра КФК-2

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

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

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

2. Выбор светофильтра

При проведении фотоэлектроколориметрии следует учитывать, что в данном методе используется монохроматический свет различных длин волн. Для преобразования полихроматического света в монохроматический используются светофильтры. В КФК-2 имеется набор из 11 светофильтров. Использование конкретного светофильтра позволяет пропускать через раствор лучи определенной длины, поглощение которых наиболее характерно для исследуемого вещества.

Обычно эффективная длина волны и цвет светофильтра указаны в применяемом методе. Если же такой ссылки нет, то выбрать нужный светофильтр можно с помощью таблицы:

Окраска исследуемого раствора	Цвет нужного светофильтра	Длина волны пропускаемого света, нм
Желтая	синий	420 – 450
Оранжевая	синий	430 – 460
Красная	зеленый	460 – 500
Пурпурная	зеленый	490 – 530
Синяя	оранжевый	590
Сине-зеленая	красный	600 – 650
Голубая	красный	750
Сине-фиолетовая	красный	750

Примечание. Некоторые растворы одинакового цвета могут избирательно поглощать лучи с различной длиной волны. Поэтому при подборе светофильтра желательно знать спектр поглощения исследуемого вещества, причем выбор его осуществляют таким образом, чтобы он пропускал лучи с длиной волны, максимально поглощаемой исследуемым раствором. Таким образом, при выборе светофильтра оптимальной длиной волны окажется та, при прохождении которой через исследуемый раствор оптическая плотность будет максимальной.

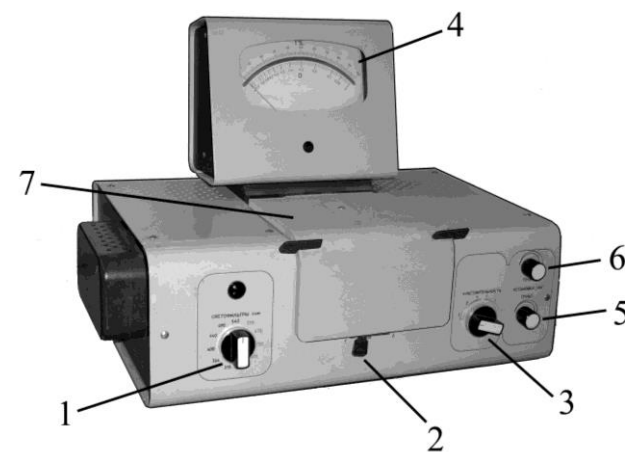
3. Подбор кювет

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

К каждому прибору прилагается набор кювет с толщиной слоя исследуемого раствора от 1 до 50 мм. Подбор кювет осуществляется

таким образом, чтобы оптическая плотность исследуемого раствора не была ниже величины 0,15 и выше 0,7. Именно в этих пределах наиболее точно выполняется закон Бугера – Ламберта – Бера. Следовательно, при интенсивной окраске раствора необходимо взять кюветы с меньшим расстоянием между рабочими гранями, а при слабой окраске – с большим расстоянием.

4. Общая схема прибора и обозначения



- 1 – Рукоятка установки светофильтра (около рукоятки маркировка по длине волны).
- 2 – Ручка перемещения кювет в кюветном отделении.
- 3 – Ручка включения чувствительности фотоприемников (обозначена цифрами 1, 2 и 3 черного цвета при работе в диапазоне волн от 315 до 540 нм и красного цвета – в диапазоне от 590 до 980 нм).
- 4 – Микроамперметр (по верхней шкале измеряют коэффициент светопропускания (от 0 до 100%), а по нижней – оптическую плотность раствора (от 0 до 1,5)).
- 5 – Ручка «грубой» настройки микроамперметра.
- 6 – Установка «точной» настройки микроамперметра.
- 7 – Крышка кюветного отделения.

5. Правила работы на КФК-2

I. Подготовка прибора к работе

1. Установить нужный светофильтр (рукояткой 1).
2. Рукоятку 3 (чувствительность фотоэлемента) установить на цифру 1 соответствующего цвета: при работе в диапазоне волн от 315 до 540 нм чувствительность обозначена цифрами черного цвета и в диапазоне от 590 до 980 нм – красного цвета.
3. Проверить, выключен ли микроамперметр (рукоятки 5 и 6 должны быть повернуты до отказа влево).
4. Прибор включить (вилку в сеть; тумблер, расположенный на задней стенке в нижнем левом углу, переключить в положение «вкл»). При этом загорается лампочка накаливания.
5. Прибор прогреть в течение 15-20 минут.

II. Измерение оптической плотности раствора

1. Кювету с контролем или растворителем поставить в дальнее (от исследователя) гнездо кюветодержателя; кювету с исследуемым раствором (опытом) – в ближнее гнездо кюветодержателя.
2. Кювету с контролем (или растворителем) поместить в световой поток поворотом ручки 2 до отказа влево.
3. Закрыть крышку кюветного отделения (7).
4. Установить стрелку микроамперметра на 0 по нижней шкале поворотом ручки 5 («грубой» настройки). В случае необходимости воспользоваться ручкой 6 («точной» настройки).

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

- а) микроамперметр выключить (рукоятки 5 и 6 до отказа влево);
- б) рукоятку переключения чувствительности фотоэлемента (3) поставить на цифру 2 соответствующего цвета;
- в) вывести стрелку микроамперметра на 0 по нижней шкале (то есть повторить действия, указанные в пункте 4).

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

5. Заменить в световом потоке кювету с контролем на кювету с исследуемым раствором (опытом), поворачивая рукоятку 2 до отказа вправо.
6. Записать величину оптической плотности исследуемого раствора по нижней шкале микроамперметра.
7. Микроамперметр выключить (рукоятки 5 и 6 до отказа влево).

III. Завершение работы на приборе

1. Реактивы из кювет вылить.
2. Кюветы сполоснуть дистиллированной водой и поставить в чашку Петри вверх донышком (кюветы необходимо полоскать только после полного завершения работы или методики, в промежутках между отдельными измерениями этого делать не следует!).
3. Прибор выключить (тумблер, расположенный на задней стенке в левом углу, переключить в положение «выкл.»; вилку вынуть из розетки).
4. Крышку кюветного отделения закрыть.

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

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

6. Определение концентрации вещества в растворе по оптической плотности

Определение концентрации вещества в окрашенном растворе по оптической плотности можно осуществить двумя способами – путем

сравнения с оптической плотностью стандартного раствора (такой способ используется, например, в ортотолуидиновом методе определения глюкозы в крови) или, более точно, в результате построения калибровочной кривой по стандартному раствору. В этом случае из *стандартного* раствора готовят серию *рабочих* растворов с известной концентрацией исследуемого вещества, проделывают с ними необходимые химические реакции и измеряют на ФЭКе оптическую плотность. Полученные результаты отражают графически, откладывая по оси абсцисс концентрацию вещества, а по оси ординат – соответствующую ей оптическую плотность. Определив оптическую плотность исследуемого раствора, находят содержание в нем вещества по калибровочной кривой.

Результаты проведенных исследований оформляют в виде таблицы:

Окраска раствора	Длина волны (нм)	Цвет светофильтра	Размер кюветы (мм)	Оптическая плотность (E)

Выводы:

РАЗДЕЛ 2 СОСТАВ И СВОЙСТВА БЕЛКОВ

2. 1. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ

Анализ аминокислотного состава белков можно осуществлять несколькими способами. Присутствие тех или иных аминокислот может быть выявлено с помощью цветных реакций на белок, а также в результате кислотного его гидролиза и последующего разделения полученной смеси аминокислот методом хроматографии.

РАБОТА 2. ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ

Цель работы: ознакомиться с основными наиболее распространенными цветными реакциями на белки и доказать, что с их помощью можно выявить сходство и различия в аминокислотном составе исследуемых белков (на примере яичного альбумина и желатина).

Задачи:

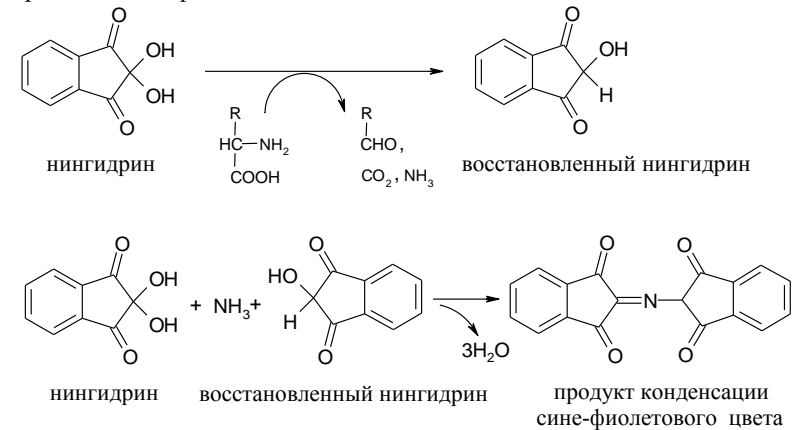
- провести цветные реакции на белки с раствором яичного альбумина и желатина;
- показать, что существуют *универсальные* цветные реакции, которые дают все белки, независимо от их аминокислотного состава, и *специфические* цветные реакции на определенные аминокислоты, позволяющие выявить различия в исследуемых белках;
- сравнить результаты проведенных исследований и сделать выводы;
- отметить, какие из проведенных реакций являются универсальными, а какие – специфическими.

Цветные реакции на белки являются качественными реакциями, обусловленными специфическими группами – радикалами. Некоторые из таких реакций широко используются в биохимической практике для изучения структуры и аминокислотного состава белков, их количественного определения.

Ход работы. К 1 мл 1%-го раствора белка (желатина, яичного белка или сывороточного альбумина) добавляют 1 мл 10%-го раствора щелочи (NaOH или KOH) и 1 каплю 1%-го раствора сульфата меди. Появляется сине-фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание.

2. Нингидриновая реакция (на аминогруппу, находящуюся в α -положении)

Принцип метода. Белки, полипептиды и свободные α -аминокислоты при нагревании реагируют с нингидрином (трикетогидринден-гидратом) с образованием продукта конденсации, окрашенного в фиолетовый цвет:

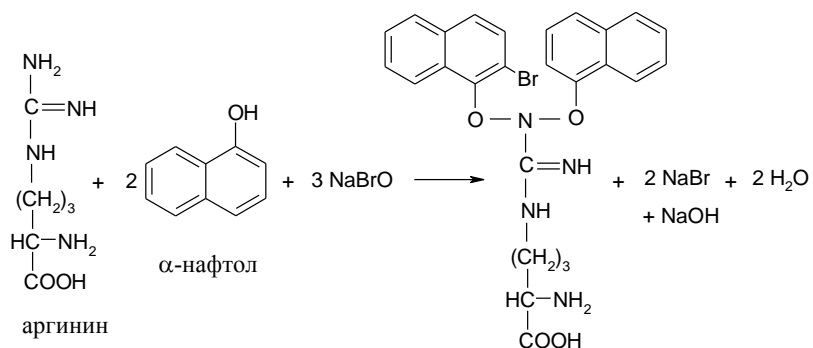


Ход работы. К 1 мл 1%-го раствора белка прибавляют 0,5 мл 0,5%-го раствора нингидрина и нагревают до кипения. Появляется фиолетово-синее окрашивание.

Продельвают эту реакцию с раствором аминокислоты, взяв вместо раствора белка 1%-й раствор глицина. Сравнить полученные результаты и сделать вывод.

3. Реакция Сакагучи (на аргинин)

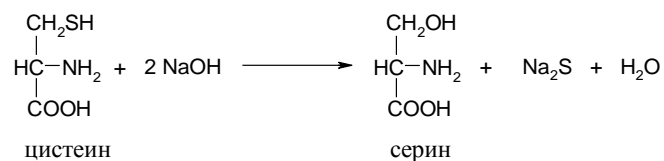
Принцип метода. Белки, содержащие аргинин, в присутствии щелочи дают красное окрашивание с гипобромитом и α -нафтолом. Гуанидиновая группа аргинина окисляется гипобромитом, и окисленный аргинин при взаимодействии с α -нафтолом образует продукт конденсации красного цвета:



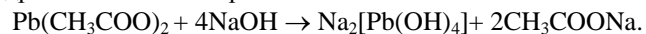
Ход работы. К 0,5 мл 1%-го раствора белка (яичного белка, желатина) добавляют 0,5 мл 10%-го раствора щелочи, 3 капли 0,1%-го спиртового раствора α -нафтола и после перемешивания – 2-3 капли 2%-го раствора гипобромита натрия. Появляется красное окрашивание.

4. Реакция Фоля (на цистеин и цистин)

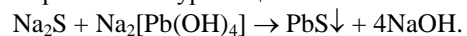
Принцип метода. При кипячении белка со щелочью от цистеина (цистина) легко отщепляется сера в виде сероводорода, который в щелочной среде образует сульфид натрия:



Для выявления сульфида натрия используют ацетат свинца, который при взаимодействии с гидроксидом натрия превращается в тетрагидроксоплюмбат натрия:



В результате взаимодействия ионов серы и свинца образуется сульфид свинца черного или бурого цвета:



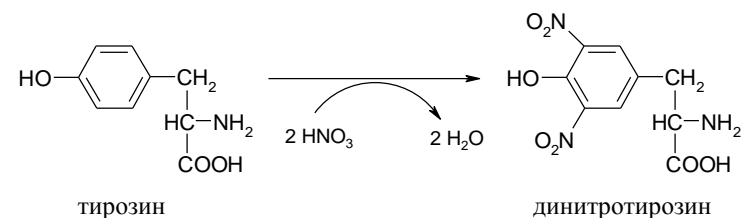
Ход работы. К 1 мл 1%-го раствора яичного белка или кусочку шерстяной нити добавляют 1 мл 30%-й щелочи и 3-4 капли 5%-го

раствора ацетата свинца. При интенсивном кипячении жидкость окрашивается в бурый или черный цвет.

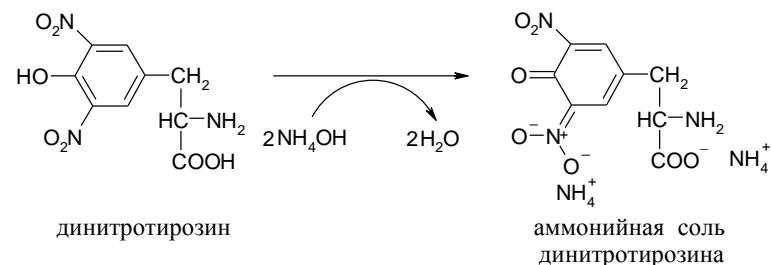
Реакцию Фоля прделывают с 1%-м раствором желатина, сравнивают полученные результаты и делают вывод.

5. Ксантопротеиновая реакция (на ароматические аминокислоты)

Принцип метода. При нагревании с концентрированной азотной кислотой белки дают желтое окрашивание. Реакция обусловлена наличием в белках ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана) и основана на образовании нитропроизводных этих аминокислот, имеющих желтую окраску:



Нитропроизводные аминокислот в щелочной среде образуют соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет:

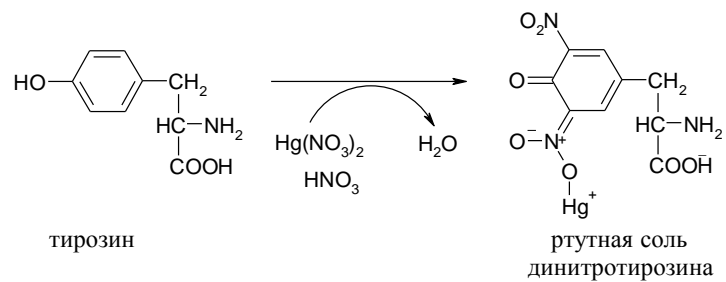


Ход работы. К 1 мл 1%-го раствора альбумина или яичного белка добавляют 5 капель концентрированной азотной кислоты. Появляется осадок. При осторожном нагревании смесь окрашивается в желтый цвет. После охлаждения осторожно добавляют 10 капель концентрированного раствора аммиака (или 30%-й раствор едкого натра), при этом желтая окраска переходит в оранжевую.

Проделявают эту реакцию с 1%-м раствором желатина и 0,1%-м раствором тирозина, сравнивают результаты и делают выводы.

6. Реакция Милона (на тирозин)

Принцип метода. Реакция Милона открывает в белке тирозин, в составе которого имеется фенольный гидроксил. При нагревании белка с реактивом Милона (смесь нитратов и нитритов ртути (I) и (II), растворенных в концентрированной азотной кислоте) образуется осадок, окрашенный сначала в розовый, а затем в красный цвет. Реактив Милона дает окрашивание почти со всеми фенолами:

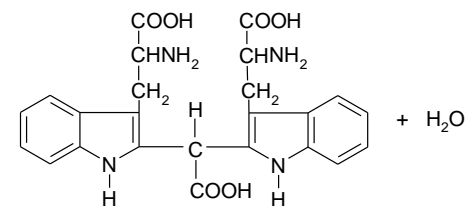
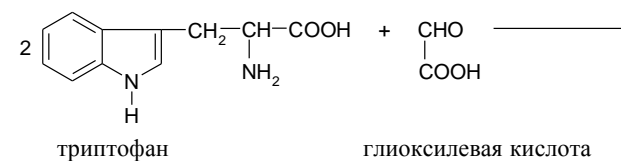


Ход работы. К 1 мл 1%-го раствора яичного белка добавляют 3-5 капель реактива Милона и осторожно нагревают до образования окрашенного в красный цвет осадка.

Аналогично проделявают реакцию с растворами желатина, тирозина и фенола. Полученные результаты сравнивают и делают вывод.

7. Реакция Адамкевича (на триптофан)

Принцип метода. Белки, содержащие триптофан, в присутствии глиоксиловой и серной кислот дают красно-фиолетовое окрашивание. Реакция основана на способности триптофана взаимодействовать в кислой среде с альдегидами (глиоксиловой кислотой) с образованием окрашенных продуктов конденсации:



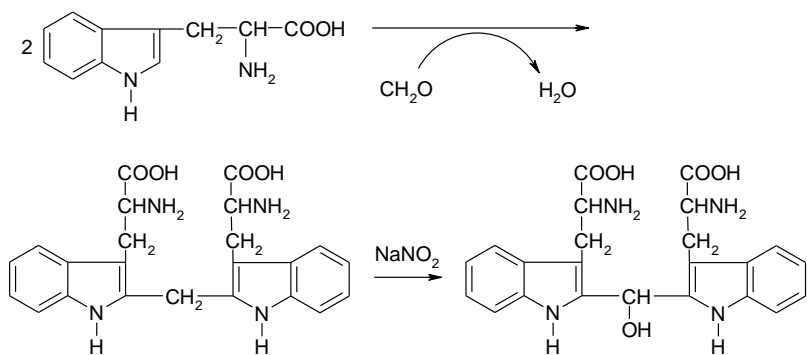
Глиоксиливая кислота всегда присутствует в небольшом количестве в ледяной уксусной кислоте, которую используют в реакции Адамкевича.

Ход работы. К 1 мл 1%-го раствора белка добавляют 1 мл ледяной (концентрированной) уксусной кислоты и осторожно нагревают до растворения осадка. После охлаждения к смеси осторожно добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты (по каплям, по стенке пробирки, чтобы жидкости не смешались). Через 5-10 минут на границе раздела двух слоев наблюдают образование красно-фиолетового кольца.

Проделяют реакцию Адамкевича с 0,1%-м раствором триптофана, сравнивают полученные результаты и делают вывод.

8. Реакция Ваузене (на триптофан)

Принцип метода. 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, который в присутствии минеральных кислот образует соли сине-фиолетового цвета.



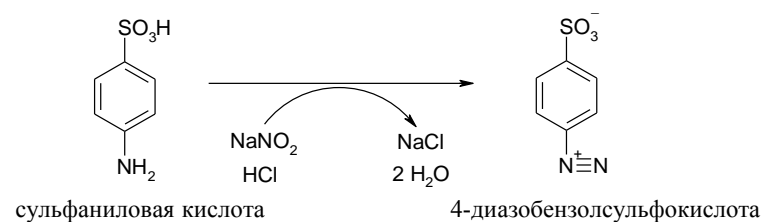
бис-2-триптофанметан

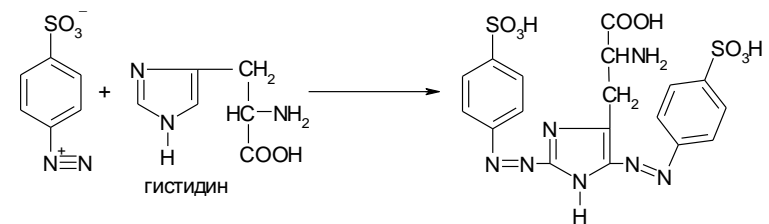
бис-2-триптофанкарбинол

Ход работы. К 2 мл 1%-го раствора яичного белка добавляют 1 каплю 2,5%-го 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%-го раствора нитрита натрия. Появляется сине-фиолетовая окраска.

9. Реакция Паули (на гистидин и тирозин)

Принцип метода. Реакция Паули позволяет обнаружить в белке аминокислоты гистидин и тирозин, которые образуют с диазобензолсульфокислотой соединения вишнево-красного цвета. Диазобензолсульфокислота образуется в реакции диазотирования при взаимодействии сульфаниловой кислоты с нитритом натрия (или калия) в кислой среде:





Ход работы. К 1 мл 1%-го раствора сульфаниловой кислоты (готовится на 5%-м растворе соляной кислоты) прибавляют 2 мл 0,5%-го раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают, добавляют 2 мл 1%-го раствора яичного белка и после перемешивания 6 мл 10%-го раствора карбоната натрия. После перемешивания смесь окрашивается в вишнево-красный цвет.

Проделяют эту реакцию с 0,1%-м раствором гистидина, сравнивают полученные результаты и делают вывод.

Общие выводы по работе:

Техника безопасности

- Категорически запрещается отмеривать концентрированные кислоты и щелочи обыкновенными пипетками – для отмеривания реактивов использовать мерные пробирки.
- Будьте внимательны при наливании концентрированных кислот и щелочей.
- В процессе нагревания постоянно перемешивайте жидкость, не допускайте выброса ее из пробирки.
- Соблюдайте правила пожарной безопасности.

