ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра биологической химии

О.Н. Макурина, В.Г. Подковкин, Н.А. Кленова

ПРАКТИКУМ
по биологической химии

Издание 2-е, переработанное

Утверждено Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного пособия

Самара
Издательство «Самарский университет»
2006

УДК 577.1
ББК 28.072
М 178

Рецензент д-р мед. наук, проф. Л.Т. Волова

Макурина О.Н.

М 178 **Практикум по биологической химии:** учебное пособие / О.Н. Макурина, В.Г. Подковкин, Н.А. Кленова; Федеральное агентство по образованию. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2006 - 60 с.

Задачей данного пособия является знакомство студентов со свойствами аминокислот, белков, ферментов, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот; с некоторыми механизмами регуляции действия ферментов; с основными принципами обнаружения и методами количественного определения некоторых ферментативных активностей в биологических жидкостях.

Другая цель данных работ заключается в выработке практических навыков самостоятельного биохимического исследования и анализа полученных результатов, а также закрепление теоретических знаний по соответствующим разделам биохимии, чтобы уметь использовать эти знания для объяснения особенностей и биологического значения ферментативного катализа при последующем изучении обмена веществ и его регуляции.

Описанию практических работ предшествует краткое теоретическое введение. Перед каждым лабораторным занятием студентам предлагается ответить на все вопросы, рекомендованные к данной работе, что должно способствовать лучшему усвоению материала при самостоятельной подготовке студентов к лабораторным занятиям.

При подборе выполняемых работ уделено внимание доступности биологического материала, реактивов и приборов, необходимых для проведения занятий.

Пособие составлено в соответствии с программой по биохимии для специальности "Биология" для университетов и отражает методику преподавания биологической химии в Самарском государственном университете.

ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

При работе в биохимической лаборатории студент должен соблюдать следующие правила.

Приступая к работе, ознакомиться с правилами по технике безопасности. Работу проводить только в халатах; избегать резких движений и быстрого передвижения по лаборатории.

Не загромождать свое рабочее место оборудованием, не относящимся к выполняемой работе. Перед выполнением заданий подготовить рабочее место - расставить все необходимое в таком порядке, чтобы обеспечить быстрое и точное выполнение опытов.

Проверить чистоту посуды. Опыты проводить в строгом соответствии с описанием.

Прежде чем взять вещество для опыта, надо обратить внимание на этикетку, внимательно прочитать её.

Химические реактивы нельзя брать руками. Необходимо пользоваться специальными приспособлениями: шпателями, ложечками, лопаточками.

Запрещается пробовать на вкус или нюхать какие-либо вещества, пить воду из химической посуды.

При нагревании вещества или реакционной смеси необходимо выполнять следующие условия: а) не держать пробирку рукой, а пользоваться держателями; б) правильно держать пробирку - отверстие должно быть направлено в сторону от себя и окружающих; в), разогревание вести осторожно, слегка встряхивая содержимое пробирки.

Работу с ядовитыми и сильно пахнущими веществами, а также с летучими веществами, концентрированными щелочами и кислотами (особенно азотной, соляной, серной, уксусной) необходимо проводить только в вытяжном шкафу при работающей тяге. Поверхность вытяжных шкафов и пола, где проводятся работы с указанными выше веществами, должны быть покрыты кислотоупорными материалами.

Особую осторожность следует соблюдать при обращении с концентрированными кислотами, щелочами и огнеопасными веществами: а) кислоты и щелочи нельзя набирать в пипетку ртом - необходимо пользоваться цилиндром или пипеткой с грушей; б) нельзя выливать в раковину концентрированные растворы кислот и щелочей без предварительного их разбавления; в) при использовании огнеопасных веществ (эфир, спирт, бензин и др.), работу проводить вдали от нагревательных приборов и открытого пламени. ПОСПЕШНОСТЬ И НЕРЯШЛИВОСТЬ МОГУТ ПРИВЕСТИ К НЕСЧАСТНЫМ СЛУЧАЯМ!

При разбавлении концентрированных кислот, приготовлении или разогревании кислотных смесей используется только толстостенная или термически устойчивая химическая посуда.

При смешивании двух жидкостей - жидкость с большей плотностью приливают к жидкости с меньшей плотностью небольшими порциями при непрерывном перемешивании.

При работе на электроприборах необходимо убедиться в правильности их подключения к электросети, в наличии заземления металлических корпусов приборов, в отсутствии оголенных, токоведущих проводов и деталей на рабочем месте. Нельзя трогать и включать без разрешения преподавателя или лаборанта приборы и рубильник.

При нарушении нормальной работы приборов следует отключить их от сети и доложить преподавателю или лаборанту.