РАБОТА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ ТКАНЕЙ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ. ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ПРОТЕИНОВ

Цель работы: ознакомиться с основными этапами изучения состава простых и сложных белков (гомогенизация биоматериала, экстракция белков, гидролиз и разделение смеси

аминокислот методом распределительной хроматографии.

Задачи:

- выделить белки из мышечной ткани и яичного альбумина;
- провести кислотный гидролиз яичного альбумина;
- разделить предложенную смесь аминокислот методом распределительной хроматографии, определить, какие аминокислоты входят в ее состав.

1. Основные этапы изучения состава протеинов

Первый этап. Выделение белков из биоматериала

а) Выделение белков из мышечной ткани

Принцип метода. Миофибриллы мышечной клетки содержат сократительные белки (миозин и актин) и регуляторные белки (тропомиозин и тропонин). Белки миофибрилл не растворяются в воде, но их можно экстрагировать из мышечной ткани солевыми растворами с концентрацией соли 0,5 моль/л. Многие белки саркоплазмы (гиалоплазмы мышечных клеток) растворимы в воде или солевых растворах низкой концентрации (0,05 моль/л). При экстракции мышечной ткани 5%-м раствором хлорида калия извлекаются как миофибриллярные, так и саркоплазматические белки.

Ход работы

1. Взвешивают 2 г мышечной ткани. Измельченную ножницами навеску помещают в фарфоровую ступку, добавляют 2 мл 5%-го раствора хлорида калия и растирают со стеклянным песком до гомогенного состояния. К гомогенату добавляют 3 мл раствора хлорида калия и растирают кашицу в течение 5 минут, после чего прибавляют еще 5 мл 5%-го раствора хлорида калия и продолжают растирание в течение 5 минут.

2. Полученный гомогенат фильтруют через два слоя марли или центрифугируют в течение 15 минут при 4000 об/мин.

3. С фильтратом (или центрифугатом) проводят цветные реакции на белки (биуретовую, ксантопротеиновую, реакции Милона, Фоля и Сакагучи).

б) Выделение яичного альбумина

Принцип метода. Яичный белок представляет собой смесь нескольких белков. Примерно 70% яичного белка составляет альбумин, который легко отделяется от глобулинов. При

десятикратном разведении яичного белка дистиллированной водой глобулины выпадают в осадок, а альбумин остается в растворе.

Ход работы

1. Чтобы отделить белок от желтка, осторожно проделывают отверстия в скорлупе яйца с двух концов и выливают белок в стакан емкостью 500 мл, затем в стакан добавляют 250 мл дистиллированной воды и содержимое тщательно перемешивают стеклянной палочкой с резиновым наконечником.

2. Раствор переносят в мерный цилиндр и объем доводят дистиллированной водой до 300 мл. Раствор оставляют на 30 минут при комнатной температуре для образования хлопьевидного осадка глобулинов.

Примечание: работу, описанную в пунктах 1 и 2, выполняет и демонстрирует дежурный студент, приготовленную суспензию затем использует каждый студент в группе.

3. 20 мл полученной суспензии дважды фильтруют через складчатый фильтр.

4. С фильтратом, содержащим яичный альбумин, проделывают цветные реакции на белки (биуретовую, нингидриновую, ксантопротеиновую, реакции Милона, Фоля).

Второй этап. Кислотный гидролиз белков

Принцип метода. В процессе гидролиза белков происходит разрыв пептидных связей и молекула белка поэтапно распадается на высокомолекулярные полипептиды, более простые пептиды и, наконец, на аминокислоты. Кислотный гидролиз белков проводят в присутствии соляной или серной кислот при кипячении.

Гидролиз, проводимый в лабораторных условиях, является важным методом изучения первичной структуры белка. В организме гидролиз постоянно протекает в процессе пищеварения и в тканях под действием протеолитических ферментов.

Ход работы. В небольшую колбочку, снабженную обратным холодильником, наливают 2-3 мл 2%-го раствора альбумина и 15-20 мл 25%-го раствора серной кислоты. Содержимое колбы кипятят под тягой в течение 60-90 минут. Через каждые полчаса (с момента закипания) с гидролизатом проделывают биуретовую реакцию, для этого к 0,5 мл гидролизата добавляют 30%-й раствор щелочи до нейтральной реакции по универсальной индикаторной бумаге и

1-2 капли 1%-го раствора сульфата меди. Отрицательная биуретовая реакция указывает на полное расщепление белка до аминокислот.

Для сравнения биуретовую реакцию делают с 2%-м раствором альбумина.

Вывод (написать уравнение гидролиза белков):

Третий этап. Разделение смеси аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге

Принцип метода. Метод основан на различной растворимости аминокислот в двух частично смешивающихся жидкостях: воде и органическом растворителе. Водная фаза неподвижна, так как вода сорбирована на инертном носителе – целлюлозе, которая в насыщенной влагой атмосфере (хроматографической камере) удерживает до 20-22% воды. Подвижной фазой является насыщенный водой органический растворитель. Чем больше растворимость аминокислот в воде и меньше в органическом растворителе, тем медленнее движется аминокислота на бумаге.

Положение аминокислот на бумаге можно определить с помощью нингидриновой реакции: в присутствии нингидрина отдельные аминокислоты выявляются в виде окрашенных пятен.

Показателем скорости движения аминокислоты является коэффициент распределения (R_f). Коэффициентом распределения называется отношение расстояния (в миллиметрах) от места нанесения аминокислоты (точка старта) до середины ее пятна (a) к расстоянию от точки старта до фронта растворителя (b): $R_f = a/b$. Коэффициент распределения является характерной величиной для каждой аминокислоты и постоянен при данных условиях опыта (растворитель, температура, сорт бумаги и др.).

Идентификация аминокислот на хроматограммах проводится путем сравнения R_f разделяемых и известных аминокислот (стандартов).

Существуют различные способы хроматографического разделения смеси аминокислот на бумаге.

Радиальная (круговая) хроматография

Для разделения смеси аминокислот используется растворитель, состоящий из смеси н-бутанола, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:5. Приготовленная смесь встряхивается в делительной воронке в течение 5 минут, а затем отстаивается 7-10 часов, после чего нижний слой используется для насыщения хроматографической камеры парами, а верхний – для разделения аминокислот. Хроматографической камерой служит эксикатор.

Ход работы

Хроматографическую бумагу вырезают в форме диска, диаметр которого соответствует внутреннему диаметру эксикатора. В центр диска (на точку старта) наносят микропипеткой в несколько приемов 0,005-0,01 мл исследуемой смеси аминокислот. Нанесение смеси следует проводить очень аккуратно, слегка касаясь микропипеткой стартовой точки, чтобы диаметр мокрого пятна был не более 5 мм. После каждого нанесения пятно подсушивают над электроплиткой или в термостате.

В центре хроматограмм делают иглой отверстие, в которое пропускают фитилек из сложенной вчетверо х/б нити. Хроматограмму помещают в эксикатор, на дно которого предварительно наливают верхний слой растворителя. Проверяют положение фитилька и хроматограммы: конец фитилька должен быть погружен в растворитель, а края хроматограммы должны находиться на выступе эксикатора. Закрывают эксикатор крышкой.

Растворитель поднимается вверх по фитильку, а затем радиально распространяется по бумаге от центра. Когда растворитель достигнет края бумаги, ее вынимают из эксикатора, высушивают под тягой, обрабатывают 0,5%-м раствором нингидрина (готовится на ацетоне или спирте) и помещают в сушильный шкаф при 60-70 °С на 10-15 минут. На хроматограмме появляются сине-фиолетовые пятна, каждое из которых соответствует отдельной аминокислоте.

Нисходящая хроматография

В качестве хроматографической камеры используют высокие стеклянные банки с выступом в верхней части. На выступ в строго горизонтальном положении ставят лодочку – специальный стеклянный сосуд для растворителя.

Ход работы

Из хроматографической бумаги вырезают полоску шириной 5 см и длиной, примерно соответствующей высоте камеры. На расстоянии 10 см от конца полоски проводят простым карандашом стартовую линию, в середине которой отмечают точку старта. На стартовую точку микропипеткой наносят 0,005-0,01 мл смеси аминокислот (в несколько приемов, диаметр мокрого пятна не более 5 мм), периодически просушивая бумагу над электрической плиткой (или над настольной лампой).

На дно хроматографической камеры наливают небольшое количество нижнего слоя растворителя, а в установленную лодочку – верхний слой растворителя. Хроматограмму с нанесенной смесью аминокислот помещают в камеру так, чтобы ближний к старту конец был опущен в лодочку и зафиксирован в ней предметным стеклом, а другой висел вертикально, не касаясь стенок камеры. Камеру закрывают крышкой и оставляют при комнатной температуре на 18-20 часов.

Растворитель продвигается по хроматограмме сверху вниз, и когда фронт его приблизится к нижнему краю бумаги, хроматограмму вынимают из камеры и высушивают под тягой. Затем ее обрабатывают 0,5%-м раствором нингидрина и помещают в сушильный шкаф при 60-70 °С на 10-15 минут для развития окраски, после чего на ней появляются пятна сине-фиолетового или лилового цвета, соответствующие аминокислотам.

Результаты:

Выводы:

2.2. ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ

РАБОТА 4. РАСТВОРИМОСТЬ И РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

Цель работы: изучение важного свойства белков – способности к растворению и реакциям осаждения.

Задачи:

- выделить основные две фракции из яичного белка и доказать, что альбумин, входящий в его состав, хорошо растворяется в дистиллированной воде, а глобулин – в растворе солей;
- провести предложенные реакции необратимого осаждения белков;
- с помощью реакций высаливания разделить белки плазмы крови на основные фракции (фибриноген, альбумины и глобулины);
- доказать, что высаливание – обратимый процесс, при котором сохраняются свойства нативного белка, а денатурация – необратимый;
- проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

1. Растворимость белков

Многие белки растворяются в воде, что обусловлено наличием на поверхности белковой молекулы свободных гидрофильных групп. Растворимость белка в воде зависит от структуры белка, реакции среды, присутствия электролитов. В кислой среде лучше растворяются белки, для которых характерны кислотные свойства, а в щелочной – белки, обладающие основными свойствами. Альбумины хорошо растворяются в дистиллированной воде, а глобулины растворимы в воде только в присутствии электролитов. Не растворяются в воде белки опорных тканей (коллаген, кератин, эластин и др.).

Ход работы

1. К 2 каплям неразведенного яичного белка прибавляют 1 мл дистиллированной воды и перемешивают. При этом яичный альбумин растворяется, а яичный глобулин выпадает в виде небольшого осадка.

2. К 2 каплям яичного белка прибавляют 1 мл 5%-го раствора хлорида калия. В слабом солевом растворе растворяются как альбумины, так и глобулины.

3. Проверяют растворимость в воде и 5%-м растворе хлористого калия белка кератина, содержащегося в шерсти и волосах.

2. Реакции осаждения белков

Реакции осаждения белков могут быть необратимыми и обратимыми.

А. Необратимое осаждение белков (денатурация)

Принцип метода. Необратимые реакции осаждения приводят к денатурации белков, при этом разрушается пространственная

структура молекулы и белки утрачивают свои естественные биологические и физико-химические свойства. Денатурацию белков можно вызвать физическими воздействиями (кипячение, замораживание, высокое давление, вибрация, радиоактивное излучение и др.) и химическими осадителями.

1. Осаждение белков неорганическими осадителями

Осаждение белков минеральными кислотами

Ход работы. В пробирку осторожно наливают около 1 мл концентрированной азотной кислоты. Затем, наклонив пробирку, медленно по стенке добавляют 1 мл 1%-го раствора белка. На границе двух жидкостей появляется осадок в виде белого кольца.

Такую же реакцию проделывают с концентрированной соляной и серной кислотами.

Осаждение белков солями тяжелых металлов

Ход работы. В три пробирки наливают по 1 мл 1%-го раствора белка и добавляют по 3-4 капли: в первую пробирку – 7%-го раствора сульфата меди, во вторую – 5%-го раствора ацетата свинца, в третью – 5%-го раствора серебра. Во всех пробирках образуется осадок.

2. Осаждение белков органическими осадителями

Осаждение белка органическими кислотами

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 2 мл 1%-го раствора белка и добавляют: в одну пробирку 4-5 капель 10%-го раствора сульфосалициловой кислоты, в другую – 5-10 капель 10%-й трихлоруксусной кислоты (CCl_3COOH). Выпадает осадок белка.

Осаждение белка органическими растворителями

Ход работы. К 1 мл 1%-го раствора белка добавляют 2 мл органического растворителя (96%-го этанола, хлороформа, ацетона или эфира) и перемешивают. Образование осадка можно усилить добавлением нескольких капель насыщенного раствора хлорида натрия.

Осаждение белков реактивами на алкалоиды

Ход работы. В три пробирки наливают по 1 мл 1%-го раствора белка, по 4-5 капель 1%-го раствора уксусной кислоты и по 2-3 капли: в первую пробирку – 10%-го раствора пикриновой кислоты, во вторую – насыщенного раствора танина, в третью – 5%-го раствора железисто-синеродистого калия. Наблюдают выпадение осадка.

3. Осаждение белков при нагревании

Ход работы. В пять пробирок наливают по 0,5 мл 1%-го раствора яичного белка.

Содержимое первой пробирки нагревают до появления опалесценции (помутнения раствора).

К раствору белка во второй пробирке осторожно добавляют 1 каплю 1%-го раствора уксусной кислоты, нагревают и наблюдают вначале появление опалесценции, а затем выпадение белого хлопьевидного осадка белка. Это объясняется тем, что белок теряет заряд и находится в изоэлектрическом состоянии.

К раствору белка в третьей пробирке добавляют 1-2 капли 10%-го раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок не образуется, так как в кислой среде частицы белка перезаряжаются и приобретают положительный заряд.

К раствору белка в четвертой пробирке добавляют 1-2 капли 10%-го раствора уксусной кислоты, 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают. Выпадает осадок вследствие адсорбции ионов электролита (образование двойного электрического слоя) и нейтрализации заряда на частицах белка.

К раствору белка в пятой пробирке добавляют 1 каплю 10%-го раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок не образуется, так как в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка усиливается.

Б. Обратимое осаждение белков (высаливание)

При добавлении к водным растворам белков сульфатов или хлоридов щелочных и щелочноземельных металлов (Na_2SO_4 , NaCl , MgSO_4 и др.) происходит дегидратация и нейтрализация белковых частиц, при этом белки выпадают в осадок без изменения нативной структуры. Такой тип осаждения белков называется высаливанием. Высаливание – обратимый процесс, и после удаления соли (разбавлением водой, диализом) белок вновь приобретает природные свойства. Поскольку разные белки высаливаются при различных концентрациях солей, этот метод используется для фракционирования белков. Для разделения белков методом высаливания широко применяется сульфат аммония.

*Фракционное осаждение белков плазмы крови
сульфатом аммония*

Принцип метода. Фибриноген выпадает в осадок при 33%-м насыщении плазмы сернокислым аммонием, глобулины – при полунасыщении, а альбумины – при полном насыщении.

Ход работы

К 2 мл плазмы крови (для измерения объемов жидкостей в данном опыте используют мерные пробирки) добавляют 5 мл дистиллированной воды, 3,5 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. В осадок выпадает фибриноген (можно наблюдать лишь незначительное помутнение), который отделяют фильтрованием. Наличие белка на фильтре проверяют биуретовой реакцией: для этого воронку с фильтром переносят в чистую пробирку и на фильтр наливают 1 мл 10%-го раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1%-го раствора сульфата меди. Фильтрат (№ 1) используют для дальнейшей работы.

К 4 мл фильтрата № 1 добавляют 4 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. В осадок выпадают глобулины, которые отделяют фильтрованием. Получают осадок, с которым проделывают биуретовую реакцию, и фильтрат № 2.

К фильтрату № 2 добавляют при постоянном перемешивании стеклянной палочкой кристаллический сульфат аммония до насыщения (пока соль не перестанет растворяться). Выпадают в осадок альбумины, наличие которых проверяют биуретовой реакцией: 1 мл смеси переносят в чистую пробирку, добавляют 1 мл 10%-го раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1%-го раствора сульфата меди.

Оставшийся фильтрат № 2 используют для доказательства обратности процесса высаливания. Для этого в насыщенный раствор фильтрата № 2 добавляют дистиллированную воду до полного растворения осадка. Для сравнения такой же опыт проделывают с пробиркой, в которой белок был осажден трихлоруксусной кислотой (см. выше). Сравнивают результаты и делают выводы.

Общие выводы по работе:

Техника безопасности

1. Соблюдайте особую осторожность при работе с концентрированной серной, соляной и азотной кислотами, с раствором трихлоруксусной и сульфосалициловой кислот, с 10%-м раствором щелочи.
2. Будьте внимательны при нагревании растворов.

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Что такое α -аминокислота? Приведите примеры.
2. Напишите формулы серосодержащих аминокислот.
3. Какая аминокислота оптически неактивна? Напишите ее формулу.
4. Какие аминокислоты содержат ароматическое кольцо? Напишите их формулы.
5. Какие аминокислоты заряжаются отрицательно при $\text{pH}=7$? Напишите их формулы.
6. Какие аминокислоты заряжаются положительно при $\text{pH}=7$? Напишите их формулы.
7. Напишите формулы гидроксилсодержащих аминокислот.
8. Напишите формулы неполярных аминокислот.
9. Перечислите реакции, с помощью которых можно обнаружить аминокислоты. Укажите, на какие функциональные группы эти реакции?
10. Какова роль аминокислот?
11. Что такое белки?
12. Назовите универсальные реакции на белки.
13. Что открывают биуретовая и нингидриновая реакция?
14. Что такое полноценные белки?
15. Какие аминокислоты называют незаменимыми? Перечислите их.
16. Какие аминокислоты относят к условно незаменимым? Напишите их формулы.
17. Каково содержание азота в белках?
18. Какие существуют уровни белковой структуры?
19. Что такое первичная структура?
20. Что такое вторичная структура?
21. Назовите типы вторичной структуры.
22. Укажите основные характеристики α -спирали.

23. Укажите основные характеристики β -структуры.
24. Что такое домены?
25. Дайте понятие третичной структуры белка.
26. Какова роль шаперонов?
27. Что такое фибриллярные белки? Приведите примеры фибриллярных белков.
28. Какие белки называются глобулярными?
29. Дайте краткую характеристику структуры и биологической роли миоглобина.
30. Что такое четвертичная структура?
31. Каким методом можно определить N-концевую аминокислоту в белке?
32. Какие методы используют при определении C-концевой аминокислоты?
33. Перечислите основные свойства белков.
34. Что такое денатурация белка? Чем ее можно вызвать?
35. Что такое высаливание белков?
36. Какими особенностями обладают растворы белков?
37. Почему белки амфотерны?
38. Почему белки ведут себя как буферы?
39. Что такое простые белки?
40. Что такое сложные белки?
41. Какова особенность структуры коллагена и чем она обусловлена?
42. Какова особенность кератиновых белков и чем она обусловлена?
43. Напишите формулу гема. Приведите примеры гемсодержащих белков.
44. Каковы особенности структуры и роль гемоглобина?
45. Каковы особенности структуры и роль иммуноглобулинов?

РАЗДЕЛ 3
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА
НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

РАБОТА 5. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ПРОДУКТЫ
ГИДРОЛИЗА НУКЛЕОПРОТЕИНОВ ДРОЖЖЕЙ

Нуклеопротеины – сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты. Для качественного анализа химического состава нуклеопротеинов могут быть использованы дрожжи, богатые этими сложными белками. Продукты кислотного гидролиза нуклеопротеинов дрожжей обнаруживают с помощью специфических качественных реакций.

Ход работы

1. Взвешивают 2,5 г пекарских дрожжей. Навеску помещают в колбочку и добавляют 20 мл 10%-го раствора серной кислоты. Колбочку закрывают пробкой, в которую вставлен обратный холодильник, и ставят на песочную баню. Через 1 час после начала кипения жидкости гидролиз прекращают. После охлаждения гидролизат фильтруют через бумажный фильтр.

2. С фильтратом проводят качественные реакции на составные части нуклеопротеинов:

а) Биуретовая реакция на полипептиды

К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10%-го раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1%-го раствора сульфата меди. Жидкость окрашивается в розово-фиолетовый цвет.

б) Серебряная проба на пуриновые основания

К 10 каплям гидролизата добавляют по каплям концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции (проверить по индикаторной бумажке, опущенной в пробирку), затем 10 капель 2%-го аммиачного раствора нитрата серебра. При стоянии через 3-5 минут выпадает осадок серебряных соединений пуриновых оснований (аденина и гуанина), окрашенный в светло-коричневый (бурый) цвет.

в) Проба Молиша на пентозу

К 10 каплям гидролизата добавляют 3 капли 1%-го спиртового раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно приливают 20-30 капель концентрированной серной кислоты. После перемешивания развивается красное окрашивание, обусловленное

продуктом конденсации тимола с фурфуролом, образовавшимся из пентозы.

г) Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу

К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 30%-го раствора гидроксида натрия и 1-3 капли 7%-го раствора сульфата меди до появления не исчезающей мути гидроксида меди (II); перемешивают. При нагревании до кипения выпадает желтый осадок гидроксида меди (I) или красный осадок оксида меди (I).

д) Качественная реакция на рибозу и дезоксирибозу

с дифениламином

Дифениламин дает синее окрашивание с дезоксирибозой и зеленое – с рибозой. К 5 каплям гидролизата добавляют 20 капель 1%-го раствора дифениламина и пробирку ставят в кипящую водяную баню на 15 минут. Развивается сине-зеленое окрашивание.

е) Качественная реакция на углеводы с α -нафтолом

К 5 каплям гидролизата добавляют 3 капли 0,2%-го спиртового раствора α -нафтола и 20 капель концентрированной серной кислоты. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

ж) Молибденовая проба на фосфорную кислоту

К 10 каплям гидролизата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят. При этом жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. Пробирку сразу охлаждают в струе холодной воды. На дне пробирки появляется кристаллический лимонно-желтый осадок фосфорно-молибденовокислого аммония.

Общие выводы по работе:

РАБОТА 6. ВЫДЕЛЕНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИНА ИЗ СЕЛЕЗЕНКИ

Цель работы: ознакомиться с одним из способов выделения ДНП из животных тканей и с помощью качественных реакций изучить состав нуклеопротеинов.

Задачи:

- выделить дезоксирибонуклеопротеины из селезенки;
- доказать, что по структуре они представляют собой сложные белки;
- с помощью цветных реакций доказать, что выделенный белок из селезенки относится к дезоксирибонуклеопротеинам.

Дезоксирибонуклеопротеины (ДНП) выделяют из тканей, богатых клеточными ядрами (селезенки, зубной железы и др.). ДНП нерастворимы в воде, но хорошо растворяются в щелочных и солевых растворах, поэтому при нейтрализации щелочных растворов или при разведении водой солевых растворов они выпадают в осадок.

Ход работы

а) Выделение ДНП

В фарфоровой ступке растирают 0,5 г селезенки (или зубной железы) со 100 мг стеклянного порошка, постепенно добавляя небольшими порциями 15 мл 5%-го раствора хлорида натрия. Затем содержимое ступки фильтруют через двойной слой марли.

В химический стакан вместимостью 150 мл наливают 60-90 мл дистиллированной воды и медленно, при непрерывном помешивании стеклянной палочкой вливают в воду полученный фильтрат. Нерастворимые в воде ДНП выпадают в осадок в виде нитей, наматывающихся на палочку. Выделенные ДНП осторожно вынимают вместе с палочкой, переносят в чистую пробирку и растворяют в 1-2 мл 0,4%-го раствора гидроксида натрия.

Примечание. Если нити ДНП не образовались, а выделился хлопьевидный осадок, то ему дают отстояться, после чего большую часть жидкости из стакана осторожно сливают, оставшуюся часть центрифугируют.

б) Цветные реакции на составные компоненты ДНП

С полученным раствором ДНП проводят качественные реакции.

1. Биуретовая реакция на белок

Ход работы. К 10 каплям раствора ДНП добавляют 10 капель 10%-го раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1%-го раствора сульфата меди. Раствор окрашивается в сине-фиолетовый цвет.

2. Реакция с дифениламином на дезоксирибозу

Ход работы. К 10 каплям раствора ДНП добавляют 20 капель дифениламинового реактива (дифениламин, растворенный в ледяной уксусной кислоте с добавлением концентрированной серной кислоты), перемешивают и ставят в кипящую водяную баню на 5-10 минут. Жидкость постепенно приобретает синее окрашивание, обусловленное реакцией дифениламина с дезоксирибозой.

Выводы:

РАБОТА 7. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОЗЫ ПО МЕТОДУ МЕЙБАУМ

Цель работы: ознакомиться с одним из методов количественного определения рибозы

Задачи:

- построить калибровочную кривую по стандартному раствору рибозы;
- определить содержание рибозы по методу Мейбаум в предложенной пробе.

Рибоза входит в состав РНК, рибонуклеопротеин (РПН)ов и некоторых коферментов. Существуют колориметрические методы определения содержания указанных веществ, основанные на количественном определении рибозы.

Принцип метода. Метод Мейбаум основан на способности рибозы к дегидратации с образованием фурфурола, дающего с орцином соединение, окрашенное в сине-зеленый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию рибозы.

1. Построение калибровочной кривой

Ход работы. В пять сухих пробирок вносят *основной стандартный* раствор рибозы (содержит 12,5 мкг рибозы в 1 мл) и дистиллированную воду в количествах, указанных в таблице:

№ проб	Стандартный раствор (мл)	H ₂ O (мл)	Количество рибозы в пробе (мкг)	E _{сред.}
1.	0,2	0,8	2,5	
2.	0,4	0,6	5,0	
3.	0,6	0,4	7,5	
4.	0,8	0,2	10,0	
5.	1,0	-	12,5	
Контроль	-	1,0	-	
Исследуемый раствор	-	-		

В контрольную пробу наливают 1 мл дистиллированной воды. Во все пробирки добавляют автоматической пипеткой (или мерной пробиркой) по 1 мл орцинового реактива, перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 20 минут. Затем пробирки охлаждают под струей холодной воды, добавляют по 3 мл дистиллированной воды и содержимое перемешивают. Полученные *рабочие стандартные* растворы колориметрируют на КФК-2 против контроля в кюветках на 10 мл с красным светофильтром (длина волны 670 нм). Результаты определения оптической плотности используют для построения калибровочной кривой.

1. Определение количества рибозы в исследуемом растворе

Ход работы. К 1 мл *исследуемого* раствора рибозы добавляют 1 мл орцинового реактива (автоматической пипеткой или мерной пробиркой) и далее анализ проводят так же, как при построении калибровочной кривой.

Концентрацию рибозы рассчитывают по калибровочной кривой.

Результаты:

Выводы:

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Что такое нуклеотид? Приведите пример химической структуры.

2. Что такое нуклеозид? Приведите пример химической структуры.
3. Что такое нуклеиновая кислота?
4. Какие существуют виды нуклеиновых кислот?
5. Какие азотистые основания присутствуют в ДНК? Напишите формулы.
6. Какие азотистые основания присутствуют в РНК? Напишите формулы.
7. Какой связью соединяются нуклеотиды в нуклеиновой кислоте?
8. Сколько водородных связей возникает между комплементарными парами?
9. Какие существуют отличия ДНК от РНК?
10. Какие существуют виды РНК?
11. Какова функция тРНК?
12. Какие особенности первичной структуры тРНК?
13. Как называется вторичная структура тРНК? Какие связи участвуют в ее образовании?
14. Дайте краткую характеристику вторичной и третичной структуры тРНК.
15. Из чего состоят рибосомные субчастицы?
16. Каковы особенности вторичной и третичной структуры рРНК?
17. Перечислите функции рРНК и мРНК.
18. Дайте краткую характеристику структуры мРНК.
19. Что называется генетическим кодом? Что такое триплет или кодон?
20. Перечислите свойства генетического кода.
21. Какой кодон является иницирующим? Перечислите терминирующие кодоны.
22. Каковы особенности первичной структуры ДНК?
23. Что такое двойная спираль?
24. Дайте характеристику третичной структуры ДНК.
25. Назовите виды матричного синтеза.
26. Что такое репликация?
27. Что такое транскрипция?
28. Что такое процессинг пре-РНК?
29. Что такое трансляция?
30. Перечислите этапы трансляции.

РАЗДЕЛ 4. ФЕРМЕНТЫ

РАБОТА 8. ОЗНАКОМЛЕНИЕ С ДЕЙСТВИЕМ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ

Цель работы: ознакомиться с каталитическим действием некоторых ферментов пищеварительного тракта (амилазы слюны, пепсина и липазы) и каталазы крови.

Задачи:

- проделать предложенные реакции;
- написать уравнения реакций, катализируемых исследуемыми ферментами;
- проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

Ферменты (энзимы) – простые и сложные белки, катализирующие определенные химические реакции в организме. Так, амилаза слюны катализирует гидролиз α -1,4-глюкозидных связей крахмала и гликогена, что приводит к образованию декстринов, а затем мальтозы. Панкреатическая липаза превращает ацилглицерины в глицерол и жирные кислоты. Фермент желудочного сока пепсин ускоряет гидролитический распад белков до пептидов. Каталаза расщепляет пероксид водорода на воду и молекулярный кислород. Тирозиназа катализирует превращение тирозина в пигмент меланин.

При ознакомлении с действием фермента сравнивают результаты энзиматической реакции с контрольными пробами, полученными в отсутствие фермента.

1. Ознакомление с действием амилазы слюны

Ход работы. В две пробирки наливают по 5 мл 0,2%-го раствора крахмала, в одну из них добавляют 0,5 мл слюны, а в другую (контроль) – 0,5 мл дистиллированной воды. Содержимое каждой пробирки перемешивают и пробы помещают в термостат при 37 °С на 15 минут. Затем в обе пробирки добавляют по 1-2 капли раствора Люголя (раствор йода в растворе KI). В контрольной пробирке появляется синее окрашивание, а в опытной (с амилазой слюны) такая окраска не развивается.

2. Ознакомление с действием липазы

Ход работы. В две пробирки наливают по 4 мл дистиллированной воды, 5 мл 1%-го раствора бикарбоната натрия и 1 мл растительного

масла. Содержимое пробирок энергично встряхивают до образования эмульсии и в обе пробирки добавляют по 3 капли 0,5%-го спиртового раствора фенолфталеина. Затем в одну пробирку приливают 1 мл раствора липазы, а в другую (контроль) – 1 мл дистиллированной воды. Содержимое снова энергично встряхивают и пробирки ставят в термостат при 37 °С на 15-20 минут. В пробирке с липазой раствор становится менее окрашенным или обесцвечивается, в контрольной – остается розовым.

3. Ознакомление с действием пепсина

Ход работы. В две пробирки наливают по 2 мл 1%-го раствора альбумина и денатурируют его нагреванием. Пробирки охлаждают до комнатной температуры, а затем в одну из них добавляют 1 мл раствора пепсина, а в другую (контроль) – 1 мл дистиллированной воды. Обе пробы помещают в термостат при 37 °С на 15 минут. В пробирке с ферментом муть исчезает.

4. Ознакомление с действием каталазы

Ход работы. В две пробирки наливают по 5 мл свежеприготовленного 5%-го раствора перекиси водорода и в одну из них добавляют 1 каплю крови, в которой содержится фермент каталаза. В пробирке с каталазой наблюдается интенсивное выделение пузырьков кислорода.

5. Ознакомление с действием тирозиназы

Ход работы.

а) Приготовление препарата тирозиназы

10 г измельченного картофеля тщательно растирают в фарфоровой ступке, постепенно прибавляя 30 мл дистиллированной воды. Полученную гомогенную смесь отжимают через 3-4 слоя марли.

б) Исследование действия ферментов

В две пробирки (опыт и контроль) наливают по 2 мл свежеприготовленного препарата тирозиназы. Содержимое контрольной пробирки кипятят в течение 3 минут и охлаждают. Затем в обе пробирки прибавляют по 1 мл насыщенного раствора тирозина. Содержимое каждой пробирки перемешивают, и пробы помещают в термостат при 37 °С на 60 минут. Через каждые 5 минут пробирки встряхивают для лучшего соприкосновения жидкости с воздухом. В

опытной пробирке смесь постепенно окрашивается в розовый, красно-бурый и затем черный цвет.

Общие выводы по работе:

РАБОТА 9. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ, ВЛИЯНИЕ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА РЕАКЦИИ СРЕДЫ И ТЕМПЕРАТУРЫ. СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ

Цель работы: на примере амилазы слюны ознакомиться с некоторыми специфическими свойствами ферментов.

Задачи:

- проделать необходимые реакции;
- проанализировать полученные результаты и сформулировать выводы;
- написать уравнения реакций каталитического расщепления крамала амилазой слюны.

Скорость ферментативных реакций зависит от температуры и концентрации водородных ионов в среде. Каждый фермент имеет свой оптимум pH и температуры, при которых активность фермента максимальна.

1. Влияние температуры на активность амилазы

Ход работы. В три пробирки вносят по 1 мл разбавленной в 10 раз слюны, одну из них помещают в термостат с температурой 37 °С, вторую – в лед, а третью – в кипящую водяную баню. Через 5 минут во все пробирки добавляют 5 мл 0,2%-го раствора крахмала, перемешивают, после чего первую и вторую пробирки помещают в прежние условия (термостат и лед), а третью – оставляют при комнатной температуре. Через 20 минут во все пробы добавляют по 3 капли раствора Люголя и перемешивают.

Сравнивают окраску растворов и объясняют причину выявленных различий.

2. Определение оптимума pH активности амилазы

Ход работы. Перед началом работы готовят раствор амилазы разведением слюны в 10 раз. Для этого собирают 0,5 мл слюны в

мерную пробирку, добавляют 4,5 мл дист. H₂O и раствор тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

В восемь пронумерованных пробирок наливают по 2 мл фосфатного буферного раствора соответственно с pH 5,4; 5,8; 6,2; 6,6; 6,8; 7,0; 7,4; 8,0. Во все пробирки добавляют по 5 мл 0,4%-го раствора крахмала (приготовленного на 0,1% растворе NaC) и содержимое перемешивают стеклянной палочкой.

Затем быстро добавляют по 0,5 мл разведенной слюны, сначала в 4- и 5-ю пробирки, затем в 3-ю и 6-ю, далее во 2-ю и 7-ю и, наконец, в 1-ю и 8-ю пробирки. После добавления слюны содержимое каждой пробирки сразу же перемешивают. Отмечают время перемешивания раствора в 5-й пробирке.

Через 1,5 минуты 1 каплю жидкости из 5-й пробирки переносят стеклянной палочкой на предметное стекло и добавляют 1 каплю раствора Люголя. Если капля окрашивается в синий цвет, то выжидают еще 1,5 минуты и снова повторяют реакцию на наличие крахмала с каплей раствора из 5-й пробирки. Реакцию на предметном стекле делают через каждые 1,5 минуты до появления оранжево-красного цвета. После этого во все пробирки добавляют по 2 капли раствора Люголя, перемешивают и сравнивают окрашивание

Оптимальное значение pH действия для амилазы определяют по пробирке с наименьшим светло-желтым окрашиванием

Примечание. При низкой комнатной температуре после добавления слюны пробы помещают в термостат при 37 °С, периодически (через 1,5 минуты) проверяя раствор в 5-й пробирке на наличие крахмала.

3. Специфичность действия ферментов

Одним из свойств ферментов является специфичность их действия. Ферменты специфичны по отношению к типу катализируемой реакции и к субстрату, на который они действуют. Высокая специфичность ферментов определяется тем, что только строго определенные функциональные группы активного центра фермента участвуют в образовании фермент-субстратного комплекса.

а) Специфичность действия амилазы

Ход работы. В две пробирки вносят по 0,5 мл слюны и в одну из них добавляют 2 мл 0,5%-го раствора крахмала, а в другую – 2 мл 0,5%-го раствора сахарозы. Содержимое каждой пробирки

перемешивают стеклянной палочкой и пробы помещают в термостат при 37 °С на 20 минут. Затем в обе пробирки добавляют по 2 мл 10%-го раствора гидроксида натрия, по 0,5 мл 5%-го раствора сульфата меди и после перемешивания нагревают до кипения. В пробирке, содержащей крахмал, выпадает красный или желтый осадок (положительная проба Троммера).

б) Специфичность действия сахарозы дрожжей

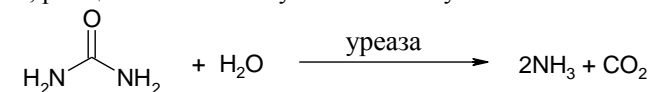
Ход работы

1. Для разрушения дрожжевых клеток 0,5 г пекарских дрожжей тщательно растирают в фарфоровой ступке, добавив немного стеклянного песка. Затем продолжают растирание, постепенно приливая 3-5 мл дистиллированной воды, при этом дрожжевая сахароза переходит в раствор. Смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр и полученный фильтрат используют как источник сахарозы.

2. В две пробирки наливают по 1 мл фильтрата, в одну из них добавляют 2 мл 0,5%-го раствора сахарозы, а в другую – 2 мл 0,5%-го раствора крахмала. Содержимое каждой пробы перемешивают стеклянной палочкой, после чего пробирки выдерживают в термостате при 37 °С в течение 15 минут. Затем в обе пробирки вносят по 2 мл 10%-го раствора гидроксида натрия, 0,5 мл 5%-го раствора сульфата меди и нагревают до кипения. В пробирке, содержащей сахарозу, проба Троммера положительная.

в) Специфичность действия уреазы

Уреаза – фермент, обладающий абсолютной специфичностью действия, расщепляет мочевины на аммиак и углекислый газ:



Ход работы. В две пробирки наливают по 5 мл раствора уреазы и по 5 капель 1%-го спиртового раствора фенолфталеина. В одну пробирку добавляют 1 мл 5%-го раствора мочевины, а в другую – 1 мл 5%-го раствора тиомочевины. Содержимое пробирок перемешивают и пробы оставляют на 20 минут при комнатной температуре. Раствор в пробирке с мочевиной окрашивается в розовый цвет вследствие образования гидроксида аммония при выделении аммиака. Аммиак в

этой пробирке можно обнаружить и по запаху. Тиомочевина под действием уреазы не расщепляется, поэтому раствор во второй пробирке не окрашивается.

Общие выводы по работе:

Техника безопасности

- Соблюдайте правила пользования электронагревательными приборами.
- Будьте внимательны при нагревании растворов на спиртовке.
- Осторожно обращайтесь с 10%-м раствором щелочи натрия.

РАБОТА 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНО- ТРАНСФЕРАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО МЕТОДУ КИНГА

Цель работы: ознакомиться с одним из методов определения активности аминотрансфераз, широко используемых в медицинской и сельскохозяйственной практике для выявления заболеваний и прогнозирования хозяйственно полезных признаков у животных.

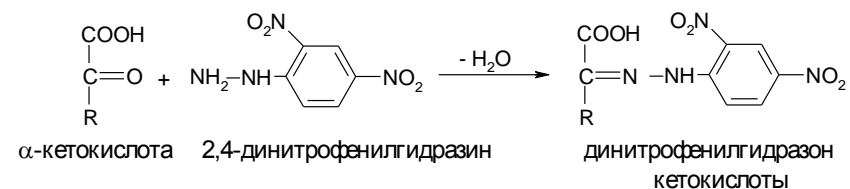
Задачи:

- ознакомиться с предложенным методом определения активности аминотрансфераз в сыворотке крови;
- провести анализ и сделать выводы.

Определение активности аминотрансфераз (трансаминаз) крови имеет большое диагностическое значение. Например, при инфаркте миокарда в крови увеличена активность аспаратаминотрансферазы,

при инфекционном гепатите возрастает активность аланинаминотрансферазы.

Принцип метода. Метод Кинга основан на способности аланин- и аспартаттрансаминаз конденсировать 2,4-динитрофенилгидразин и продукты дезаминирования аминокислот – пировиноградную и щавелевоуксусную кислоты:



Ход работы. В одну пробирку вносят 0,2 мл сыворотки крови (опытная проба), в другую – 0,2 мл дистиллированной воды (контрольная проба); в обе пробирки добавляют по 0,5 мл 2%-го раствора аспарагиновой кислоты и по 0,5 мл 0,6%-го раствора α -кетоглутаровой кислоты. Пробы перемешивают и помещают на 60 минут в термостат (37 °С), после чего каталитическое действие фермента останавливают добавлением в обе пробы по 1 мл 0,1%-го раствора 2,4-динитрофенилгидразина и вновь помещают в термостат на 15 минут. Затем добавляют по 10 мл 0,4 н раствора NaOH и оставляют на 1-2 минуты до появления окраски. Пробы колориметрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Активность аминотрансфераз выражают в условных единицах, умножая оптическую плотность на 100.

У здоровых людей активность аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови составляет 10-35 единиц.

Результаты:

Общие выводы по работе:

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Что такое ферменты?
2. Какова природа ферментов?
3. Приведите примеры ферментов протеинов.
4. Приведите примеры ферментов протеидов.
5. Что такое кофермент? Приведите примеры.
6. Что такое кофактор? Приведите примеры.
7. В чем различие между простетической группой и коферментом?
8. Какие факторы влияют на ферментативную активность?
9. Что такое константа Михаэлиса (K_M)? В каких единицах она определяется?
10. Что такое специфичность фермента? Назовите виды специфичности.
11. Что такое субстратная специфичность фермента?
12. Что такое каталитическая специфичность фермента?
13. Приведите примеры субстратной специфичности.
14. Приведите примеры групповой (относительной) специфичности.
15. Приведите примеры стереоспецифичности.
16. Что такое активный центр фермента?
17. Какую модель взаимодействия фермента и субстрата предложил Фишер?
18. Что такое модель индуцированного соответствия?
19. Какова последовательность событий в ходе ферментативного катализа?
20. Что понимают под активностью фермента?
21. Что такое ингибиторы?
22. Назовите типы ингибирования.
23. Каков механизм специфического необратимого ингибирования? Приведите примеры.
24. Каков механизм неспецифического необратимого ингибирования? Приведите примеры.
25. Что такое конкурентное ингибирование? Приведите примеры.
26. Что такое аллостерический центр?
27. Каков механизм аллостерического ингибирования? Какова его роль? Приведите примеры.

28. Что такое активаторы? Как ионы металлов активируют фермент?
29. Какова роль ионов металлов в катализе?
30. Какими способами регулируется активность ферментов?
31. Что такое конститутивные и индуцируемые ферменты?
32. Что такое компартиментализация ферментов?
33. Что такое ковалентная модификация ферментов?
34. Что такое изоферменты? Приведите примеры.
35. На чем основана классификация ферментов?
36. Как используются ферменты в медицине, сельском хозяйстве и научных исследованиях? Приведите примеры.

РАЗДЕЛ 5. ВИТАМИНЫ

РАБОТА 11. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ

Цель работы: ознакомиться со свойствами и особенностями структуры некоторых витаминов.

Задачи:

- проделать предложенные химические реакции;
- проанализировать полученные результаты и сделать вывод.

Витамины – низкомолекулярные органические вещества, имеющие разнообразную химическую структуру. Почти все витамины не синтезируются в организме человека и относятся к незаменимым пищевым факторам.

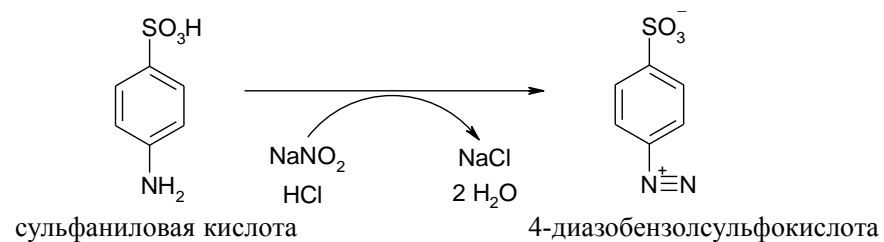
Витамины отличаются от всех других органических веществ пищи двумя признаками: они не входят в состав структуры органов и тканей и не используются организмом в качестве источника энергии. Отсутствие или недостаточное содержание витаминов в пище приводит к развитию тяжелых заболеваний. Нарушение обмена веществ при авитаминозах и гиповитаминозах является следствием снижения активности ферментов, поскольку многие витамины входят в состав простетических групп энзимов. Для обнаружения витаминов в пищевых продуктах, тканях и жидкостях организма и для определения их количества используются качественные реакции, основанные на образовании характерных окрашенных продуктов реакции витамина с каким-либо химическим реагентом.