ЗАПРЕЩЕНО:

- включать в сеть незаземленные приборы;

-работать на неисправных приборах;

- касаться руками токопроводящих элементов, а также нагреваемых элементов электроплитки, сушильного шкафа, водяного термостата;

- трогать руками шнур питания включенного оборудования, выдергивать вилку из розетки за шнур питания;

- оставлять без присмотра горящие спиртовки, включенные электроприборы.

По окончании занятия - рабочее место привести в порядок и сдать лаборанту.

ПЕРВАЯ ПОМОЩЬ ПРИ ПОПАДАНИИ КИСЛОТ И ЩЕЛОЧЕЙ НА ОТКРЫТЫЕ УЧАСТКИ КОЖИ

При попадании кислот на открытые участки кожи необходимо быстро обмыть этот участок большим количеством проточной воды, а затем нейтрализовать 3%-ным раствором углекислой соды, обожженные места смазать мазью от ожогов или рыбьим жиром.

При попадании щелочей на незащищенные участки кожи необходимо быстро обмыть пораженные места большим количеством проточной воды, а затем нейтрализовать 1%-ным раствором уксусной или борной кислоты.

При попадании кислоты или щелочи в глаза необходимо немедленно промыть их большим количеством воды, раствором 1%-ной борной кислоты, сообщить о случившемся преподавателю и немедленно отправить пострадавшего к врачу.

ПЕРВАЯ ПОМОЩЬ ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГАХ И ПРИ ПОРАЖЕНИИ ЭЛЕКТРОТОКОМ

При загорании спирта, эфира или других легко воспламеняющихся веществ огонь нельзя тушить водой, а следует воспользоваться асбестовым покрывалом, песком или в случае большого пламени - огнетушителем.

При термических ожогах первой степени (покраснение и болезненность обожженного места) пораженный участок можно присыпать двууглекислым натрием или сделать примочку из этилового спирта. При более серьезных ожогах необходимо отправить пострадавшего к врачу.

При поражении электротоком необходимо освободить пострадавшего от тока, сняв напряжение выключателем или рубильником. Приступив к самостоятельному оказанию первой помощи, сообщить о случившемся преподавателю или лаборанту, чтобы обеспечить вызов врача.

Занятие 1. ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ

Исследование pH водных растворов аминокислот

В водных растворах аминокислоты диссоциируют с образованием двойного иона: карбоксильная группа теряет протон и заряжается отрицательно; а аминогруппа, принимая протон, заряжается положительно. Таким образом, заряд молекулы данной аминокислоты будет определяться способностью к диссоциации ее радикала (R).

Реактивы и оборудование

1. 0,1% растворы глицина; аспарагиновой кислоты; фенилаланина; триптофана; тирозина; аргинина; а-аланина; Р-аланина; гистидина; цистеина гидрохлорида; лизина; 5%-раствор глицина.

2. Биуретовый реактив (реактив Бенедикта) 17,3г цитрата натрия и 10 г карбоната натрия растворяют в 30 мл дистиллированной воды на водяной бане. Отдельно в 30 мл дистиллированной воды растворяют 1,73 г сульфата меди. Оба раствора сливают и общий объем доводят до 100 мл.

3. Нингидрин,0,5% раствор.

4. Азотная кислота конц.

5. Гидроксид натрия 10% и 0,4%) растворы.

6. Уксусная кислота ледяная.

7. Серная кислота, конц.

8. Ацетат свинца,5% раствор.

9. Реактив Миллона (готовят под тягой). В 57 мл концентрированной азотной кислоты растворяют 40 г ртути сначала на холоду, а затем слабо нагревая на водяной бане. Полученный раствор разбавляют 2 объемами воды, дают отстояться и сливают с осадка. Хранят во флаконе из темною стекла.

10. Реактив Фолина. В колбе вместимостью 1 л растворяют 1 г вольфрамата натрия и 20 г фосфорномолибденовой кислоты в 750 мл воды. Закрывают колбу пробкой с обратным холодильником и содержимое кипятят 10 ч; затем его охлаждают, переливают в мерную колбу и доводят объем до 1 л.

11. Фенолфталеин.

12. Метилоранж.

13. Формольная смесь.

Ход работы. В три пробирки внесите по 0,5 мл растворов аминокислот: в первую - раствор глицина 0,1%; во вторую - 0,1% раствор аспарагиновой кислоты; в третью - 0,1% раствор лизина. С помощью универсаль-

ного индикатора определите pH водных растворов данных аминокислот. Результаты занесите в таблицу:

Исследуемый раствор	Реакция среды
Раствор глицина	
Раствор аспарагиновой кислоты	
Раствор лизина	

Амфотерность растворов аминокислот

Образование аминокислотами двойного иона определяет возможность титрования их растворов как кислотой, так и щелочью, т.е. обусловливает амфотерность растворов аминокислот.