А. Качественные реакции на водорастворимые витамины

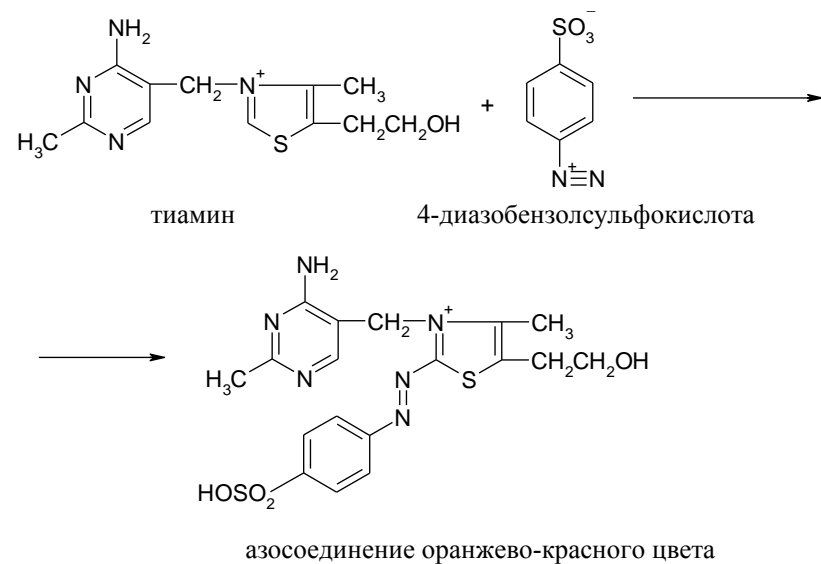
1. Реакции на витамин В₁ (тиамин)

а) Диазореакция на тиамин

При добавлении к раствору тиамин в щелочной среде диазореактива образуется сложное соединение этого витамина с диазобензолсульфокислотой, окрашенное в оранжевый или красный цвет. Диазобензолсульфокислота образуется в результате реакции диазотирования при взаимодействии сульфаниловой кислоты с нитритом натрия (или калия):



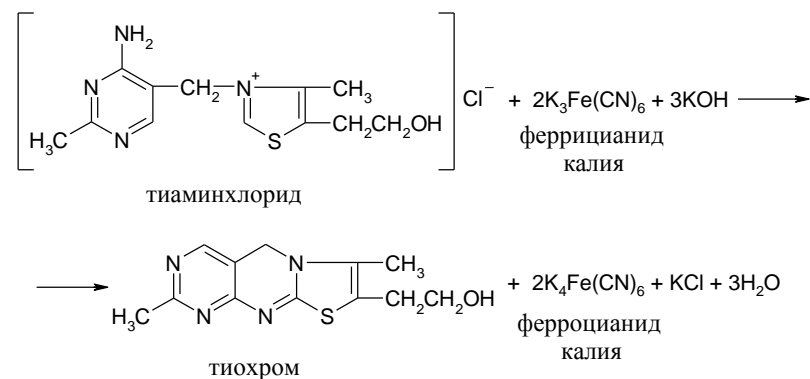
Затем диазобензолсульфокислота реагирует в щелочной среде с тиамин с образованием окрашенного азосоединения:



Ход работы. К диазореактиву, состоящему из 5 капель 1%-го раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 1%-го раствора нитрита натрия, прибавляют 1-2 капли 5%-го раствора тиамин и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5-7 капель 10%-го раствора карбоната натрия. На границе двух жидкостей образуется оранжево-красное кольцо.

б) Реакция окисления тиамин

В щелочной среде тиамин окисляется железосинеродистым калием (феррицианидом калия) с образованием окрашенного в желтый цвет тиохрома. Тиохром обладает синей флуоресценцией при ультрафиолетовом облучении раствора в флуороскопе, и это свойство используется при количественном определении тиамин.

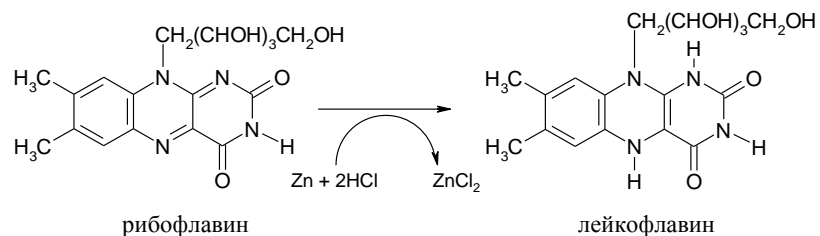


Ход работы. 1 каплю 5%-го раствора тиамин смешивают в пробирке с 5-10 каплями 10%-го раствора гидроксида натрия и затем добавляют 1-2 капли раствора железосинеродистого калия. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет вследствие окисления тиамин в тиохром.

2. Реакция восстановления витамина В₂ (рибофлавина)

Окисленная форма рибофлавина – вещество желтого цвета, флуоресцирующее в ультрафиолетовых лучах. Витамин В₂ легко восстанавливается через промежуточные соединения красного цвета (родофлавин) в бесцветный лейкофлавин. Реакция обусловлена восстановлением рибофлавина водородом, образующимся при

добавлении металлического цинка к соляной кислоте. При этом желтая окраска раствора переходит в розовую, затем раствор обесцвечивается. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкосоединение вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.

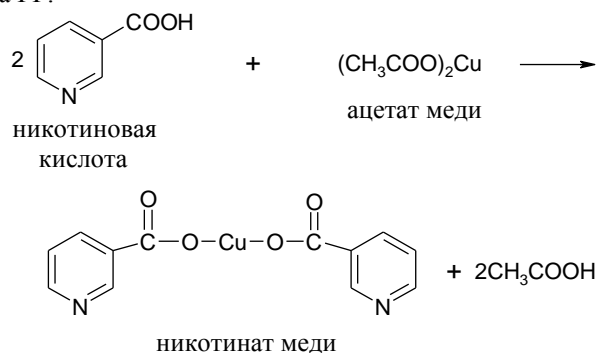


Ход работы. В пробирку наливают 10 капель 0,025%-й взвеси рибофлавина в воде, добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Наблюдают бурное выделение пузырьков водорода и изменение окраски жидкости.

3. Реакции на витамин РР (никотиновую кислоту, никотинамид)

а) Реакция с ацетатом меди

При нагревании никотиновой кислоты с раствором уксуснокислой меди образуется плохо растворимый синий осадок медной соли витамина РР.

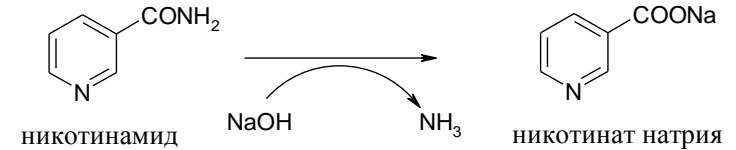


Ход работы. 5-10 мг никотиновой кислоты растворяют при нагревании в 10-20 каплях 10%-го раствора уксусной кислоты. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем 5%-го

раствора ацетата меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает синий осадок никотината меди.

б) Реакция обнаружения аминогруппы в никотинамиде

При нагревании в присутствии гидроксида натрия амидная связь в никотинамиде гидролизуется с выделением аммиака.



Ход работы. В пробирку помещают 5-10 мг порошка витамина PP, прибавляют 2 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия и нагревают до кипения. Ощущают запах образующегося аммиака.

в) Реакция с гидросульфитом натрия

Витамин PP восстанавливается гидросульфитом натрия с образованием соединения желтого цвета.

Ход работы. В пробирку вносят 5-10 мг витамина PP, добавляют 1,5 мл 10%-го раствора бикарбоната натрия, перемешивают и прибавляют 1,5 мл свежеприготовленного 5%-го раствора гидросульфита натрия. Жидкость окрашивается в желтый цвет.

4. Реакции на витамин В₆ (пиридоксин)

Активностью витамина В₆ обладают три соединения, объединенных под названием “пиридоксин”:



а) Феррохлоридная проба на витамин В₆.

При взаимодействии пиридоксина с хлорным железом образуется комплексная соль типа фенолята железа, окрашенная в красный цвет.

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл 1%-го раствора витамина В₆, добавляют 2 капли 1%-го раствора хлорида железа и содержимое встряхивают. Жидкость окрашивается в красный цвет.

б) Реакция осаждения витамина В₆.

Пиридоксин, являясь производным пиридина, осаждается фосфорномолибденовой, пикриновой, фосфорновольфрамовой кислотами и другими реактивами на алкалоиды.

Ход работы. К 2-3 каплям 1%-го раствора витамина В₆ добавляют 2-3 капли 1%-го раствора фосфорномолибденовой кислоты и наблюдают появление осадка.

5. Качественные реакции на витамин В₁₂ (кобаламин)

В состав витамина В₁₂ входит кобальт. В результате взаимодействия ионов кобальта с тиомочевинной при нагревании образуется роданид кобальта зеленого цвета.

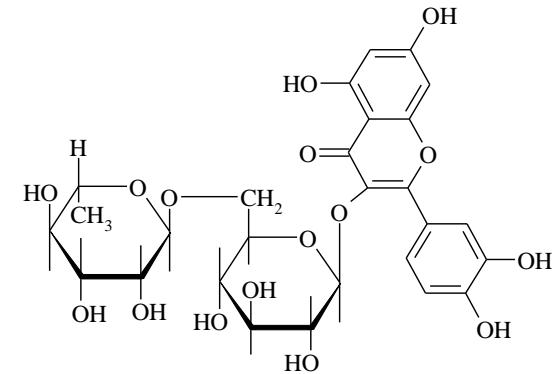
Ход работы

1. Содержимое одной ампулы с кобаламином переносят в пробирку, добавляют 3-5 капель концентрированной серной кислоты и нагревают до обесцвечивания в пламени спиртовки, установленной в вытяжном шкафу с включенной тягой. По окончании минерализации в пробирку осторожно, медленно, при постоянном перемешивании добавляют 1 мл дистиллированной воды.

2. На беззольный фильтр наносят 2-3 капли 10%-го раствора тиомочевины, осторожно высушивают над пламенем спиртовки. Затем наносят 1-2 капли минерализата В₁₂ и осторожно нагревают фильтр над пламенем спиртовки. На фильтре, чаще ближе к краю, появляется зеленое окрашивание.

6. Качественные реакции на витамины группы Р (биофлавоноиды)

Витамины группы Р – производные флавона: рутин, эрио-диктиол, гесперидин, кверцетин, эпикахетин и другие. Одним из наиболее активных биофлавоноидов является рутин – гликозид кверцетина и дисахарида рутинозы:



а) Реакция с хлоридом железа

Биофлавоноиды образуют с хлоридом железа комплексное соединение, окрашенное в изумрудно-зеленый цвет. Координационные связи возникают между ионом железа и атомами кислорода фенольных гидроксильных групп молекулы витамина.

Ход работы. К 1-2 мл насыщенного водного раствора рутина прибавляют 3-5 капель 1%-го раствора хлорида железа (FeCl_3). Появляется зеленое окрашивание.

б) Реакция с концентрированной серной кислотой

Концентрированная серная кислота образует с биофлавоноидами оксониевые (флавилиевые) соли, растворы которых характеризуются ярко-желтой окраской.

Ход работы. К 1-2 мл насыщенного водного раствора рутина осторожно по стенке пробирки добавляют 0,5-1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей возникает окрашенное в желтый цвет кольцо.

в) Реакция Фелинга на рутин

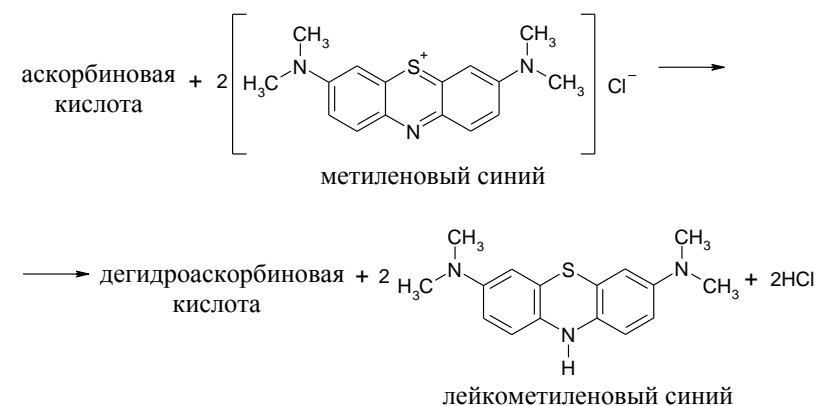
При кислотном гидролизе рутина отщепляется молекула дисахарида рутинозы, которая затем распадается на D-глюкозу и L-рамнозу, обладающие восстанавливающими свойствами.

Ход работы. К 0,5 г порошка рутина приливают 5 мл 0,5%-го раствора соляной кислоты, нагревают при периодическом перемешивании до кипения и кипятят в течение 1 минуты. Пробирку охлаждают, и раствор фильтруют через бумажный фильтр. К фильтрату добавляют 3 мл 10%-го раствора гидроксида натрия и 3 мл

калия, перемешивают, после чего добавляют по 3 капли 10%-го раствора соляной кислоты и 1 капле 1%-го раствора хлорида железа. В опытной пробирке выпадает темно-синий осадок берлинской лазури, который при осторожном насаивании воды становится более отчетливым.

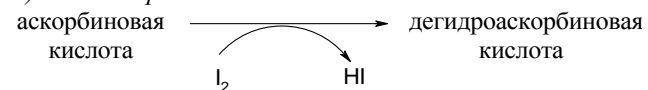
б) Реакция восстановления метиленовой сини витамином С

Витамин С обесцвечивает раствор метиленовой сини, восстанавливая ее в лейкосоединение:



Ход работы. В двух пробирках (опыт и контроль) смешивают по 1 капле 0,01%-го раствора метиленовой сини и 1 капле 10% раствора бикарбоната натрия. В опытную пробирку добавляют 5 капель 1%-го раствора витамина С, а в контрольную – столько же дистиллированной воды. Нагревание растворов в пробирках приводит к обесцвечиванию жидкости в опытной пробе.

в) Йодная проба на витамин С



Раствор Люголя (раствор йода в йодиде калия) при добавлении к нему витамина С обесцвечивается вследствие восстановления молекулярного йода с образованием йодистоводородной кислоты.

и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется сине-фиолетовое окрашивание, быстро переходящее в красно-бурое.

б) Реакция витамина А с сульфатом железа (II)

При взаимодействии ретинола с FeSO_4 в кислой среде образуется соединение розово-красного цвета. Каротины дают в этой реакции зеленоватое окрашивание.

Ход работы. К 1-2 каплям рыбьего жира осторожно (работать под тягой) прибавляют 5-10 капель насыщенного раствора сульфата железа (FeSO_4), приготовленного на ледяной уксусной кислоте, и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное.

в) Реакция витамина А с треххлористой сурьмой

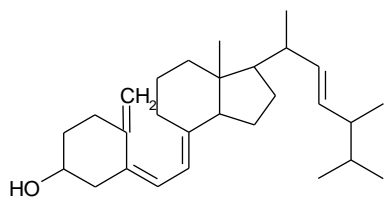
В результате водоотнимающего действия хлорида сурьмы (SbCl_3) витамин А превращается в соединение синего цвета. Эта цветная реакция используется для количественного определения витамина А колориметрическим методом.

Ход работы. В совершенно сухую пробирку помещают 1 каплю рыбьего жира и 4-5 капель насыщенного (33%-го) раствора хлорида сурьмы (III) в безводном хлороформе. Появляется синее окрашивание, которое постепенно переходит в розово-фиолетовое.

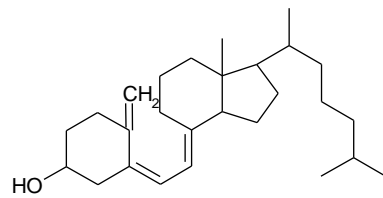
Внимание! Присутствие даже небольших количеств воды в пробирке может помешать протеканию реакции, так как в водных условиях хлорид сурьмы (III) легко превращается в хлороксид сурьмы, который не реагирует с ретинолом, вызывая помутнение раствора. Для устранения следов влаги в пробу можно добавить 1-2 капли уксусного ангидрида.

2. Реакция на витамин D

Среди витаминов группы D наиболее распространены эргокальциферол и холекальциферол.



эргокальциферол
(витамин D₂)



холекальциферол
(витамин D₃)

а) Анилиновая проба на витамин D

При нагревании рыбьего жира, содержащего витамин D, с анилиновым реактивом раствор приобретает красную окраску.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 1 каплю рыбьего жира, 5 капель хлороформа и тщательно встряхивают. Затем добавляют 1 каплю анилинового реактива, содержащего 15 частей анилина и 1 часть концентрированной соляной кислоты. Смесь осторожно при помешивании нагревают до кипения и кипятят примерно 30 секунд. При наличии витамина D желтая эмульсия сначала становится зеленой, а затем красной. При стоянии эмульсия через 1-2 минуты расслаивается, при этом нижний слой окрашен в интенсивно красный цвет.

б) Бромхлороформенная проба на витамин D

При смешивании рыбьего жира, содержащего витамин D, с раствором брома в хлороформе смесь окрашивается в зеленовато-голубой цвет.

Ход работы. В сухой пробирке смешивают 2 капли рыбьего жира и 4 капли раствора брома в хлороформе (1:60). Смесь постепенно приобретает зеленовато-голубую окраску.

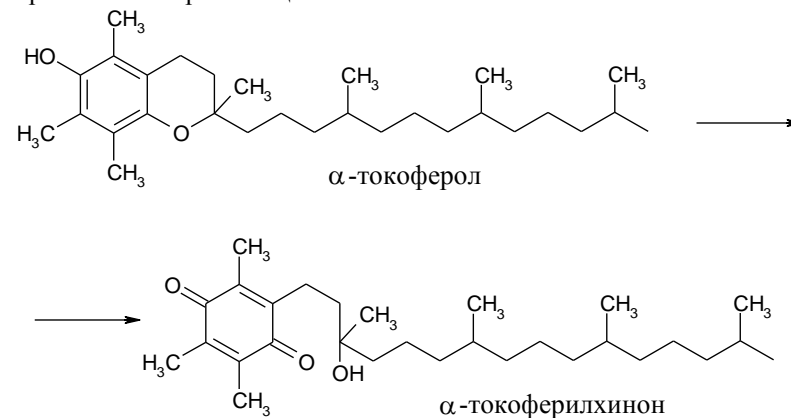
в) Реакция витамина D с хлоридом сурьмы (V)

При прибавлении к витамину D насыщенного раствора SbCl₅ смесь окрашивается в желтый цвет.

Ход работы. В сухой пробирке смешивают 6-10 капель витамина D и 1,5 мл хлороформа, добавляют 0,2 мл насыщенного раствора хлорида сурьмы (V) и тщательно перемешивают. Наблюдают появление желтого окрашивания.

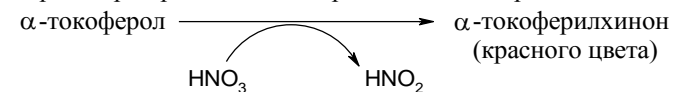
3. Реакция на витамин E

Витамины группы E (токоферолы) являются производными токола, самый активный из них – α -токоферол. Качественные реакции на α -токоферол обусловлены окислением его в α -токоферилхинон, окрашенный в красный цвет.



а) Реакция α -токоферола с концентрированной азотной кислотой

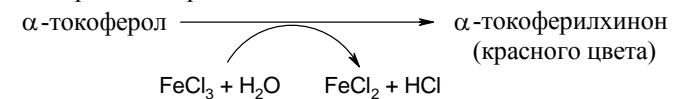
При прибавлении к α -токоферолу концентрированной азотной кислоты раствор окрашивается в оранжевый или красный цвет.



Ход работы. В сухую пробирку вносят 5 капель 0,1%-го спиртового раствора α -токоферола и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирки встряхивают, появляется красное окрашивание. Если образовавшуюся окрашенную эмульсию поместить в водяную баню при 70 °С, она расслаивается, при этом верхний масляный слой имеет красный цвет.

б) Реакция α -токоферола с хлоридом железа (III)

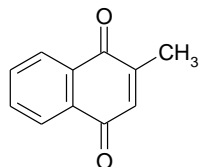
Добавление к α -токоферолу хлорида железа (FeCl_3) вызывает появление красной окраски.



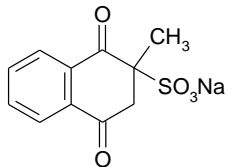
Ход работы. 4-5 капель 0,1%-го спиртового раствора α -токоферола смешивают с 0,5 мл 1%-го раствора хлорного железа. Смесь тщательно перемешивают и наблюдают появление красного окрашивания.

4. Реакция на витамин К

Витамины группы К являются производными метилнафтохинона. Высокой витаминной активностью обладает искусственно синтезированный аналог витамина К₁ – викасол.



2-метил-1,4-нафтохинон
(менадион)



викасол

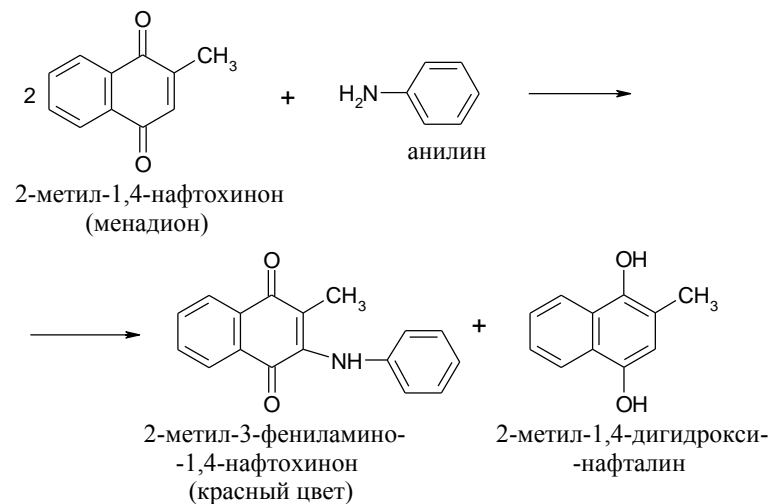
а) Реакция с цистеином

Викасол в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в желтый цвет.