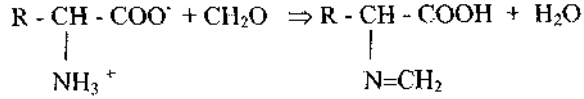
Ход работы. В четыре пробирки вносят: 1 и 2 по 0,5 мл 5% раствора глицина, в 3 и 4 по 0,5 мл дистиллированной воды. В 1 и 3 пробирки добавляют по 1 - 2 капли фенолфталеина. Во 2 и 4 - по 1 капле метилоранжа. В 3 пробирку вносят 1 каплю 0,4% раствора NaOH. Появляется малиновое окрашивание. Добавляют по каплям 0,4% NaOH в первую пробирку, добиваясь совпадения окраски в обеих пробирках. Количество добавленных капель подсчитывают. Чтобы объём жидкости был все время одинаков в процессе титрования щелочью содержимого первой пробирки, в третью пробирку добавляют столько же капель воды. В пробирки 2 и 4 вносят 1 каплю 0,4% раствора HC1. Титрование производят таким же образом, как и со щелочью.

Результаты занесите в таблицу и сделайте выводы.

Исследуемый материал	Количество 0,4% NaOH, пошедшее на титрование	Количество 0,4% HCI, пошедшее на титрование	Выводы
Раствор глицина			

Формольное титрование аминокислот

Используется для количественного определения карбоксильных групп. Формальдегид связывает H^+ аминогруппы, что не препятствует титрованию H^+ карбоксильных групп:



Ход определения. В пробирку внести 0,5 мл раствора глицина 5%, добавить I каплю фенолфталеина и по каплям 0,4% раствор едкого натра до слабо розовой окраски. Добавить 0,5 мл формольной смеси и встряхнуть. Затем добавить 0,4% раствор NaOH до появления ярко розовой окраски. Посчитать в каплях'или мл количество раствора NaOH, которое потребовалось для связывания карбоксильных групп.

Запишите в тетрадях химическую реакцию, на которой основан метод формольного титрования аминокислот и результат титрования: На титрование 0,5 мл 5% раствора глицина пошло X мл 0,4% раствора едкого натра.

Биуретовая реакция

Метод основан на способности пептидной группы белков и пептидов образовывать в щелочной среде с ионами Си комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей в исследуемой молекуле.

Биуретовая реакция положительна с белками и пептидами, имеющими не менее двух пептидных связей. Название реакции происходит от названия производного мочевины - биурета:

$$NH_2 - C - NH - C - NH_2$$
$$\quad\quad\quad

ки добавляют по 1 мл раствора NaOH 10% и по одной капле раствора реактива Бенедикта. После перемешивания наблюдайте появление окрашивания в пробирках. Данные занесите в таблицу.

Нингидриновая реакция на а-аминогруппу

Метод основан на взаимодействии нингидрина с а-аминогруппой аминокислот, пептидов, белков с образованием окрашенного комплекса синего или сине-фиолетового цвета.

При нагревании в присутствии нингидрина происходит окислительное дезаминирование альфа-аминогрупп, а молекула нингидрина при этом восстанавливается. Восстановленный нингидрин реагирует с аммиаком и другой молекулой окисленного нингидрина, в результате образуется окрашенное соединение (сине-фиолетовый комплекс Руэмана).

Пролин и оксипролин дают с нингидрином окрашенный продукт желтого цвета. Нингидриновая реакция может быть положительна с некоторыми аминами, амидами кислот и некоторыми другими соединениями.

Ход определения. В одну пробирку вносят 0,5 мл раствора белка, в другую 0,5 мл 1% раствора ос-аланина, в третью 0,5 мл 1% раствора р-аланина.

Добавляют в каждую пробирку по 2 капли раствора нингидрина 0,5%, нагревают до 70° в водяной бане и через 1-3 минуты наблюдают появление (или не появление) окрашивания. Результаты заносят в таблицу.

Ксантопротеиноеая реакция на ароматические кольца циклических аминокислот

Метод основан на способности аминокислот и аминокислотных остатков пептидов, белков, содержащих ароматическое кольцо, образовывать при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой динитропроизводные соединения желтого цвета. В щелочной среде они переходят в хиноидныс структуры, имеющие оранжевое окрашивание.

Ксантопротеиновая реакция характерна для фенилаланина, тирозина и триптофана, имеющих ароматическое кольцо. Ксантопротеиновая реакция положительна со многими ароматическими соединениями (бензол, фенол и др.).

Ход определения. В одну пробирку вносят 1 мл 2% раствора фенола, в другую 1 мл 0,5% раствора тирозина, в 3-ю - 1 мл раствора белка.

Во все пробирки добавляют по 3 капли концентрированной азотной кислоты, нагревают до кипения (осторожно!) и наблюдают появление и интенсивность окрашивания.

Содержимое пробирок охлаждают под струей воды, затем в каждую по каплям добавляют NaOH (10%), пока не начнется переход окраски. Данные занести в таблицу.

^> *Реакция Фолина*

Метод основан на применении реактива, сочетающего биуретовую реакцию с реакцией на ароматические аминокислотные остатки с появлением синего окрашивания.

Ход определения. В первую пробирку вносят 0,5 мл 2% раствора фенола, во вторую 0,5 мл раствора тирозина 0,1%, в третью 0,5 мл раствора белка. В каждую пробирку добавляют по 0,5 мл 10% раствора NaOH и по одной капле реактива Фолина. Интенсивность и цвет появившегося окрашивания отмечают в таблице.

№ п/п	Исследуемый материал	Реакция						
		V Биуретовая	Нингидриовая	Ксантопротеиновая	Фолина	Милона	Сакагучи	На серусодержащие АМК

Осаждение белка

Реактивы и оборудование. Раствор яичного белка; раствор яичного белка с NaCI; насыщенный раствор сернокислого аммония; насыщенный раствор хлористого натрия; размельченный порошок сернокислого аммония; концентрированные азотная, серная и соляная кислоты; реактивы для проведения биуретовой реакции; порошок хлористого натрия; этиловый спирт; ацетон; 0,1н. уксуснокислый натрий; 0,1 н. уксусная кислота, 1% раствор; раствор желатина, 1%; раствор фенолфталеина; едкий натр, 0,005н. раствор; 10% раствор едкого натра; 1% раствор соляной кислоты; 20% раствор нейтрального формалина; 10% уксусная кислота; 0,2 н. раствор едкого натра; 0,2н. раствор соляной кислоты.

Ход определения:

1 .Осаждение белка кипячением

Наливают в пробирку раствор белка, кипятят. Наблюдают выпадение осадка белка.

2. Влияние pH на осаждение белка

Наливают в 5 пробирок по 2 мл раствора белка:

а), содержимое первой пробирки нагревают до момента образования осадка белка, отмечают время образования осадка;

б) добавляют во вторую пробирку каплю 1 % уксусной кислоты. Нагревают вторую пробирку и замечают время образования осадка. Осадок должен образоваться быстрее, так как белок находится в изоэлектрической точке;

в) добавляют в третью пробирку 0,5 мл 10% уксусной кислоты и нагревают. Осадок не образуется даже при кипячении, так как дополнительные заряды способствуют повышению устойчивости молекулы белка в растворе;

г) добавляют в четвертую 0,5 мл 10% раствора уксусной кислоты, несколько капель насыщенного раствора хлористого натрия и нагревают. Замечают время образования осадка;

д) добавляют в пятую пробирку около 0,5 мл 10% раствора едкого натрия и нагревают. Осадок белка не образуется даже при кипячении.

Данные занесите в таблицу и дайте объяснение явлений, происходящих при выполнении действий, описанных в пункте *г.* и *д.*

№ п/п	Внесенные вещества	Время образования осадка	Вывод

Фракционирование белков с помощью сульфата аммония (высаливание)

Наливают в пробирку около 3 мл раствора яичного белка с хлористым натрием и прибавляют равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония. В условиях полунасыщения выпадают белки глобулины.

Отфильтруйте осадок глобулинов. Фильтрат используйте для выделения следующей группы белков. Для этого в фильтрат добавляйте тонко измельченный порошок сернокислого аммония до насыщения, т.е. до прекращения растворения. Выпадает осадок альбуминов. Отфильтруйте осадок альбуминов и с фильтратом проведите биуретовую реакцию на присутствие белков. Если выделение белков проведено качественно, реакция будет отрицательной.

Результаты оформите в виде таблицы:

Высаливающее вещество	Степень насыщения раствора сульфатом аммония	Осаждаемая фракция белков яичного белка

Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами

В три пробирки осторожно вливают приблизительно по 1 мл кислот: в первую соляной, во вторую - серной, в третью - азотной.

Осторожно наливают во все три пробирки приблизительно по 1 мл раствора белка. На .границе двух жидкостей наблюдается появление осадка белка в виде небольшого белого кольца.

Осторожно встряхивают каждую пробирку. Происходит растворение осадка белка в избытке серной и соляной кислот. В избытке азотной кислоты белок не растворяется.