Ход работы. В пробирку вносят 10 капель 0,1%-го спиртового раствора викасола, 5 капель 0,025%-го раствора цистеина и 2 капли 10%-го раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирки перемешивают и наблюдают появление желтого окрашивания.

б) Реакция с анилином

При взаимодействии витамина К с анилином образуется соединение, окрашенное в красный цвет. Например:



Ход работы. В пробирку вносят 5 капель 0,2%-го спиртового раствора менадиона (приготовленного на этаноле), 2 капли анилина и перемешивают. Смесь окрашивается в красный цвет.

в) Реакция с диэтилмалоновым эфиром

Спиртовой раствор витамина К в щелочной среде с диэтилмалоновым эфиром дает красно-фиолетовое окрашивание.

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл 0,1%-го спиртового раствора викасола, 0,5 мл 1%-го раствора диэтилмалонового эфира и 0,1 мл (2 капли) 1%-го раствора гидроксида калия. Развивается красно-фиолетовое окрашивание.

г) Реакция с диэтилдитиокарбаматом

Спиртовой раствор витамина К в щелочной среде в присутствии диэтилдитиокарбамата образует соединение, окрашенное в голубой цвет.

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл 0,2%-го спиртового раствора менадиона, 2 мл 5%-го раствора диэтилдитиокарбамата и 0,5 мл 4%-го спиртового раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирки перемешивают. Раствор приобретает голубое окрашивание.

Общие выводы по работе:

Техника безопасности

- Категорически запрещается отмеривать концентрированные кислоты и щелочи градуированными пипетками.
- Необходимо быть особенно внимательным и осторожным при использовании концентрированных кислот (HCl, H₂SO₄, HNO₃, CH₃COOH) и щелочей (KOH, NaOH).
- Осторожно обращайтесь с солями сурьмы и анилином.
- В процессе нагревания жидкости следует постоянно ее перемешивать, не допуская выброса из пробирки.
- Опыты с легкоиспаряющимися растворителями и веществами с резким запахом необходимо проводить в вытяжном шкафу при включенной тяге.
- Соблюдайте правила пожарной безопасности.

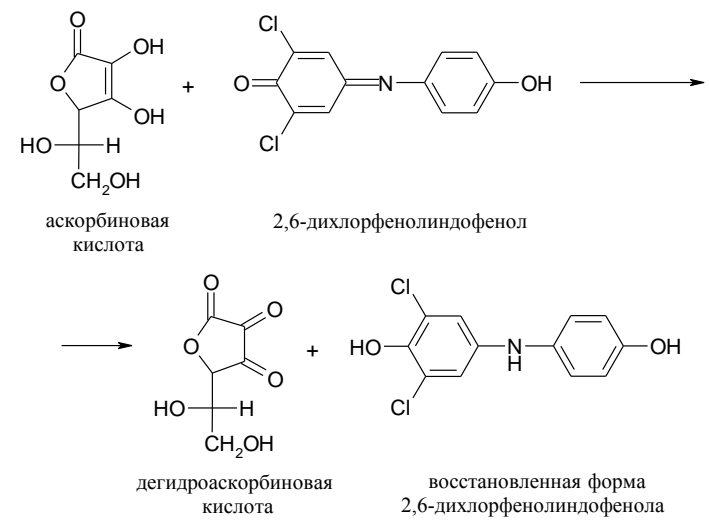
РАБОТА 12. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И МОЧЕ

Цель работы: ознакомиться с одним из методов количественного определения витамина в пищевых продуктах и биологических объектах.

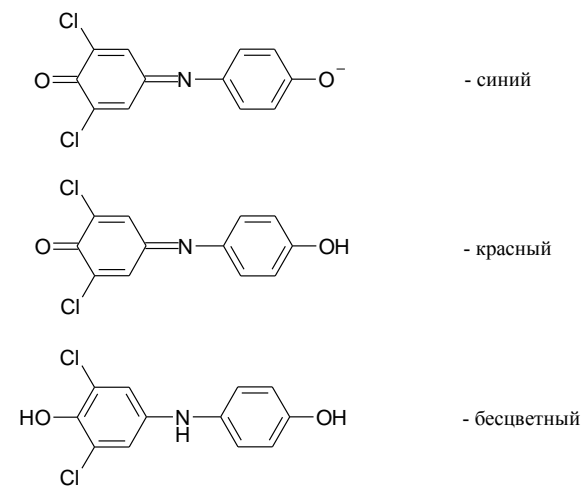
Задачи:

- определить содержание витамина С в пищевых продуктах и моче;
- сравнить полученные результаты и сделать выводы.

Принцип метода. Метод основан на способности витамина С восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол:



2,6-дихлорфенолиндофенол в щелочной среде имеет синюю окраску, в кислой среде – красную, в восстановленном состоянии – бесцветную:



При определении количества витамина С исследуемый раствор, подкисленный соляной кислотой, титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. Как только все количество витамина С, имеющееся в исследуемом растворе, окислится, раствор приобретает розовую окраску, характерную для 2,6-дихлорфенолиндофенола в кислой среде.

1. Определение количества витамина С в пищевых продуктах и хвое

Аскорбиновая кислота не синтезируется в организме человека. Основным источником этого витамина являются, в основном, свежие овощи и фрукты. В различных пищевых продуктах содержится следующее количество витамина С (в мг%):

черная смородина - 100-400
укроп - 120-135
лимон - 40-55
капуста (свежая и квашенная) - 30-40
томаты - 20-40
лук зеленый - 16-33
яблоки северные - 20-40
яблоки южные - 5-17
смородина красная - 5-15
картофель - 7-10
бананы - 7-10
печень - 20-50
селезенка - 20-50
кумыс - 20-25

Источником витамина С может быть хвоя ели и сосны, содержащая 150-250 мг% (иногда до 400 мг%) аскорбиновой кислоты.

1. Определение содержания витамина С в плодах шиповника

Ход работы

а) *гомогенизация биоматериала и экстракция витамина С.* 1 г сухих плодов измельчают в фарфоровой ступке с 2 мл дистиллированной воды, смесь количественно переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят объем водой до метки. Через 10 минут смесь фильтруют через бумажный фильтр в мерную пробирку.

б) *количественное определение витамина С в экстракте.* К 2 мл полученного фильтрата добавляют 2-3 капли 10%-го раствора соляной кислоты и 2 мл дистиллированной воды. Содержимое переливают

в колбочку на 50 мл и титруют 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд.

Расчет. Содержание витамина С рассчитывают по формуле:

$$X = (0,088 \cdot A \times 25 \times 100) / B \times V = (\text{мг}\%),$$

где X – содержание аскорбиновой кислоты в мг%;

A – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (в мл), пошедшее на титрование;

B – количество сухого вещества в г, взятое для анализа;

25 – количество вытяжки в мл, взятое для титрования;

0,088 – общее количество вытяжки в мг;

1 мл 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.

2. Определение содержания витамина С в хвое, картофеле и других пищевых продуктах

а) Гомогенизация биоматериала и экстракция витамина С. Этот этап работы выполняют так же, как в предыдущем случае (при определении содержания аскорбиновой кислоты в шиповнике).

б) Количественное определение витамина С в экстракте. 10 мл фильтрата* приливают в колбочку на 50 мл, подкисляют 2-3 каплями 10%-го раствора соляной кислоты и титруют так же, как в предыдущем случае.

в) Расчет делают по той же формуле, что и при определении витамина С в шиповнике, только количество вытяжки (B), взятое для титрования, будет равно 10 мл.

Примечание: если исходный цвет фильтрата сильно окрашен (например у моркови или петрушки), берут 2 мл фильтрата и 8 мл дистиллированной воды, но это учитывают при расчетах.

3. Определение содержания витамина С в моче

Ход работы. В коническую колбу вносят 10 мл мочи и 10 мл дистиллированной воды. Добавляют 1 мл концентрированной уксусной кислоты и титруют 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд.

Расчет по формуле:

$$X = (0,088 \times A \times 100) / 10 = \text{ (мг \%)},$$

где А – количество 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола в мл, пошедшее на титрование;

10 – количество мочи в мл, взятое на титрование;

100 – коэффициент для выражения результата в мг %;

0,088 – эквивалент аскорбиновой кислоты.

Общие выводы по работе:

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Что такое витамины?
2. На чем основана классификация витаминов? Приведите примеры.
3. Какие витамины относятся к жирорастворимым?
4. Какие Вы знаете водорастворимые витамины?
5. Что такое провитамины, антивитамины?
6. Что такое гипо-, гипер- и авитаминоз?
7. Избыток каких витаминов может вызвать гипervитаминоз? Почему?
8. Перечислите основные различия в метаболизме водо- и жирорастворимых витаминов.
9. Какие соединения относят к витамину А? Какова его биологическая роль? Назовите основные симптомы гиповитаминоза А, источники поступления этого витамина в организм.

10. Назовите основных представителей витаминов группы D. Какие соединения являются активной формой витамина D? Какие органы принимают участие в образовании активной формы витамина D?
11. Какова биологическая роль витамина D?
12. Какие изменения появляются при гипо- и гипервитаминозе D?
13. Какие соединения относятся к витаминам группы К?
14. В каких биологических реакциях участвует витамин К? Какие симптомы характерны для гипо- и гипервитаминоза К?
15. Какие соединения относят к витамину Е?
16. Какие симптомы характерны для гипо- и гипервитаминоза Е? Какова биологическая роль этого витамина?
17. Какие соединения относятся к витамину F? Каковы его биологическая роль и клинические признаки гиповитаминоза F?
18. Какова роль арахидоновой кислоты?
19. Что такое простагландины, их биологическая роль?
20. Структура и биологическая роль витамина В₁, клинические проявления гиповитаминоза В₁.
21. Структура и биологическая роль витамина В₂, клинические проявления гиповитаминоза В₂.
22. Структура и биологическая роль витамина В₃, клинические проявления гиповитаминоза В₃.
23. Структура и биологическая роль витамина В₅, клинические проявления гиповитаминоза В₅.
24. Структура и биологическая роль витамина В₆, клинические проявления гиповитаминоза В₆.
25. Структура и биологическая роль фолиевой кислоты (витамина В_с), клинические проявления гиповитаминоза этого витамина.
26. Структура и биологическая роль витамина В₁₂, клинические проявления гиповитаминоза В₁₂.
27. Структура и биологическая роль витамина С, клинические проявления гиповитаминоза С.
28. Структура и биологическая роль витамина Н, клинические проявления гиповитаминоза Н.
29. Структура и биологическая роль витамина Р, клинические проявления гиповитаминоза Р.
30. Что такое витаминоподобные соединения? Приведите примеры.

РАЗДЕЛ 6. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

6.1. ХИМИЯ И ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

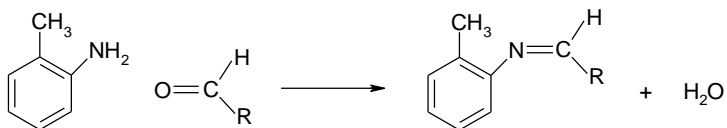
РАБОТА 13. ОРТОТОЛУИДИНОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

Цель работы: ознакомиться с одним из распространенных методов количественного определения в крови основного показателя углеводного обмена – глюкозы.

Задачи:

- определить содержание глюкозы в крови;
- проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

Принцип метода. Глюкоза при нагревании с ортотолуидином в растворе уксусной кислоты дает сине-зеленое окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации глюкозы и определяется на фотоэлектроколориметре:



С ортотолуидиновым реактивом реагируют все альдогексозы, но их содержание в крови невелико, поэтому метод позволяет определить практически одну глюкозу.

Ход работы

а) *Осаждение белков крови.* В две центрифужные пробирки наливают по 0,9 мл 3%-го раствора трихлоруксусной кислоты, затем в одну из них вносят 0,1 мл крови (или сыворотки крови), а в другую – 0,1 мл стандартного раствора глюкозы (концентрация глюкозы в стандартном растворе составляет 100 мг%). Содержимое пробирок перемешивают и центрифугируют при 3000 об./мин в течение 10 минут.

б) *Цветная реакция с ортотолуидиновым реактивом.* В обычные сухие пробирки вносят по 0,5 мл надосадочной жидкости из каждой центрифужной пробирки, добавляют по 4,5 мл ортотолуидинового

реактива и помещают в кипящую водяную баню (100 °С) на 8 минут. (Время инкубации проб и температурный режим необходимо соблюдать точно; кроме того, обязательным условием для данной реакции является непрерывное кипение воды в бане!). По истечении времени пробирки вынимают и охлаждают в водопроводной воде до комнатной температуры.

в) Измерение оптической плотности растворов. Оптическую плотность проб измеряют на фотоэлектроколориметре в кюветах на 10 мм против воды с красным светофильтром (620 нм).

Расчет. Содержание глюкозы в опытной пробе рассчитывают по стандартному раствору глюкозы по формуле:

$$C_{\text{оп}} = (C_{\text{ст. р-ра глюкозы}} \times E_{\text{оп}}) / E_{\text{ст. р-ра глюкозы}},$$

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

$C_{\text{ст. р-ра глюкозы}}$ – концентрация глюкозы в стандартной пробе (100 мг%),

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность исследуемой пробы,

$E_{\text{ст. р-ра глюкозы}}$ – оптическая плотность стандартного раствора глюкозы.

Примечание. Для перевода показателя в единицы СИ (ммоль/л) полученный результат при расчете необходимо умножить на 0,0555.

Содержание глюкозы в сыворотке крови здорового человека, определенное этим методом, колеблется в пределах 3,33-5,55 ммоль/л (или 60-90 мг%).

Общие выводы по работе:

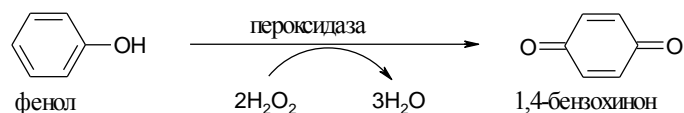
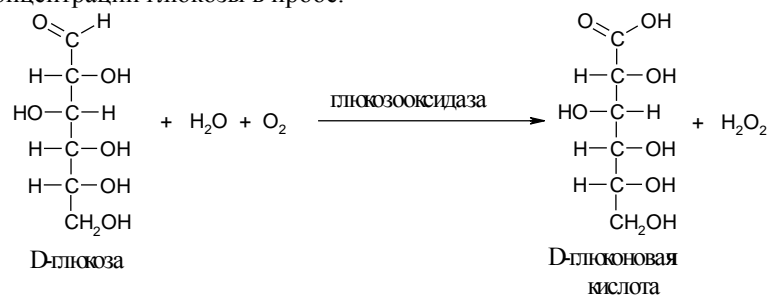
РАБОТА 14. ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Цель работы: ознакомиться с современным ферментативным методом количественного определения глюкозы в биологических жидкостях, который широко применяется в клинической практике

Задачи:

- определить содержание глюкозы в предлагаемых образцах;
- проанализировать полученные результаты и сделать вывод.

Принцип метода. Глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы кислородом воздуха с образованием эквимольного количества пероксида водорода. Под действием пероксидазы перекись водорода окисляет фенол, который превращается в бензохинон, окрашенный в розовый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации глюкозы в пробе.



Реактивы

Из набора реагентов OLVEX DIAGNOSTICUM готовят перед анализом:

1. Стандартный раствор глюкозы – 10 ммоль/л.
2. Рабочий реагент содержащий:
 - а) фосфат-фенольный буфер (pH 7,5),
 - б) глюкозооксидазу (25 000 U/л),
 - в) пероксидазу (1500 U/л).

Ход работы

В три обычные химические пробирки наливают:

- 1) в опытную – 0,01 мл сыворотки крови или свежей мочи,
- 2) в стандартную – 0,01 мл стандартного раствора глюкозы,
- 3) в контрольную – 0,01 мл дист. H_2O .

Затем во все пробирки добавляют по 2 мл рабочего реагента, смесь тщательно перемешивают и пробы помещают в термостат на 10 минут

при 37 °С. После окончания инкубации измеряют оптическую плотность опытной и стандартной пробы против контроля в кюветах на 5 мм (или 3 мм) при длине волны 490-510 нм.

Окраска стабильна в течение часа после окончания инкубации при условии отсутствия воздействия прямых солнечных лучей.

Примечание. Количество глюкозы в моче определяют только при положительной качественной реакции на глюкозу. Реакция считается положительной, если смесь из 0,01 мл исследуемой мочи и 0,5 мл рабочего реагента через 15 минут приобретает розовую окраску.

Расчет

Расчет концентрации глюкозы проводят по формуле:

$$C = E_0 / E_{\text{ст.}} \times 10,$$

где E_0 – оптическая плотность опыта,

$E_{\text{ст.}}$ – оптическая плотность стандарта,

10 – концентрация стандартного раствора глюкозы в ммоль/л.

Нормальное содержание глюкозы, определенные этим методом, в сыворотке или плазме крови здорового человека составляет 4,2-6,1 ммоль/л, в моче – < 0,8 ммоль/л.

Результаты:

Общие выводы по работе:

РАБОТА 15. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ МОДИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДОМ УМБРАЙТА

Цель работы: ознакомиться с одним из методов количественного определения в крови пирувата – важнейшего метаболита углеводного обмена.

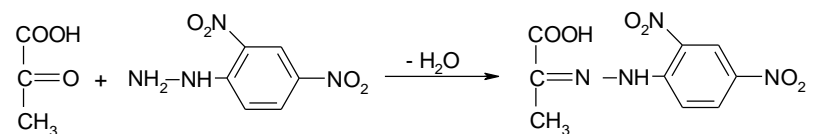
Задачи:

- определить содержание пирувата в крови;
- проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

Пировиноградная кислота (ПВК) является одним из промежуточных продуктов обмена углеводов. В анаэробных условиях (при гипоксии) она восстанавливается в молочную кислоту, а в аэробных – подвергается окислительному декарбоксилированию и превращается в ацетил-КоА. ПВК – один из основных источников глюконеогенеза. Она является связующим звеном между углеводным, липидным и белковым обменом.

Вследствие большой скорости реакции превращения пировиноградная кислота присутствует в тканях и биологических жидкостях в небольшом количестве. В крови ее содержание составляет 0,3-0,9 мг% (34,07-12,2 мкмоль/л).

Принцип метода. В результате взаимодействия пировиноградной кислоты с 2,4-динитрофенилгидразином образуется гидразон, который в щелочной среде окрашивается в коричнево-красный цвет. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию пировиноградной кислоты в растворе:



ПВК 2,4-динитрофенилгидразин динитрофенилгидразон ПВК

1. Построение калибровочной кривой

Ход работы. Готовят пять *рабочих* стандартных растворов пировиноградной кислоты разведением *основного* стандартного раствора, содержащего 10 мкг ПВК в 1 мл (см. таблицу):

№ пробы	Количество основного стандартного раствора ПВК (мл)	Количество дистиллированной H ₂ O	Содержание ПВК в пробе (мкг)
1	0,2	0,8	2
2	0,4	0,6	4
3	0,6	0,4	6
4	0,8	0,2	8
5	1,0	-	10

В шестую пробирку (контроль) наливают 1 мл дистиллированной воды.

Во все пробирки добавляют по 1 мл 105-го раствора трихлоруксусной кислоты, 0,4 мл 0,1%-го раствора 2,4-динитрофенилгидразина и после перемешивания пробы помещают в темное место на 20 минут при комнатной температуре. 1 мл 12%-го раствора гидроксида натрия перемешивают и через 5 минут пробы колориметрируют против контроля в кюветах на 5 мм с синим светофильтром (длина волны 440 нм). Полученные значения оптической плотности используют для построения калибровочной кривой.

2. Количественное определение пировиноградной кислоты в крови

Ход работы. В центрифужную пробирку (опыт) вносят 0,7 мл дистиллированной H₂O, 0,3 мл свежей крови и 1 мл 10%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое перемешивают и через 2-3 минуты центрифугируют при 1500 об./мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость полностью сливают в сухую обыкновенную пробирку, добавляют к ней 0,4 мл 0,1%-го раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают и пробу помещают в темное место на 20 минут при комнатной температуре. Затем в пробирку приливают 1 мл 12%-го раствора гидроксида натрия, перемешивают и через 5 минут колориметрируют, как описано выше. Контрольную пробу готовят так же, как и опытную, но вместо крови берут 0,3 мл дистиллированной H₂O, не центрифугируя.

Оформление работы

1. Запишите значение оптической плотности рабочих стандартных растворов пировиноградной кислоты в виде таблицы:

№ пробы	Содержание ПВК в пробе (мкг)	E ₁	E ₂	E ₃	E _{сред.}

E₁, E₂, и E₃ – значения оптической плотности одного и того же рабочего стандартного раствора, полученные разными студентами.

2. Постройте калибровочную кривую.

3. Рассчитайте содержание пировиноградной кислоты в исследуемой крови по формуле:

$$X = A \times 100 / 0,3 \times 1000 ,$$

где X – содержание ПВК в крови (в мг%);

A – найденная по калибровочной кривой концентрация ПВК в пробе (в мкг);

0,3 – объем взятой для анализа крови;

1000 – коэффициент перевода мкг в мг;

100 – коэффициент пересчета на 100 мл крови.