Осаждение белка спиртом

Помещают в пробирку 1-2 мл водного раствора белка, прибавляют небольшое количество сухого хлористого натрия и взбалтывают.

В пробирку постепенно приливают несколько мл этилового спирта и сильно взбалтывают. Через несколько минут выпадает мелкий осадок белка.

Осаждение белка ацетоном

В пробирку вносят 1-2 мл раствора белка, добавляют столько же ацетона. Встряхивают, отмечают появление помутнения, указывающего на осаждение белка.

Определение изоэлектрической точки белка

Приготавливают серию из 6 пробирок, которые заполняют веществами по указанной схеме:

РАСТВОРЫ	№ пробирки					
	1	2	3	4	5	6
	Количество в мл					
CH_3COONa, 0,1н.	1	1	1	1	1	1
CH_3COOH, 0,1н.	0,12	0,25	0,5	1	2	-
CH_3COOH, 1н.	–	–	–	–	–	0,4
H_2O	1,88	1,75	1,5	1	-	1,6
Желатин, 1%	1	1	1	1	1	1

2. Перемешивают содержимое пробирок

3. Прибавляют в каждую пробирку по 2 мл этанола

4. Наблюдают помутнение проб и отмечают степень помутнения в пробах количеством плюсов. Если помутнения нет, ставится минус.

Результаты занесите в таблицу:

pH	Степень мутности раствора желатина		ИЭТ
	до добавления спирта	после добавления спирта	
5,6			
5,3			
5,0			
4,7			
4,4			
4,1			

Занятие № 3. ГИДРОЛИЗ БЕЛКА

Кислотный гидролиз простого белка

Реактивы. Концентрированная соляная кислота; Реактивы для проведения биуретовой реакции; Раствор яичного белка; Едкий натр, 0,005н раствор, 10%-ный раствор, 0,5н раствор; 1%-ный раствор фенолфталеина; 20%-ный раствор нейтрального формалина;]%-ный раствор соляной кислоты; Активированный уголь; Суспензия фосфата меди; Концентрированная уксусная кислота; 10%-ный раствор KI; 0,01н. раствор гипосульфита натрия Na_2S_2O3,' Крахмал.

Оборудование. Термостойкие колбы на 100-150 мл, закрытые пробкой с обратным холодильником; Колбочки на 30-50 мл; Пробирки, штативы для пробирок; Пипетки на 1 мл; 2 мл; 5 мл; Мерные цилиндры на 25 мл; Фильтры.

Проведение гидролиза белка

В термостойкую колбу отмеряют 20 мл раствора яичного белка и 5 мл концентрированной соляной кислоты. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником и кипятят на плитке в течение 45 мин. (с момента закипания) под тягой.

Открытие промежуточных продуктов распада белка

а) проведите биуретовую реакцию с исходным раствором белка.

В 0,5 мл раствора белка добавьте 1 мл 30%-ного раствора NaOH и 0,2мл реактива Бенедикта.

б) отберите пробу через 15 мин. гидролиза. В 0,5 мл гидролизата добавьте 1 мл 30%-ного раствора NaOH и 0,2мл реактива Бенедикта.

Проделайте то же самое с пробой, отобранной через 30 мин. и в конце гидролиза - через 45 мин.

Данные занесите в таблицу:

Время гидролиза, мин	0	15	30	45
Окраска				
Продукты реакции				

Определение карбоксильных и аминогрупп в растворе белка и гидролизате

Через 45 мин гидролиз прерывают. Пробку с холодильником удаляют, а в колбу всыпают (на кончике скальпеля) активированный уголь для обесцвечивания буроватого раствора и кипятят 5 минут. Затем гидролизат охлаждают, вливают в мерный цилиндр, доводят объем до 25 мл дистиллированной водой и фильтруют.

Титрование карбоксильных групп

Принцип метода заключается в блокировании аминогрупп формальдегидом, а свободные карбоксильные группы оттитровываются щелочью.

1. Титрование карбоксильных групп в растворе белка до гидролиза. Отмеряют в колбочку 1 мл раствора белка, добавляют 5 капель 20%-ного нейтрального раствора формалина. Титруют до устойчивой розовой окраски 0,005н. раствором едкого натра. Количество пошедшего на титрование едкого натра заносят в таблицу (см. ниже).

2. Титрование карбоксильных групп в гидролизате белка.

Для титрования отбирают 1,25 мл гидролизата (просветленного), что соответствует 1 мл раствора белка, добавляют 3 капли раствора фенолфталеина и нейтрализуют 10%-ным раствором NaOH до слабо розовой окраски (количество щелочи не учитывают). Если окраска становится ярко-красной, используют 1%-ный раствор соляной кислоты и 0,005н. NaOH для получения слабо розовой окраски. Затем добавляют 5 капель нейтрального раствора формалина и титруют 0,005Н NaOH до устойчивой розовой окраски. Количество NaOH, пошедшее на титрование вносят в таблицу.

Растворы	**Количество NaOH**	**Количество свободных карбоксильных групп**
Раствор белка		
Гидролизат белка		

Определение азота аминогрупп медным способом

Химизм процесса. При взаимодействии аминокислот с суспензией фосфата меди образуются окрашенные в синий цвет хорошо растворимые комплексные медные соли аминокислот.

Образующаяся также фосфорная кислота связывается боратным буфером и реакция идет до конца. В фильтрате после отделения фосфата меди остаются только медные соли аминокислот. По количеству меди, перешедшей в фильтрат можно определить содержание аминокислот. Добавление уксусной кислоты приводит к вытеснению аминокислот. А действие иодистоводородной кислоты на ион меди сопровождается восстановлением меди в и образованием свободного иода и уксусной кислоты. Так как иодид меди слаборастворим в кислой среде, то реакция идет до конца. Таким образом, количество выделившегося свободного иода эквивалентно количеству аминокислот. Свободный иод оттитровывается раствором гипосульфита.

Ход определения. В мерную колбу на 25 мл вносят 2 мл исследуемого раствора гидролизата белка, добавляют 2 капли фенолфталеина и по каплям 0,5 и. раствор гидроксида натрия до слабо розового окрашивания. После этого добавляют 10 мл суспензии фосфата меди и хорошо перемешивают. В контрольную колбу вносят 2 мл дистиллированной воды, добавляют 2 капли фенолфталеина и по каплям 0,005 н. раствор гидроксида натрия до слабо розового окрашивания. Затем вносят 10 мл суспензии фосфата меди и также перемешивают. В дальнейшем все последующие операции проводят аналогично с опытной и контрольной пробой. В случае исчезновения осадка в колбах следует добавить еще 5 мл суспензии. Растворы в колбах доводят до метки водой, тщательно перемешивают и фильтруют через плотный фильтр для удаления избытка фосфата меди. Фильтрат должен быть совершенно прозрачным. Из опытной и контрольной пробы берут по 10 мл в конические колбы для титрования, подкисляют 0,4 мл концентрированной уксусной кислоты, добавляют 7 мл 10%-ного раствора K1 и 2 капли раствора крахмала, выделившийся иод титруют 0,01H раствором гипосульфита натрия. Титрование гипосульфита продолжают до исчезновения синей окраски.

По уравнению реакции 0,5 M выделившегося иода соответствует I M меди, который в свою очередь эквивалентен 28 г аминного азота. 0,5 M иода реагирует с 1 г-экв гипосульфита натрия. Отсюда 1 мл 0,01 H раствора гипосульфита отвечает 0,28 мг аминного азота. Расчет содержания аминнного азота проводят по формуле:

$$x = \frac{(V - V_k) \times 0{,}28 \times 100}{2},$$

где x - количество аминного азота в мг на 1 г кислоты (или белка),
V - объем раствора гипосульфита в опытной пробе в мл,
V_k - объем раствора гипосульфита в контрольной пробе в мл.

РАЗДЕЛ 2. ФЕРМЕНТЫ

Занятие № 4. ЭНЗИМЫ, ИХ ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ С ФЕРМЕНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

1. Большинство ферментов являются лабильными белками. При переводе их в экстракт они лишаются своего естественного (в клетке) окружения и легко подвергаются денатурации и инактивации под влиянием различных факторов. В связи с этим при работе с ферментными препаратами и чистыми ферментами необходимо соблюдать целый ряд предосторожностей.

2. Химические реактивы, взятые для работы, должны быть высокой степени чистоты. В противном случае их перегоняют (жидкие) или перекристаллизовывают. Вода для приготовления реактивов, в большинстве случаев, должна быть бидистиллированная. Среда для извлечения не должна содержать примесей тяжелых металлов, которые инактивируют ферменты.

3. Химическая посуда (пипетки, пробирки, колбы и т. д.) должны быть идеально чистыми и не содержать даже следов поверхностно-активных веществ (детергентов). Поэтому посуду следует обрабатывать хромовой смесью (хромпиком) и тщательно продолжительно ополаскивать.

4. Следует также избегать загрязнения реакционного сосуда с субстратом следами ферментов (на кончике пипетки при работе с растворами ферментов) или ферментной пылью (при работе с сухими препаратами ферментов).

5. Следует избегать воздействия на энзимы высоких температур (если этого не требуется в эксперименте). Активность большинства энзимов хорошо сохраняется при температуре 0°С и ниже (в холодильнике, в холодной комнате, в бане с охладительными смесями).