Общие выводы по работе:

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Что такое обмен веществ?
2. Что такое катаболизм?
3. Что такое анаболизм?
4. Что такое углеводы?
5. Что такое моносахариды? Приведите примеры.
6. Что такое дисахариды? Приведите примеры.
7. Что такое полисахариды? Приведите примеры.
8. Назовите компоненты мальтозы. Напишите структурную формулу мальтозы. В чем ее отличие от изомальтозы?
9. Назовите компоненты лактозы. Напишите ее структурную формулу.
10. Структура и биологическая роль крахмала.
11. В чем различие между крахмалом и целлюлозой?
12. Какова суточная потребность в углеводах у человека?
13. Как происходит переваривание крахмала в организме человека и моногастричных животных?
14. Какова роль балластных веществ? Происходит ли гидролиз целлюлозы в желудочно-кишечном тракте моногастричных животных?
15. В чем отличие переваривания углеводов у жвачных животных?
16. Какие существуют пути утилизации глюкозы в клетке?
17. Что такое гликолиз?
18. Какие ферменты в гликолизе являются ключевыми?
19. Какое значение имеет гликолиз?
20. В чем сходство и различие между гликолизом, гликогенолизом, спиртовым брожением и молочно-кислым брожением?
21. В чем различие между аэробным и анаэробным распадом глюкозы в клетке?
22. Что такое окислительное декарбоксилирование ПВК? Назовите основные компоненты мультиэнзимного комплекса, катализирующего этот процесс, и напишите общее уравнение этих реакций.
23. Какова роль ЦТК?
24. В чем отличие ЦТК и глиоксалатного цикла?
25. Назовите два основных пути синтеза глюкозы в организме.
26. Каково биологическое значение пентозофосфатного пути?
27. Какие 2 фазы выделяют в пентозофосфатном пути?
28. В чем сходство и различие между гликолизом и глюконеогенезом?

29. Почему глюконеогенез особенно важен для животных с четырехкамерным желудком?
30. Какие факторы способствуют усилению и ослаблению глюконеогенеза?
31. Какие ферменты участвуют в синтезе гликогена?
32. Какие ферменты участвуют в распаде гликогена в клетке?
33. Гликоген какого органа является источником глюкозы в крови? Сколько гликогена в нем содержится?
34. Что такое цикл Кори? Каково его значение?
35. Какова концентрация глюкозы в крови человека? Причины гипо- и гипергликемии?
36. Каков почечный порог для глюкозы?
37. Какие ферменты участвуют в превращении галактозы в глюкозу?
38. Какие ферменты участвуют в превращении фруктозы в глюкозу?

6.2. ХИМИЯ И ОБМЕН ЛИПИДОВ

РАБОТА 16. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ ИЛЬКА

Цель работы: ознакомиться с одним из распространенных методов количественного определения холестерина в сыворотке крови.

Задачи:

- построить калибровочную кривую по стандартным растворам холестерина;
- определить уровень холестерина в сыворотке крови;
- проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

В норме количество холестерина в сыворотке крови человека составляет в среднем 165 мг%.

Обмен холестерина нарушается при ряде заболеваний, особенно при атеросклерозе. Содержание его в крови увеличивается при гипертонии, сахарном диабете, заболевании почек (липоидном нефрите).

Принцип метода. Метод основан на реакции Либермана – Бурхада. При действии концентрированной серной кислоты происходят дегидратация холестерина, конденсация образовавшихся продуктов в

виде непредельных углеводов, соединяющихся с серной кислотой, с образованием окрашенных продуктов.

Ход работы

1. Построение калибровочной кривой

В 5 пробирок вносят реактивы в количестве, указанном в таблице:

№ п / п	Количество стандартного раствора холестерина, мл	Количество реактива Илька, мл	Количество холестерина, мг%	E _{сред.}
1	0,05	2,05	50	
2	0,10	2,00	100	
3	0,15	1,95	150	
4	0,20	1,90	200	
5	0,25	1,85	250	
Сыворотка	-	-		

Содержимое пробирок осторожно перемешивают, закрывают пробками и оставляют в темноте на 20 минут. Затем растворы колориметрируют на ФЭКе против реактива Илька в кюветах на 5 мм с красным светофильтром. Полученные значения экстинкции (E) используют для построения калибровочной кривой, откладывая по оси абсцисс количество холестерина в мг%, по оси ординат – оптическую плотность раствора.

Внимание! При выполнении методики необходимо быть особенно внимательными и осторожными, так как стандартный раствор холестерина приготовлен на концентрированной уксусной кислоте, а в состав реактива Илька входит концентрированная уксусная, концентрированная серная кислоты и уксусный ангидрид (в соотношении 1:1:5). Реактивы набирать только пипеткой с резиновой трубкой и стеклянным наконечником или автоматической пипеткой, не разливать, избегать попадания их на кожу, слизистые и одежду. Во время выполнения анализа пробирки обязательно закрывать пробками, а кюветы – крышками.

Калибровочная кривая

2. Определение содержания холестерина в сыворотке крови

В пробирку вносят 2 мл реактива Ильяка и 0,1 мл сыворотки крови. Содержимое перемешивают, закрывают пробкой и ставят в темное место на 20 минут, после чего колориметрируют, как при построении калибровочной кривой. Определяют концентрацию холестерина в сыворотке крови по полученной калибровочной кривой.

Результаты:

Общие выводы по работе:

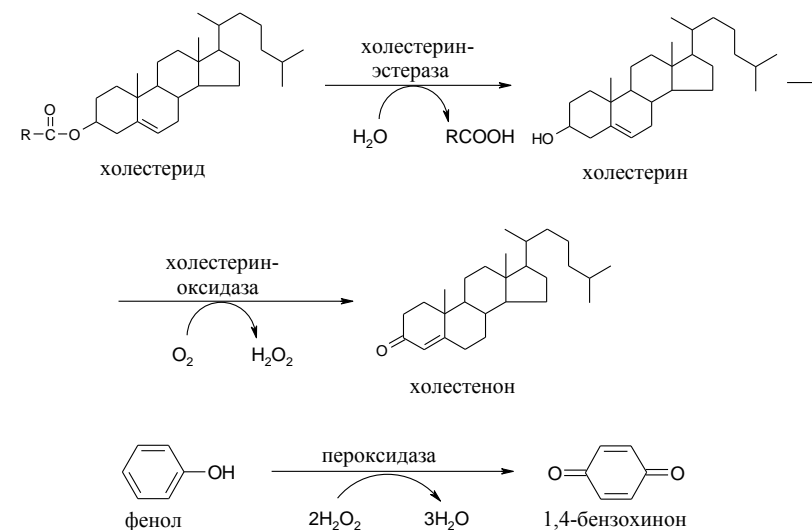
РАБОТА 17. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРОЛА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЭНЗИМАТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Цель работы: ознакомиться с одним из самых распространенных в клинической биохимии методов определения холестерина.

Задачи:

- определить содержание общего (свободного и этерифицированного) холестерина в предложенной сыворотке крови;
- проанализировать полученные результаты и сделать вывод.

Принцип метода. При гидролизе эфиров холестеридов холестеролэстеразой образуется холестерол. Общий холестерол (свободный и этерифицированный) окисляется кислородом воздуха под действием холестеролоксидазы с образованием эквимольного количества пероксида водорода:



В присутствии пероксидазы перекись водорода окисляет фенол, который превращается в бензохинон, имеющий розовый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации холестерина.

Реактивы

Из набора реагентов серии Olvex Diagnosticum готовят перед анализом:

1. Стандартный раствор холестерина – 5,17 ммоль/л (200 мг/дл),
2. Рабочий реагент, содержащий:
 - а) фосфатный буфер (100 ммоль/л),
 - б) фенол (20 ммоль/л),
 - в) холестеролэстеразу (400 U/л),
 - г) холестеролоксидазу (250 U/л),
 - д) пероксидазу (500 U/л).

Ход работы

В три обычные химические пробирки наливают:

- 1) в опытную – 0,02 мл сыворотки (или плазмы) крови,
- 2) в стандартную – 0,02 мл стандартного раствора холестерина,

Во все пробирки добавляют по 2 мл рабочего реагента, реакцию тщательно перемешивают и пробы помещают в термостат на 5 минут при 37 °С. Затем измеряют оптическую плотность

опытной и стандартной проб против контроля в кюветах с рабочей длиной 5 мм (или 3 мм) при длине волны 490-500 нм.

Окраска проб стабильна в течение 2 часов при условии отсутствия воздействия прямых солнечных лучей.

Расчет.

Расчет количества общего холестерина проводят по формуле:

$$C = E_o/E_{ст.} \times 5,17 \text{ [ммоль/л]} \text{ или } C = E_o/E_{ст.} \times 200 \text{ [мг/100мл]},$$

где E_o – экстинция опытной пробы,

$E_{ст.}$ – экстинция стандарта.

Содержание холестерина в сыворотке крови здоровых людей разного возраста колеблется в пределах:

20-29 лет – 3,72- 7,11 ммоль/л (144-175 мг/дл),

30-39 лет – 4,27-7,63 ммоль/л (165-295 мг/дл),

40-49 лет – 4,40- 8,15 ммоль/л (170-315 мг/дл),

старше 50 лет – 4,58-8,79 ммоль/л (177-340 мг/дл).

Результаты:

Общие выводы по работе:

РАБОТА 18. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРОЛА ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Цель работы: ознакомиться с современным и самым распространенным в клинической биохимии методом определения α -холестерола в сыворотке крови.

Задачи:

- определить содержание общего холестерина в предложенной сыворотке крови (см. работу 17);
- определить содержание холестерина липопротеинов высокой плотности (∞ -холестерола) в сыворотке крови;
- рассчитать холестериновый индекс атерогенности;
- проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

Принцип метода. Хиломикроны (ХМ), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеины низкой плотности (ЛПНП) осаждаются фосфорновольфрамовой кислотой и Mg^{2+} и отделяются центрифугированием. Липопротеины высокой плотности (ЛПВП) остаются в надосадочной жидкости (супернатанте) и количество холестерина в них определяется также, как концентрация общего холестерина энзиматическим методом.

Реактивы

1. Осаждающий реагент, содержащий фосфорновольфрамую кислоту и катионы Mg^{2+} ,
2. Стандартный раствор холестерол – 1,29 ммоль/л (50 мг/дл).
3. Рабочий реагент, содержащий:
 - а) фосфатный буфер (100 ммоль/л),
 - б) фенол (20 ммоль/л),
 - в) холестеролэстеразу (400 U/л),
 - г) холестеролоксидазу (250 U/л),
 - д) пероксидазу (500 U/л).

Ход работ.

а) Осаждение ЛПОНП и ЛПНП

В три центрифужные пробирки наливают:

1. в опытную – 0,15 мл исследуемой сыворотки крови,
2. в стандартную – 0,15 мл стандартного раствора холестерина,
3. в контрольную – 0,15 мл дист. H_2O .

Во все пробирки добавляют по 0,3 мл осаждающего реагента. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре. Затем опытную пробу центрифугируют в течение 15 минут при 3000 оборотах в минуту и прозрачный центрифугат используют для определения холестерола ЛПВП (α -холестерола). Стандартную и контрольную пробы можно не центрифугировать.

б) Определение концентрации α -холестерола

В три обычные химические пробирки (опытную, стандартную и контрольную) аккуратно автоматической пипеткой переносят по 0,2 мл жидкости из соответствующих центрифужных пробирок и добавляют по 2,0 мл рабочего реагента. Реакционную смесь тщательно перемешивают, и пробы помещают в термостат на 5 минут при 37 °С. Затем измеряют оптическую плотность опытной и стандартной пробы против контроля в кюветах на 5 мм при длине волны 490-500 нм.

Расчет

1. Концентрацию холестерина ЛПВП (α -холестерола) рассчитывают по формуле:

$$C = E_0/E_{ст.} \times 1,29 \text{ [ммоль/л]} \text{ или } C = E_0/E_{ст.} \times 50 \text{ [мг/дл]},$$

где E_0 и $E_{ст.}$ – экстинкции опытной и стандартной проб.

2. Расчет холестеринового индекса атерогенности (ХИА) проводят по формуле:

$$\text{ХИА} = (\text{общий холестерол} - \alpha\text{-холестерол}) / \alpha\text{-холестерол}$$

В норме величина холестеринового индекса атерогенности $\leq 3,0$.

Результаты:

Общие выводы по работе:

РАБОТА 19. ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В КРОВИ, МОЧЕ И МОЛОКЕ

Цель работы: ознакомиться с некоторыми реакциями выявления кетоновых тел в биологических жидкостях.

Задачи:

- определить количество кетоновых тел в сыворотке крови, молоке и моче;
- проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

Принцип метода. Ацетон и ацетоуксусная кислота образуют с нитропруссидом натрия в щелочной среде комплексное соединение розово-фиолетовой окраски. Интенсивность окраски зависит от количества кетоновых тел в реакции.

1. Качественная реакция выявления кетоновых тел

Ход работы. На кафель или стекло наносят 0,1-0,2 г порошка, прибавляют 2-3 капли сыворотки крови и выдерживают 5 минут. Появление розово-фиолетовой окраски указывает на положительный результат. Минимальный уровень кетоновых тел в крови, дающий положительную реакцию, равен 10 мг/100 мл (10 мг%). Скорость развития окраски и ее интенсивность пропорциональны концентрации кетоновых тел в исследуемой пробе: если фиолетовое окрашивание возникает немедленно – содержание 50-80 мг% и более; если оно появляется через 1 минуту – в пробе содержится 30-50 мг%; развитие слабой окраски через 3 минуты свидетельствует о присутствии 10-30 мг% кетоновых тел.

2. Полуколичественный метод определения кетоновых тел в сыворотке крови

Ход работы. После качественной реакции сыворотку крови разводят дистиллированной H_2O : при содержании 30-50 мг% делают разведения 1:3, 1:4, 1:5 и 1:6. Для этого берут 4 пробирки, в которые приливают по 0,1 мл сыворотки крови, в первую пробирку прибавляют 0,3, во вторую – 0,4, в третью – 0,5 и четвертую – 0,6 мл дистиллированной H_2O . Затем проводят качественную реакцию выявления кетоновых тел с нитропруссидом натрия на кафеле или предметном стекле так же, как в пункте 1, только прибавляют не цельную, а разведенную сыворотку крови. В пробе с наибольшим разведением, дающим положительную реакцию, содержится 10 мг% кетоновых тел. Умножая результат на степень разведения, получают содержание кетоновых тел в неразведенной пробе.

Кетоновые тела в свежеполученном молоке и моче определяют так же, как и в сыворотке крови (п. 1). Следует помнить, что тест более чем в 3 раза чувствительнее при определении ацетоуксусной кислоты, чем ацетона. Из всех кетоновых тел в сыворотке крови человека ацетоуксусная кислота является преобладающей, однако в крови здоровых коров 70-90% кетоновых тел составляет β -оксимасляная кислота, в молоке на ее долю приходится 87-92%.

Результаты:

Общие выводы по работе:

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Что такое липиды?
2. Приведите классификацию липидов.
3. В чем заключается роль липидов?
4. Какова суточная потребность в липидах у человека?
5. Как построены триацилглицеролы (ТАГ)?
6. Что такое эссенциальные жирные кислоты? Приведите примеры.
7. Из чего состоит фосфатидилхолин? Какова его роль? Приведите другие примеры глицерофосфолипидов.
8. Назовите основные компоненты в сфингомиелине.
9. Какие составные компоненты определяются в цереброзидах?
10. В чем сходство и различие между цереброзидами, ганглиозидами и сульфатидами?
11. Что такое стероиды?
12. Отрадите структуру холестерина.
13. Напишите формулу эргостерола.
14. Назовите ферменты, участвующие в гидролизе липидов в кишечнике.
15. Что такое желчные кислоты?
16. Напишите химические формулы наиболее распространенных желчных кислот.
17. Какие соединения являются предшественниками желчных кислот?
18. Какова роль желчных кислот?
19. Назовите основные особенности переваривания липидов у жвачных животных.
20. Какие транспортные частицы липидов присутствуют в крови? Какие из них образуются в слизистой кишечника?
21. Какие липопротеины плазмы крови содержат наибольшее количество эндогенных ТАГ?

22. Какие липопротеины плазмы крови содержат наибольшее количество холестерина?
23. Какие ферменты участвуют во внутриклеточном липолизе?
24. Что такое β -окисление жирных кислот? Где оно протекает?
25. Как происходит активация жирных кислот? Какое соединение участвует в переносе жирной кислоты из цитоплазмы в матрикс митохондрий?
26. Какой метаболит образуется при β -окислении жирных кислот?
27. Какие существуют пути утилизации активной уксусной кислоты (ацетил-КоА)?
28. Какой метаболит еще, кроме ацетил-КоА, образуется при окислении жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов?
29. Какова особенность β -окисления ненасыщенных жирных кислот?
30. Какие вещества необходимы для синтеза пальмитиновой кислоты?
31. В чем заключается ключевая роль ацилпереносящего белка (АПБ-SH)?
32. Назовите источники НАДФН \cdot H $^+$, необходимые для синтеза жирных кислот.
33. Из какого метаболита синтезируется холестерол?
34. Назовите функции холестерина.
35. Какие метаболиты относятся к кетоновым телам?
36. Из чего образуются кетоновые тела и какова их роль?
37. Где синтезируются кетоновые тела?
38. Какие соединения участвуют в синтезе церамида?
39. Что нужно для превращения церамида в сфингомиелин?
40. Как происходит превращение церамида в цереброзид?

6.3. ХИМИЯ И ОБМЕН БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ

РАБОТА 20. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БИУРЕТОВЫМ МЕТОДОМ

Цель работы: ознакомиться с одним из распространенных методов количественного определения белка в сыворотке крови.

Задачи:

- построить калибровочную кривую по стандартным растворам белка;
- определить содержание белка в предложенной сыворотке крови;
- проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

Принцип метода. Белки в щелочной среде реагируют с сульфатом меди с образованием комплексных соединений, окрашенных в сине-фиолетовый или красно-фиолетовый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию белка в растворе.

Ход работы

1. Построение калибровочной кривой

Готовят семь рабочих стандартных растворов белка разведением основного стандартного раствора (содержит 4 мг белка в 1 мл) дистиллированной водой, как указано в таблице.

Для приготовления контрольной пробы в пробирку наливают 2 мл дистиллированной воды.

№ проб	Стандарт. раствор, мл	H ₂ O, мл	Содержание белка в пробе, мг	E _{сред.}
1	0,25	1,75	1,0	
2	0,50	1,50	2,0	
3	0,75	1,25	3,0	
4	1,00	1,00	4,0	
5	1,25	0,75	5,0	
6	1,50	0,50	6,0	
7	1,75	0,25	7,0	
Контроль	-	2,00	-	-
Сыворотка	-	-		

Во все рабочие стандартные растворы и контроль добавляют по 2,5 мл биуретового реактива, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 минут для развития окраски. Окрашенные стандартные растворы колориметрируют на ФЭКе против контроля в кюветах на 5 мм с зеленым светофильтром (длина волны 540 нм). Полученные значения оптической плотности используют для построения калибровочной кривой.

2. Количественное определение белка в сыворотке крови

Исследуемую сыворотку крови разбавляют дистиллированной водой в 40 раз (1 мл цельной сыворотки смешивают с 39 мл H₂O).

К 2 мл разбавленной сыворотки добавляют 2,5 мл биуретового реактива и после перемешивания оставляют при комнатной температуре на 30 минут, а затем колориметрируют. Измерение оптической плотности производят так же, как при построении калибровочной кривой (используют тот же контроль, что и для построения калибровочной кривой). Содержание белка в пробе определяют по калибровочной кривой.

Результаты:

1. Калибровочная кривая

2. Расчет по формуле: $X = (A / 2 \times 40 \times 100) / 1000 = A \times 2$ (г/л),

где А – количество белка в пробе, определенное по калибровочной кривой,

A/2 – количество белка (мг) в 1 мл разбавленной в 40 раз сыворотки крови,

100 – для пересчета на 100 мл сыворотки (для выражения показателя в мг%),

1000 – для перевода единиц в г%.

В сыворотке крови здорового человека содержится 6,5-8 г% белка.

Общие выводы по работе:

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Какова суточная потребность в пищевом белке у человека?
2. Что такое азотистый баланс?
3. Какие существуют виды азотистого баланса?
4. Что такое белковый минимум? В каких единицах он выражается?
5. Что такое протеолиз?
6. Назовите эндо- и экзопептидазы желудочно-кишечного тракта.
7. В чем особенность переваривания белков у животных с четырехкамерным желудком?
8. Назовите источники аминокислот в организме.
9. Какова биологическая роль аминокислот?
10. Назовите основные пути деградации аминокислот в клетке.
11. Назовите виды прямого дезаминирования.
12. Какие аминокислоты подвергаются прямому дезаминированию?
13. Что такое не прямое дезаминирование?
14. Какой кофермент необходим для реакций трансаминирования?
15. Назовите наиболее активные трансаминазы.
16. В чем заключается биологическая значимость трансаминирования?
17. Какие соединения образуются в результате декарбоксилирования аминокислот?
18. Как обезвреживаются биогенные амины?
19. Как проявляется биологическое действие гистамина?
20. Как проявляется биологическое действие серотонина?
21. Каков биологический эффект γ -аминомасляной кислоты?
22. Назовите источники NH_3 в тканях.
23. Назовите пути обезвреживания аммиака в организме.
24. Назовите источники NH_2 -групп в мочеvine.
25. В каком органе происходит синтез мочевины?
26. Как происходит обезвреживание аммиака в ЦНС?
27. Какова судьба безазотистых остатков аминокислот?
28. Назовите кетогенные аминокислоты.
29. Приведите примеры кетогенных аминокислот
30. Что такое восстановительное аминирование?
31. Приведите примеры азотистых небелковых веществ. Какова их биологическая роль?

6.4. ВОДНО-МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН

РАБОТА 21. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО МЕТОДУ ВААРДА

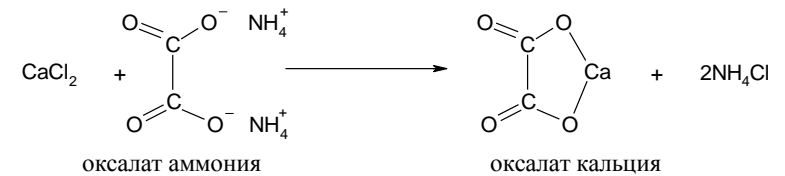
Цель работы: ознакомиться с титрометрическим методом определения кальция в сыворотке крови.

Задачи:

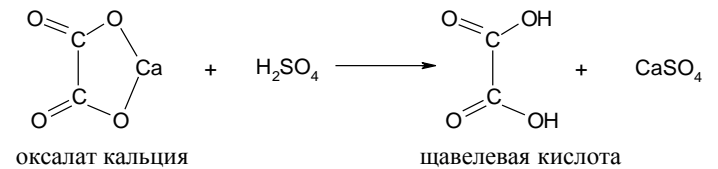
- определить содержание кальция в сыворотке крови;
- проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

Изменение содержания кальция в сыворотке крови служит диагностическим тестом при эндокринных и неврологических заболеваниях и болезнях, вызванных недостатком некоторых витаминов (например, витамина D). В норме содержание кальция в сыворотке крови человека составляет 9-11 мг%.

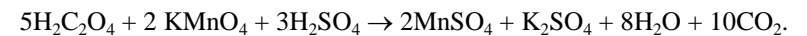
Принцип метода. Кальций, находящийся в сыворотке в виде водорастворимых солей, переводится в осадок в результате реакции:



Осадок растворяется в серной кислоте:



Освободившуюся щавелевую кислоту титруют раствором марганцевокислого калия:



Из приведенных уравнений следует, что по количеству марганцево-кислого калия, пошедшего на окисление щавелевой кислоты, можно рассчитать исходное количество кальция.

Ход работы. В одну центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови (опытная проба), а в другую – 1 мл дистиллированной воды (контрольная проба). В обе пробирки добавляют по 1 мл 4%-го раствора щавелевокислого аммония, пробы перемешивают, оставляют на 30 минут при комнатной температуре и центрифугируют со скоростью 3000 об./мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливают, в пробирки добавляют по 4 мл 2%-го раствора NH_4OH и содержимое перемешивают стеклянной палочкой. Пробы центрифугируют в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливают, в пробирки добавляют по 2 мл 1 н раствора H_2SO_4 и содержимое перемешивают стеклянной палочкой. Не вынимая палочки, пробирки погружают в кипящую водяную баню до растворения осадка. Пробы в горячем виде титруют 0,01 н раствором KMnO_4 до появления бледно-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 минуты.

Содержимое кальция в сыворотке крови рассчитывают по уравнению:

$$X = 0,2 \times (a - б) \times 100,$$

где X – содержимое кальция в сыворотке крови в мг%;

a – количество 0,01 н раствора KMnO_4 , пошедшее на титрование опытной пробы;

б – количество 0,01 н раствора KMnO_4 , пошедшее на титрование контрольной пробы;

0,2 – количество кальция (в мг), эквивалентное 1 мл 0,01 н раствора KMnO_4 , согласно уравнениям реакций.

Общие выводы по работе:

РАБОТА 22. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА В КРОВИ

Цель работы: ознакомиться с колориметрическим методом определения неорганического фосфора в крови.

Задачи:

- построить калибровочную кривую по стандартным растворам фосфора;
- определить содержание фосфора в крови;
- проанализировать полученные результаты и сделать вывод.

Неорганический фосфор биологических жидкостей входит в состав солей фосфорной кислоты. Основное назначение солей фосфорной кислоты в биологических жидкостях и в первую очередь в крови – создание в них буферной системы. Довольно часто в диагностических целях в клинических лабораториях определяют в крови пациентов содержание неорганического фосфора. В норме в крови содержание неорганического фосфора составляет 2,5-5 мг%.

Принцип метода. Неорганический фосфат взаимодействует с молибдатом аммония в присутствии восстановителей (например, гидрохинона и сернистокислого натрия) с образованием окрашенного комплексного соединения (молибденовой сини). Интенсивность окраски раствора пропорциональна концентрации неорганического фосфата.

Ход работы

1. Построение калибровочной кривой

а) В пять пробирок вносят по 1 мл стандартного раствора фосфора, содержащего соответственно 5, 10, 15, 20 и 25 мкг фосфора в мл. В контрольную пробирку вносят 1 мл дистиллированной воды.

б) Во все пробы добавляют по 4 мл дистиллированной воды, 0,5 мл 20%-го раствора трихлоруксусной кислоты, 0,5 мл молибденового реактива и 0,5 мл 1%-го раствора гидрохинона. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют на 5 минут, после чего во все пробы добавляют по 2 мл карбонатульфитного раствора и по 1,5 мл дистиллированной воды; перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 минут. Пробу колориметрируют с зеленым светофильтром в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольной пробы.

Внимание! Колориметрированию могут помешать образующиеся в процессе реакции пузырьки углекислого газа, поэтому перед измерением их необходимо осторожно снять со стенок кювет с помощью пастеровской пипетки и быстро измерить оптическую плотность растворов.

2. Определение фосфора в крови

В центрифужную пробирку вносят 3 мл дистиллированной воды, 1 мл крови и 1 мл 20%-го раствора трихлоруксусной кислоты, смесь перемешивают и оставляют на 10 минут (для осаждения белков). Затем пробы центрифугируют 5 минут при 1500 об./мин и 1 мл надосадочной жидкости отбирают в другую пробирку. Для приготовления контрольной пробы в другую пробирку вносят 1 мл дистиллированной воды. Далее в обе пробирки приливают реактивы в той же последовательности, как описано в пункте «б» при построении калибровочной кривой.

Расчет: концентрацию фосфора в пробе определяют по калибровочной кривой и рассчитывают его содержание в крови в мг% по формуле:

$$X = (A \times 5 \times 100) / 1000 = A / 2 \text{ (мг\%)},$$

где А – количество фосфора в пробе, определенное по калибровочной кривой;

А × 5 – количество фосфора в 1 мл крови;

100 – для пересчета количества фосфора в 100 мл крови;

1000 – для перевода мкг в мг.

Результаты:

№ проб	Содержание фосфора, мкг/мл	Е _{сред.}
1	5	
2	10	
3	15	
4	20	
5	25	
Кровь		

Калибровочная кривая

Расчет по формуле:

Общие выводы по работе:

РАЗДЕЛ 7. ГОРМОНЫ

РАБОТА 23. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ГОРМОНЫ

Цель работы: ознакомиться с некоторыми химическими свойствами готовых препаратов гормонов.

Задачи:

- проделать перечисленные ниже химические реакции;
- проанализировать полученные результаты и сделать вывод.

Гормоны – биологически активные органические соединения, участвующие в регуляции обмена веществ.

1. Качественные реакции на инсулин

Инсулин – низкомолекулярный простой белок, синтезируемый β -клетками островковой ткани поджелудочной железы. Качественные реакции, характерные для белков, подтверждают белковую природу инсулина.

а) Биуретовая реакция

Ход работы. К 10 каплям раствора инсулина прибавляют 5 капель 10%-го раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1%-го раствора сульфата меди. Жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

б) Реакция Фоля

Ход работы. 5 капель раствора инсулина смешивают с 5 каплями реактива Фоля и смесь кипятят 1-2 мин до появления бурого осадка.

в) Реакция Милона

Ход работы. В пробирке смешивают 10 капель раствора инсулина и 2-3 капли реактива Милона. Смесь осторожно нагревают до образования осадка в виде сгустка красного цвета.

г) Реакция Геллера

Ход работы. Пробирку с 10 каплями концентрированной азотной кислоты наклоняют под углом 45° и осторожно по стенке приливают 10 капель раствора инсулина. На границе двух жидкостей образуется белое кольцо.

д) Реакция с раствором гидроксида натрия

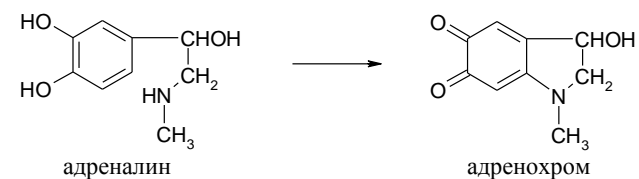
Ход работы. В пробирку приливают 10 капель раствора инсулина, а затем по каплям 0,1%-й раствор гидроксида натрия до выпадения хлопьевидного осадка. Осадок растворяется при подкислении 0,5%-м раствором уксусной кислоты до pH=2,5-3,5 (по универсальной индикаторной бумаге).

е) Реакция с сульфосалициловой кислотой

Ход работы. К 10 каплям раствора инсулина прибавляют 3-5 капель 20%-го раствора сульфосалициловой кислоты до выпадения белого осадка.

2. Качественные реакции на адреналин

Адреналин – гормон, который синтезируется в мозговом веществе надпочечников. По химической природе адреналин является производным пирокатехина и легко окисляется, превращаясь сначала в дегидроадреналин, а затем в неактивный хинон красного цвета – адренохром:

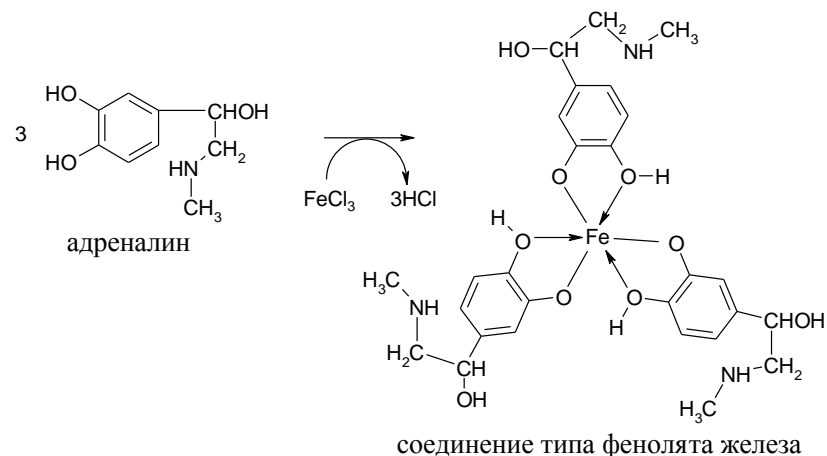


Адренохром может участвовать в дальнейших окислительно-восстановительных реакциях или полимеризуется с образованием высокомолекулярного пигмента – меланина коричневого цвета.

Качественные реакции на адреналин обусловлены его окислением до адренохрома или реакционной способностью пирокатехинового кольца.

a) Реакция с хлорным железом

При добавлении к раствору адrenalина хлорида железа (III) жидкость окрашивается в изумрудно-зеленый цвет, характерный для комплексного соединения типа фенолята, образующегося за счет гидроксильных групп пирокатехинового кольца. В щелочной среде окраска меняется на красную, а затем коричневую вследствие появления адренохрома и продуктов его полимеризации.



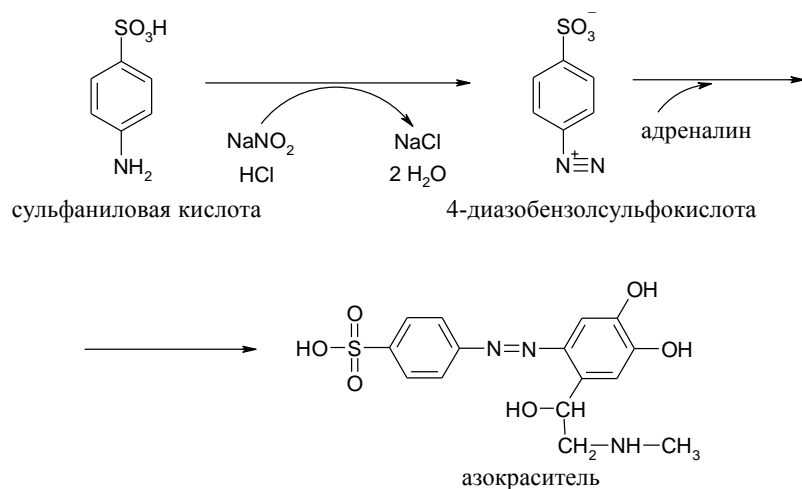
Ход работы. 3-5 капель 0,1%-го раствора адrenalина смешивают в пробирке с 1 каплей 1%-го раствора хлорного железа. Появляется зеленое окрашивание. Затем добавляют 1 каплю 10%-го раствора

гидроксида натрия, при этом окраска переходит в вишнево-красную, а затем в коричневую.

Эту же реакцию делают с 0,05%-м раствором пирокатехина

б) Диазореакция

При взаимодействии диазореактива с адреналином образуется азокраситель красного цвета. Диазореактив – смесь сульфаниловой кислоты и азотистой кислоты (или ее соли):



Ход работы. В пробирку вносят 3 капли 1%-го раствора сульфаниловой кислоты, 3 капли 5%-го раствора азотистокислого натрия, 5 капель 0,1%-го раствора адреналина и 3 капли 10%-го раствора углекислого натрия. Жидкость окрашивается в красный цвет.

в) Реакция с нитритно-молибденовым реактивом

Ход работы. В пробирку наливают 5 капель 0,1%-го раствора адреналина, 5 капель 5%-го раствора соляной кислоты и 5 капель нитритно-молибденового реактива. Смесь перемешивают. Появляется желто-оранжевое окрашивание, которое при добавлении 3-5 капель 10%-го раствора гидроксида натрия меняется на малиново-красное а после внесения 3-5 капель концентрированной соляной кислоты становится лимонно-желтым.

з) Реакция с реактивом Фолина

Входящие в состав реактива Фолина соли фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот при взаимодействии с фенолами восстанавливаются с образованием оксидов, окрашенных в синий цвет.

Ход работы. В пробирке смешивают 2 капли 0,1%-го раствора адреналина и 5 капель 10%-го раствора карбоната натрия. Через 3-4 минуты добавляют 1 каплю реактива Фолина. Появляется синее окрашивание.

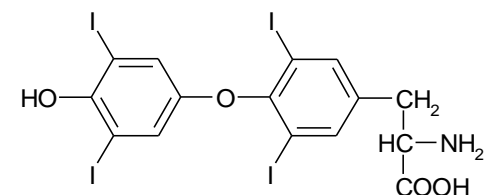
д) Реакция с йодатом калия

Адреналин образует в кислой среде с йодноватистокислым калием соединение красно-фиолетового цвета.

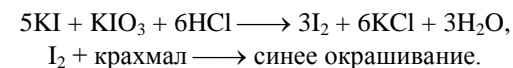
Ход работы. В пробирку вносят 5 капель 0,1%-го раствора адреналина, 2 капли 10%-го раствора KIO_3 и 5 капель 10%-го раствора уксусной кислоты. Содержимое пробирки нагревают до температуры 60-65 °С и наблюдают появление красно-фиолетового окрашивания.

3. Качественная реакция на тироксин

Тироксин – йодсодержащий гормон щитовидной железы:



Тироксин содержится в тиреоидине – препарате, получаемом из обезжиренной и высушенной щитовидной железы крупного рогатого скота. Тироксин, освободившийся при разрушении тиреоидина, подвергают щелочному гидролизу, в результате которого образуется йодид калия. Йод из йодистого калия вытесняют йодноватистокислым калием и обнаруживают с помощью качественной реакции с крахмалом (синее окрашивание в кислой среде):



Ход работы

а) Гидролиз тиреоидина

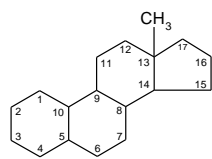
5 таблеток тиреоидина тщательно растирают в фарфоровой ступке. Порошок переносят в коническую колбу, добавляют 5 мл 10%-го раствора бикарбоната калия и 5 мл дистиллированной воды. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником и смесь кипятят 15 мин (с момента закипания) при умеренном нагревании.

б) Обнаружение йода в гидролизате

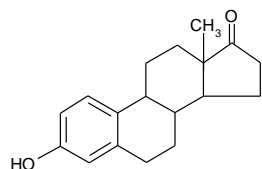
В пробирку вносят 24 капли охлажденного гидролизата и добавляют по каплям 10%-й раствор серной кислоты до кислой реакции (на лакмус). После подкисления прибавляют 3 капли 1%-го раствора крахмала и 5-10 капель 2%-го раствора йодноватисто-кислого калия (не следует добавлять избыток) до появления синего окрашивания.

4. Качественные реакции на фолликулин

Фолликулин (эстрон) – один из женских половых гормонов (эстрогенов) имеет стероидную структуру:



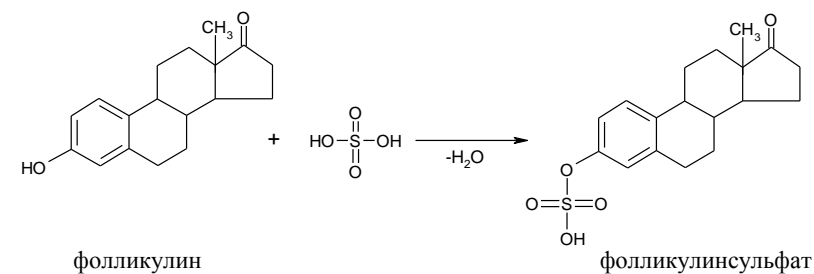
эстран



эстрон (фолликулин)

а) Реакция с концентрированной серной кислотой.

При взаимодействии фолликулина с концентрированной серной кислотой образуется эфирное соединение соломенно-желтого цвета (фолликулинсульфат):



Ход работы. Пробирку с 20 каплями спиртового раствора фолликулина помещают на 5-10 минут в кипящую водяную баню для удаления спирта. Затем добавляют 20 капель концентрированной серной кислоты и пробу снова выдерживают 5-10 минут в кипящей водяной бане. Жидкость постепенно приобретает соломенно-желтую окраску, переходящую в оранжевую и красно-бурую.

Если для анализа берут масляный раствор фолликулина, то реакция идет при комнатной температуре. В смеси из 3-5 капель масляного раствора фолликулина и 2 капель концентрированной серной кислоты развивается соломенно-желтое окрашивание.

б) Реакция с реактивом Фолина

При взаимодействии фолликулина с реактивом Фолина появляется синее окрашивание, характерное для фенольного радикала.

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель раствора фолликулина, 2-3 капли 30%-го раствора гидроксида натрия и 2-3 капли реактива Фолина. Смесь окрашивается в синий цвет.

в) Диазореакция

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл спиртового раствора фолликулина, 1 мл 10%-го раствора карбоната натрия и 1 мл диазореактива (0,5 мл 1%-го раствора сульфаниловой кислоты смешивают с 0,5 мл 5%-го раствора нитрита натрия). Постепенно возникает бледно-желтое окрашивание.

г) Реакция с гидроксидом натрия

При взаимодействии фолликулина с гидроксидом натрия образуется хорошо растворимый фенолят фолликулина.

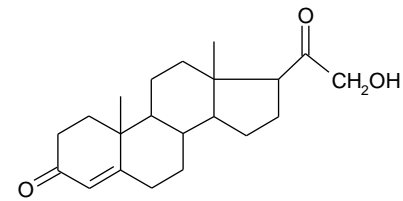
Ход работы. В две сухие пробирки наливают по 10 капель спиртового раствора фолликулина. В первую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды и отмечают образование эмульсии фолликулина. Во вторую пробирку прибавляют 1 мл 30%-го раствора гидроксида натрия и содержимое перемешивают. Во второй пробирке помутнения раствора нет, так как в щелочной среде образуется растворимый фенолят эстрогена.

д) Реакция на 17-кетогруппу

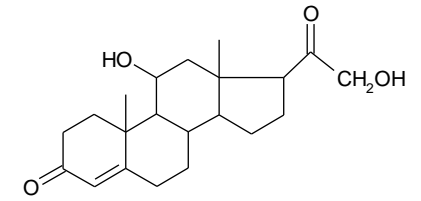
Ход работы. В сухую пробирку вносят 5 капель раствора фолликулина, 5 капель 10%-го раствора гидроксида натрия и 5 капель 2%-го спиртового раствора м-динитробензола. Через 5-8 мин развивается красное окрашивание.

5. Качественные реакции на кортикостероиды

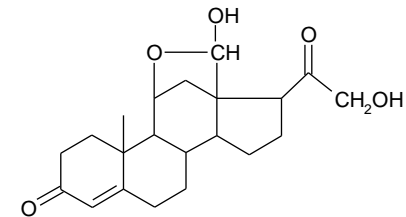
Кортикостероиды – гормоны, синтез которых происходит в корковом слое надпочечников. К кортикостероидам относятся дезоксикортикостерон, альдостерон, кортикостерон, гидрокортизон (кортизол) и кортизон. Все они – вещества стероидной структуры, в молекулах которых содержатся кето- и гидроксигруппы:



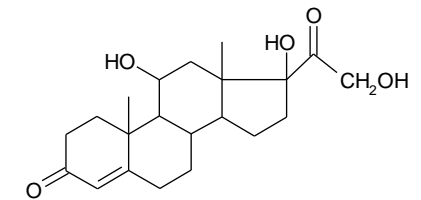
дезоксикортикостерон



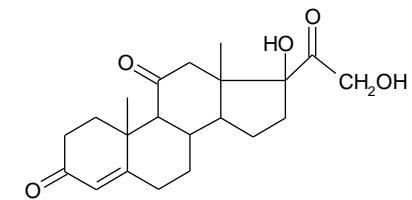
кортикостерон



альдостерон



гидрокортизон (кортизол)



кортизон

а) Реакция на кортизол

Кортизол, как и другие кортикостероиды, дает цветную реакцию с синим тетразолием, которая основана на его восстановлении за счет гидроксикетонной группы у 17-го углеродного атома гормона.

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл спиртового раствора кортизола (20 мкг/мл), 5 капель 10%-го раствора гидроксида тетраметиламмония и 5 капель 5%-го спиртового раствора синего тетразолия. Содержимое пробирки перемешивают и помещают в темноту на 25 мин. Жидкость окрашивается в розовый цвет.

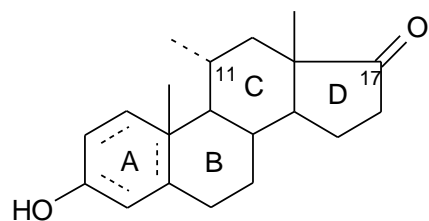
б) Реакция на дезоксикортикостерон

Ход работы. В пробирке смешивают 1 каплю масляного раствора дезоксикортикостерон-ацетата, 3-4 капли 96%-го этанола и 3-4 капли

концентрированной серной кислоты. Смесь нагревают до кипения, охлаждают, добавляют еще 15 капель концентрированной серной кислоты и снова нагревают до кипения. Появляется синяя окраска.