6. Следует избегать воздействия на энзимы растворов с выраженной кислотной или щелочной реакцией, так как многие ферменты инактивируются в растворе с pH 5 или 9. Поэтому с помощью соответствующего буфера необходимо поддерживать оптимальное значение pH в достаточно узком диапазоне, необходимом для работы фермента. Контроль величины pH осуществляют с помощью pH-метра. При добавлении к раствору фермента кислот или щелочей необходимо большая осторожность - добавлять их следует медленно по стенке сосуда, при постоянном помешивании. В противном случае вокруг каждой капли щелочи или кислоты может возникать локальная зона опасного значения pH, в которой часть фермента будет инактивироваться.

7. Значительная часть ферментов подвергается денатурации на поверхности раздела сред. Поэтому важно избегать образования пены - переливать раствор из одного сосуда в другой следует по стенке сосуда, нельзя резко выдувать ферментный препарат из пипетки, а при использовании магнитной мешалки её лопасти должны быть глубоко погружены, чтобы поток жидкости был относительно спокойным.

8. При проведении ферментативной реакции необходимо в течение всего периода инкубации фермента и субстрата поддерживать постоянную температуру (в термостате или водяной бане). Для остановки реакции, пробирки с инкубационной смесью следует перенести в ледяную баню и быстро добавить охлажденный раствор, денатурирующий белок (например, ТХУ или NaOH) или соответствующее вещество, взаимодействующее с компонентами смеси (например, йод).

9. Сохранять ферменты длительной время можно в состоянии глубокого охлаждения (замораживания), в концентрированных растворах солей - в форме осажденных суспензий в насыщенном растворе сульфата аммония, а также при высушивании в условиях высокого вакуума при низкой температуре из замороженного состояния. Высушивание при комнатной температуре обычно приводит к полной инактивации энзимов.

Подтверждение белковой природы ферментного препарата амилазы слюны и инвертазы дрожжей

а-Амилаза (КФ 3.2.1.1) содержится в слюне человека и животных, в проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя, выделяется поджелудочной железой, а также плесневыми грибами и бактериями. Инвертаза или сахараза (КФ 3.2.1.26) - в большом количестве содержится в дрожжах и плесневых грибах, которые являются лучшим источником для получения ее препаратов.

Как указывалось выше, энзимы - это высокомолекулярные соединения, построенные из остатков аминокислот, соединенных пептидными связями. Поэтому подтверждение белковой природы ферментов можно проводить с помощью качественных реакций: с помощью цветных реакций (биуретовой или с реактивом Фолина) и реакцией осаждения при нагревании.

Материал исследования: амилаза слюны (получение ферментного препарата: ополаскивают рот дистиллированной водой, затем набирают 10-20 мл дистиллированной воды и выдерживают во рту в течение 2-3 мин, после чего сливают раствор в стакан); инвертаза (сахараза) дрожжей (приготовление см. в приложении).

Реактивы: NaOH, 10%-ный раствор; биуретовый реактив; спирт; дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1 мл; штатив для пипеток; колба; стаканчик; спиртовка; пробиркодержатели; фильтровальная бумага; спички.

Ход работы. 1.' В две пробирки вносят по 0,5 мл слюны, в третью - 0,5 мл диет, воды (контрольная проба на цвет реактивов).

2. Одну пробирку с амилазой тщательно нагревают над спиртовкой так, чтобы белок денатурировал. Затем пробирку осторожно охлаждают под струей холодной воды.

3. Во все три пробирки добавляют 1 мл 10% NaOH и 1-2 кап. 1% CUSO4; тщательно перемешивают и сравнивают окраску в первых двух пробирках с третьей контрольной.

Аналогичный опыт проводят с инвертазой (сахаразой) дрожжей.

Оформление работы. В рабочую тетрадь вносят таблицу с наблюдениями и делают выводы о химической природе изученных ферментных препаратах и влиянии температуры на стабильность структуры молекул энзима.

Форма записи:

Таблица

Биуретовая реакция с амилазой слюны и сахаразой дрожжей

№ проб	Проба, 0,5 мл	Окраска	Выводы
1	Амилаза		
2	Амилаза денатур.		
3	Сахараза		
4	Сахараза денатур.		
5	Дист. вода		

Влияние нативности структуры амилазы слюны и инвертазы дрожжей па их ферментативные активности

Амилаза слюны является эндоамилазой, поэтому гидролизуя кислородные мостики между остатками глюкозы, расщепляет крахмал на промежуточные продукты - декстрины - полисахариды различной молекулярной массы. Сначала образуются амилодекстрины, которые по своим свойствам и химическому строению приближаются к крахмалу. Затем амилодекстрины расщепляются на эритродекстрины - фрагменты меньшей молекулярной массы. Последние расщепляются на ахродекстрины и мальтодекстрины, которые по свойствам приближаются к мальтозе.