в) Качественная реакция на 17-кетостероиды в моче
(реакция Циммермана)

17-кетостероиды являются конечным продуктом обмена гормонов коры надпочечников и половых гормонов. Они характеризуются наличием кетогруппы при 17-м углеродном атоме циклопентанпергидрофенантренового ядра. Различные 17-кетостероиды отличаются наличием или отсутствием функциональных групп у 11-го атома углерода, либо ароматичной структурой кольца А. Общая химическая формула 17-кетостероида:



В моче 17-кетостероиды находятся в основном в виде глюкуронидов. Содержание 17-кетостероидов в суточной моче здоровых людей зависит от возраста и пола. Так, у детей до 6 лет оно равно 3-4 мг/сутки, а с 6 до 12 лет – 5-10 мг/сутки. Суточная моча женщин детородного возраста содержит 6-15 мг 17-кетостероидов, а мужчин – 15-25 мг.

Количество 17-кетостероидов в моче меняется при гипер- и гипофункции надпочечников, аденогипофиза и семенников.

Так, при болезни Аддисона оно составляет 1/5-1/3 нормы, а при болезни Симмондса почти равно нулю. Содержание 17-кетостероидов в моче также понижено при гипотиреозе, циррозе печени, гипофизарной карликовости, недостаточной функции семенников.

Количество 17-кетостероидов в моче повышено при акромегалии, синдроме Иценко–Кушинга, андрогенитальном синдроме, опухолях семенников и надпочечников. Так при опухолях семенников оно достигает 1500 мг/сутки, а при опухолях надпочечников – до 2000 мг/сутки.

Реакция Циммермана основана на взаимодействии 17-кетостероидов с метадинитробензолом в щелочной среде с образованием

продуктов конденсации вишнево-красного или розово-фиолетового цвета.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 5 капель мочи, 5 капель 2%-го спиртового раствора м-динитробензола и 5 капель 30%-го раствора гидроксида натрия, перемешивают. Через 2-3 мин появляется вишнево-красное окрашивание, характерное для 17-кетостероидов.

Эту же реакцию можно сделать иначе: пробирку с 20 каплями мочи наклоняют под углом 45° и медленно, осторожно по стенке добавляют 30 капель 2%-го спиртового раствора мета-динитробензола. Затем также по стенке прибавляют 6 капель 24%-го спиртового раствора гидроксида натрия. Верхний слой окрашивается в розово-фиолетовый цвет

Техника безопасности

- Осторожно обращайтесь с концентрированными кислотами и щелочами.
- Соблюдайте правила техники безопасности, пользуясь электронагревательными приборами и спиртовкой.

Общие выводы по работе:

ПЕРЕЧЕНЬ НАЗВАНИЙ РЕФЕРАТОВ ПО ТЕМЕ «ГОРМОНЫ»

1. Химическая природа и классификация гормонов.
2. Механизм действия гормонов.
3. Биотехнология получения гормонов. Применение генной инженерии в производстве гормонов.
4. Гормоны гипофиза и их влияние на обмен веществ.
5. Гормоны поджелудочной железы, структура и биологическая роль.
6. Гормоны щитовидной железы, их биологическая роль.
7. Инсулин, его влияние на обмен веществ.
8. Гормоны мозгового слоя надпочечников, структура, роль в обмене веществ.
9. Адреналин, структура и биологическая роль. Механизм действия адреналина.
10. Метаболизм адреналина.

11. Химическая природа и механизм действия гормонов, регулирующих минеральный обмен.
12. Гормоны парашитовидной железы, их роль в обмене веществ.
13. Биологическая роль и структура гормонов коркового слоя надпочечников.
14. Половые гормоны: структура и биологическая роль.
15. Простагландины и их применение в сельском хозяйстве.
16. Стресс, влияние на организм.
17. Промышленные стрессы и их влияние на продуктивность сельскохозяйственных животных.
18. Применение гормонов в сельском хозяйстве.
19. Роль нейропептидов.
20. Роль гипоталамуса в регуляции обменных процессов в организме.
21. Гормоноиды (гормоны местного действия), структура, свойства и биологическая роль.
22. Наследственные anomalies обмена гормонов.
23. Гормоны беспозвоночных.
24. Развитие эндокринной системы в филогенезе.
25. Развитие эндокринной системы в онтогенезе.

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Что такое гормоны?
2. Назовите железы внутренней секреции.
3. Назовите основные механизмы действия гормонов.
4. Какие гормоны вырабатываются в эпифизе?
5. Какова роль мелатонина?
6. Какие гормоны вырабатываются в гипоталамусе?
7. Какое действие оказывают либерины? Назовите их.
8. Какое действие оказывают статины? Назовите их.
9. Какие гормоны вырабатываются в передней доле гипофиза?
10. Какие гормоны накапливаются в задней доле гипофиза?
11. Каково физиологическое действие вазопрессина?
12. Каково физиологическое действие окситоцина?
13. Какова роль средней доли гипофиза?
14. Перечислите гормоны гипофиза, образующиеся из ПОМК.

15. Приведите примеры гормонов гипофиза, являющихся протеинами и гликопротеинами.
16. Какие гормоны синтезируются в щитовидной железе?
17. Напишите химические формулы тиреоидных гормонов.
18. Каково биологическое действие тиреоидных гормонов?
19. Какой гормон синтезируется С-клетками щитовидной железы? Какой обмен он регулирует?
20. Синтез и биологическая роль паратгормона.
21. Каков механизм действия паратгормона?
22. Назовите гормон-регулятор обмена Ca^{2+} .
23. Перечислите гормоны поджелудочной железы.
24. Структура и биологическая роль инсулина.
25. Механизм действия инсулина.
26. Роль глюкогона в регуляции углеводного обмена.
27. Механизм действия глюкогона на липидный обмен.
28. Назовите основные гормоны, синтезируемые в надпочечниках.
29. Какие гормоны синтезируются в мозговом слое надпочечников? Напишите формулы.
30. Влияние адреналина на обмен углеводов.
31. Роль адреналина в регуляции липидного обмена
32. Каковы метаболические эффекты глюкокортикоидов?
33. Какова биологическая роль альдостерона?
34. Какие гормоны продуцируются женскими половыми железами?
35. Назовите мужские половые гормоны. Перечислите основные физиологические эффекты андрогенов.
36. Эстрогены, их биологическая роль.
37. Структура и биологическая роль прогестерона.
38. Какие гормоны повышают содержание глюкозы в крови?
39. Какие гормоны понижают содержание глюкозы в крови?
40. Какие гормоны усиливают протеолиз в тканях?
41. Какие гормоны усиливают липолиз?
42. Какие гормоны стимулируют липогенез?
43. Какие гормоны стимулируют синтез белка?
44. Что такое гормоны местного действия (парагормоны)?

ПРИЛОЖЕНИЯ

СРОКИ И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ ИССЛЕДУЕМОЙ ПРОБЫ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ

При исследовании крови следует знать и учитывать целый ряд факторов: в противном случае возможны необъективные интерпретации полученных результатов.

Прежде всего надо иметь в виду, что при наличии гемолиза некоторые биохимические показатели остаются без изменений, в то же время другие могут значительно отличаться от тех же показателей в негемолизированной сыворотке. В частности, гемолиз мешает определению концентрации общего белка, билирубина, холестерина, железа, мочевины, меди, неорганического фосфора, однако не оказывает существенного влияния на такие показатели, как активность холинэстеразы, концентрация глюкозы.

На некоторые показатели оказывает влияние присутствие антикоагулянтов. Так, стабилизация крови гепарином, цитратом или оксалатом мешает определению меди. В то же время присутствие антикоагулянтов не влияет на определение неорганического фосфора.

Наиболее важное значение имеют продолжительность хранения исследуемой пробы (с момента взятия крови и начала анализа) и условия, при которых она хранится. Концентрация неорганического фосфора остается стабильной в течение 7 суток при хранении при +4 °С, но только 2 дня при комнатной температуре. С увеличением продолжительности срока хранения сыворотки содержание неорганического фосфора возрастает за счет распада органических веществ, содержащих фосфор (АТФ, глюкозо-6-фосфат и др.). Определение билирубина должно проводиться по возможности быстро, сыворотку нужно хранить в темном месте. Концентрация кальция в сыворотке крови не меняется в течение 10 дней как при +4 °С, так и при 20-25 °С. Концентрация холестерина достаточно стабильна в течение 6 суток при любых условиях хранения сыворотки крови. За такой же период (6 суток) не происходит серьезных изменений в содержании общего белка, однако в этом случае сыворотку необходимо хранить при температуре +4 °С. Концентрация меди остается без изменений на протяжении 14 дней, магния – 7. Концентрация железа не меняется в сыворотке в течение 7 суток, если ее хранить при +4 °С, и 4 дня – при хранении в условиях комнатной температуры. Активность холинэстеразы устойчива в сыворотке крови на протяжении 7 дней.

Определение концентрации глюкозы должно проводиться в течение 4 часов с момента взятия крови, так как при длительном хранении содержание сахара снижается. При удалении белка концентрация глюкозы в надосадочной жидкости достаточно стабильна в течение 2-3 дней. Очень лабильна концентрация промежуточного метаболита глюкозы – пирувата. Для определения этого показателя кровь необходимо брать в охлажденные пробирки, не следует использовать жгут, а анализ проводят сразу же после взятия пробы.

ТАБЛИЦА ПЕРЕВОДА ОСНОВНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В СИСТЕМУ СИ

Показатели	Единицы СИ	Коэффициент перевода в систему СИ
Глюкоза	ммоль/л	мг% \times 0,0555
Общий белок	г/л	г% \times 10
Билирубин	мкмоль/л	мг% \times 17,104
Холестерин	ммоль/л	мг% \times 0,0259
Кальций	ммоль/л	мг% \times 0,2495
Фосфор	ммоль/л	мг% \times 0,3229
Железо	мкмоль/л	мкг% \times 0,1791
Медь	мкмоль/л	мкг% \times 0,1574
Магний	ммоль/л	мг% \times 0,4113
Каротин	мкмоль/л	мкг% \times 0,0186
Витамин А	мкмоль/л	мкг% \times 0,0349
Кетоновые тела	г/л	мг% \times 0,01
ПВК	мкмоль/л	мг% \times 113,6

ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ К ЭКЗАМЕНАЦИОННЫМ БИЛЕТАМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

1. Роль биохимии в развитии науки, промышленности и сельском хозяйстве.

БЕЛКИ. АМИНОКИСЛОТЫ

2. Классификация аминокислот.
3. Физико-химические свойства аминокислот.
4. Заменяемые и незаменимые аминокислоты.
5. Моноаминодикарбоновые кислоты. Роль глутаминовой кислоты в обмене веществ.
6. Гетероциклические аминокислоты. Структура и биологическая роль гистидина.
7. Серосодержащие аминокислоты. Роль метионина и цистеина в обмене веществ.
8. Белки, их биологическая роль, значение в построении живой материи и в процессах жизнедеятельности.
9. Типы химических связей в структуре белка, их значение. Особенности структуры пептидной связи.
10. Первичная структура белковой молекулы и методы ее изучения.
11. Вторичная структура молекулы белка, методы ее изучения.
12. Третичная структура белка. Понятие шаперона, домена.
13. Четвертичная структура белка. Примеры строения и функционирования олигомерных белков. Методы изучения третичной и четвертичной структуры.
14. Коллаген. Особенности его структуры, роль в организме.
15. Хромопротеины. Структура и биологическая роль гемоглобина.
16. Особенности структуры и биологическая роль иммуноглобулинов.
17. Физико-химические свойства белков.
18. Классификация белков.

ФЕРМЕНТЫ

19. Структура ферментов. Понятие о мультиэнзимных комплексах.
20. Множественные формы ферментов (изоферменты, гетероферменты).
21. Активный центр ферментов. Общее представление о механизме действия ферментов.
22. Общие свойства ферментов.
23. Действие ингибиторов на активность ферментов. Типы ингибирования.

24. Специфичность действия ферментов.
25. Классификация и номенклатура ферментов.
26. Регуляция активности ферментов.
27. Применение ферментов в научных исследованиях, в медицинской, ветеринарной и с/х практике.

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

28. Мажорные и минорные азотистые основания в нуклеиновых кислотах.
29. Структура и биологическая роль нуклеозидов и мононуклеотидов.
30. Структура и функции циклических мононуклеотидов.
31. Структура, биологическая роль и пути биосинтеза АТФ.
32. Первичная структура нуклеиновых кислот.
33. Структура и биологическая роль основных классов РНК.
34. Особенности структуры и роль тРНК.
35. Структура и биологическая роль мРНК.
36. Рибосомы, их строение и роль в биосинтезе белка, рРНК.
37. Структура и биологическая роль ДНК. Укладка ДНК в хроматине и в хромосомах.
38. Принцип комплементарности азотистых оснований в нуклеиновых кислотах, его роль.
39. Генетический код, его свойства.

ВИТАМИНЫ

40. Классификация витаминов.
41. Коферментная функция витаминов.
42. Витамин группы А.
43. Витамин группы Д.
44. Витамин Е.
45. Витамин К.
46. Витамин F.
47. Витамин В₁.
48. Витамин В₂.
49. Витамин В₃.
50. Витамин М (фолиевая кислота).
51. Витамин РР.
52. Витамин В₆.
53. Витамин Н.
54. Витамин С.
55. Антианемические витамины.

56. Причины возникновения гипо- и авитаминозов.

57. Понятие о витаминоподобных соединениях.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

58. Понятие о макроэргических соединениях, их роль в обмене.

59. Биологическое окисление. Последовательность расположения переносчиков в дыхательной цепи

60. Пиридинзависимые дегидрогеназы.

61. Флавінзависимые дегидрогеназы.

62. Ферменты цитохромной системы.

63. Компоненты дыхательной цепи неферментной природы.

64. Окислительное фосфорилирование. Представление о механизмах сопряжения окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи.

ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

65. Биологическая роль и классификация углеводов.

66. Переваривание и всасывание углеводов. Особенности переваривания углеводов у животных с четырехкамерным желудком.

67. Пути распада гликогена.

68. Биосинтез гомополисахаридов (на примере гликогена и крахмала).

69. Биосинтез дисахаридов (на примере лактозы и сахарозы).

70. Роль УДФ-глюкозы в обмене углеводов.

71. Обмен фруктозы и галактозы в организме человека.

72. Гликолиз, его значение.

73. Гликогенолиз.

74. Сравнительная характеристика аэробного и анаэробного распада глюкозы.

75. Аэробное окисление глюкозы.

76. Цикл трикарбоновых кислот.

77. Глиоксальный цикл.

78. Челночные механизмы транспорта электронов и протонов через мембрану.

79. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты.

80. Баланс энергии распада глюкозы.

81. Пентозофосфатный путь обмена углеводов, его биологическая роль.

82. Окислительный и неокислительный пути образования пентоз.

83. Пути биосинтеза глюкозы в организме.

84. Особенности спиртового и молочно-кислого брожения.
85. Глюконеогенез, его значение.
86. Особенности углеводного обмена при фотосинтезе.

ОБМЕН ЛИПИДОВ

87. Биологическая роль и классификация липидов.
88. Глицеролсодержащие фосфолипиды: структура, биологическая роль.
89. Структура и биологическая роль сфингозинсодержащих липидов.
90. Структура и биологическая роль стерина и стеридов.
91. Переваривание и всасывание липидов.
92. Структура и роль желчных кислот в переваривании и всасывании липидов.
93. β -окисление жирных кислот.
94. Баланс энергии распада жирных кислот (на примере пальмитиновой кислоты).
95. Распад и биосинтез ацилглицеролов в тканях.
96. Биосинтез жирных кислот.
97. Характеристика мультиэнзимного комплекса, осуществляющего биосинтез жирных кислот.
98. Простагландины, их роль.
99. Синтез фосфатидной кислоты и ее роль в обмене липидов.
100. Биосинтез сфингозинсодержащих липидов.
101. Метаболизм и биологическая роль холестерина.
102. Метаболизм кетоновых тел.

ОБМЕН БЕЛКОВ

103. Роль белков в питании. Азотистый баланс. Белковый минимум.
104. Ферментный гидролиз белков в ЖКТ. Протеолитические ферменты, специфичность действия и активация.
105. Переаминирование, его механизм, биологическое значение.
106. Роль аминотрансфераз в обмене белков. Применение их в медицинской, ветеринарной и с/х практике.
107. Дезаминирование аминокислот.
108. Декарбоксилирование аминокислот. Роль и распад биогенных аминов.
109. Пути обезвреживания аммиака в организме.
110. Биосинтез мочевины.
111. Общие пути синтеза заменимых аминокислот.
112. Азотистые небелковые вещества, их биологическая роль.

113. Незаменимые пищевые факторы.
114. Взаимосвязь обмена белков, углеводов и липидов.
115. Роль микрофлоры желудочно-кишечного тракта в переваривании веществ у жвачных.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

116. Общие представления о строении и функциях биомембран клетки.
117. Структура и роль липидов биологических мембран.
118. Особенности строения и локализации мембранных белков.
119. Перенос веществ через биомембрану.
120. Общие сведения о трансмембранной передаче сигнала.
121. Аденилатциклазная система передачи информации.
122. Инозитолфосфатная система передачи сигнала.
123. Участие в передаче сигнала каталитических и внутриклеточных рецепторов.

ГОРМОНЫ

124. Роль эндокринной системы в регуляции биохимических процессов.
125. Тиреоидные гормоны щитовидной железы.
126. Гормоны, регулирующие обмен кальция и фосфора.
127. Структура и биологическая роль гормонов мозгового вещества надпочечников. Механизм действия адреналина на обмен веществ.
128. Глюкокортикоиды: структура, биологическая роль, механизм действия.
129. Минералокортикоиды, структура, биологическая роль, механизм действия.
130. Глюкагон: биологическая роль, механизм действия.
131. Структура и биологическая роль инсулина.
132. Половые гормоны.
133. Гормоны гипофиза.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
РАЗДЕЛ 1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОХИМИИ	4
Работа 1. Колориметрический метод определения концентрации окрашенных веществ в растворах. Принцип и техника колориметрирования. Устройство и правила работы на КФК-2	4
РАЗДЕЛ 2. СОСТАВ И СВОЙСТВА БЕЛКОВ	11
2.1. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ	11
Работа 2. Цветные реакции на белки	11
Работа 3. Выделение белков из тканей и биологических жидкостей. Изучение состава протеинов	19
2.2. ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ	24
Работа 4. Растворимость и реакции осаждения белков	24
<i>Вопросы для самостоятельной подготовки</i>	29
РАЗДЕЛ 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ ...	31
Работа 5. Качественные реакции на продукты гидролиза нуклеопротеинов дрожжей	31
Работа 6. Выделение дезоксирибонуклеопротеина из селезенки	32
Работа 7. Количественное определение рибозы по методу Мейбаум	34
<i>Вопросы для самостоятельной подготовки</i>	35
РАЗДЕЛ 4. ФЕРМЕНТЫ	37
Работа 8. Ознакомление с действием некоторых ферментов	37
Работа 9. Изучение свойств ферментов, влияние на активность фермента реакции среды и температуры. Субстратная специфичность действия	39
Работа 10. Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови по методу Кинга	42
<i>Вопросы для самостоятельной подготовки</i>	44
РАЗДЕЛ 5. ВИТАМИНЫ	45
Работа 11. Качественные реакции на витамины	45
Работа 12. Количественное определение аскорбиновой кислоты в пищевых продуктах и моче	60
<i>Вопросы для самостоятельной подготовки</i>	64
РАЗДЕЛ 6. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ	66
6.1. ХИМИЯ И ОБМЕН УГЛЕВОДОВ	66
Работа 13. Ортолуидиновый метод определения глюкозы в крови	66
Работа 14. Глюкозооксидазный метод определения глюкозы	66

в биологических жидкостях	67
Работа 15. Количественное определение пировиноградной кислоты в крови модифицированным методом Умбрайта	70
<i>Вопросы для самостоятельной подготовки</i>	73
6.2. ХИМИЯ И ОБМЕН ЛИПИДОВ	74
Работа 16. Количественное определение холестерина в сыворотке крови методом Илька	74
Работа 17. Определение концентрации общего холестерина в сыворотке и плазме крови энзиматическим методом	76
Работа 18. Количественное определение холестерина липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови человека	78
Работа 19. Экспресс-метод определения содержания кетонных тел в крови, моче и молоке	80
<i>Вопросы для самостоятельной подготовки</i>	82
6.3. ХИМИЯ И ОБМЕН БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ	83
Работа 20. Количественное определение белка в сыворотке крови биуретовым методом	83
<i>Вопросы для самостоятельной подготовки</i>	86
6.4. ВОДНО-МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН	87
Работа 21. Количественное определение кальция в сыворотке крови по методу Ваарда	87
Работа 22. Определение неорганического фосфора в крови	89
РАЗДЕЛ 7. ГОРМОНЫ	91
Работа 23. Качественные реакции на гормоны	91
<i>Перечень названий рефератов по теме «Гормоны»</i>	101
<i>Вопросы для самостоятельной подготовки</i>	102
Приложения.....	104
Сроки и условия хранения исследуемой пробы при определении некоторых показателей крови.....	104
Таблица перевода основных биохимических показателей в систему СИ	105
Основные вопросы к экзаменационным билетам по биологической химии	106

Учебное издание

**РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

Методические указания к лабораторным работам и вопросы для
самостоятельной подготовки студентов 2-го курса эколого-
биологического факультета

Составители:

М. Н. Яковлева, канд. биол. наук;
В. В. Осташкова, канд. биол. наук;
Я. П. Нижник, канд. хим. наук.

Редактор Л. П. Соколова

Подписано в печать 10.11.07. Формат 60 x 84 /16. Бумага газетная.
Офсетная печать. 6 уч.- изд. л. Тираж 600 экз. Изд. № 261.

Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
ПЕТРОЗАВОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Отпечатано в издательстве Петр ГУ
185910, Петрозаводск, пр. Ленина, 33