О ходе ферментативного гидролиза крахмала судят по изменению окраски, возникающей при добавлении раствора йода в инкубационную сре-

ду. При этом исходный субстрат и продукты реакции окрашиваются следующим образом:

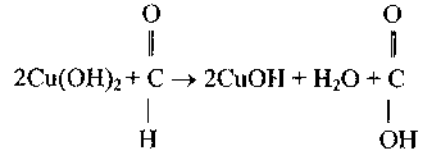
крахмал - синее окрашивание;
амилодекстрины - фиолетовое окрашивание;
эритродекстрины - красновато-коричневое окрашивание;
ахродекстрины]
мальтодекстрины } - слабо-желтая окраска р-ра йода
мальтоза J

Инвертаза или сахараза (КФ 3.2.1.26) - расщепляет дисахарид сахарозу с образованием моносахаридов: глюкозы и фруктозы, т.е. получается инвертный сахар. Моносахариды обладают восстанавливающей способностью, что можно обнаружить по пробе Троммера.

Реакция Троммера заключается в восстановлении сахарами окисной меди в закисную. При этом сначала сернокислая медь взаимодействует со щелочью с образованием голубого гидрата окиси меди:

$$CuSO_4 + 2NaOH \rightarrow Cu(OH)_2 + Na_2SO_4.$$

При нагревании голубой гидрат окиси меди восстанавливается в желтый гидрат закиси меди, а карбонильная группа сахара окисляется при этом в карбоксильную:



Желтый гидрат закиси меди при дальнейшем нагревании, теряя воду, переходит в красную закись меди:

$$2CuOH \rightarrow Cu_2O + H_2O.$$

Избыток сернокислой меди может замаскировать реакцию, так как гидрат окиси меди при нагревании теряет воду и дает черную окись меди:

$$Cu(OH)_2 \rightarrow CuO + H_2O.$$

Таким образом, расщепление крахмала амилазой можно наблюдать, используя реакцию с йодом, а расщепление сахарозы инвертазой дрожжей – с помощью реакции Троммера.

Материал исследования: амилаза слюны (приготовление см. выше); инвертаза дрожжей (приготовление см. в приложении).

Реактивы: крахмал, 1%-ный раствор; сахароза, 1%-ный раствор; I_2 KI (раствор Люголя – приготовление см. в приложении); NaOH, 10%-ный раствор; $CuSO_4$, 5%-ный раствор; спирт; дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1 и 2 мл; штатив для пипеток; колба; стаканчик; спиртовка; пробиркодержатели; фильтровальная бумага; спички; ледяная баня; термостат (37°С); кипящая баня; плитка.

Ход работы.

1. В две пробирки вносят по 0,5-1,0 мл слюны, в третью - 0,5-1,0 мл диет, воды (контрольная проба на цвет реактивов).

2. Одну пробирку с амилазой тщательно нагревают (см. п. 2 работы № 1).

3. Все три пробирки помещают в термостат на 37°С и через 3-5 мин в каждую пробирку добавляют по 1,0-2,0 мл 1% крахмала и сразу тщательно перемешивают *(для удобства в работе и точного учета времени протекания ферментативной реакции, субстрат следует вносить не одновременно во все пробирки, а с интервалом в 30-60 сек между ними).*

4. Через 10 мин пробирки помещают в ледяную баню *{также с выбранным вами интервалом времени),* добавляют в них 1 -2 кап. р-ра Люголя и тщательно перемешивают.

5. Отмечают степень окраски крахмала в опытных пробах и сравнивают с контрольной пробой.

Аналогичный опыт проводят с инвертазой дрожжей.

Ход работы.

1. В две пробирки вносят по 0,5-1,0 мл р-ра инвертазы, в третью - 0,5-1,0 мл диет, воды (контрольная проба на цвет реактивов).

2. Одну пробирку с инвертазой тщательно нагревают (см. п. 2 работы №1).

3. Все три пробирки помещают в термостат на 37°С и через 3-5 мин в каждую пробирку добавляют по 1,0-2,0 мл 1 % сахарозы и сразу тщательно перемешивают *(для удобства в работе и точного учета времени протекания ферментативной реакции, субстрат следует вносить не одно временно во все пробирки, а с интервалом в 30-60 сек между ними).*

4. Через 15 мин пробирки помещают в ледяную баню *(также с выбранным вами интервалом времени)* и из каждой пробы отбирают по 1,0 мл для реакции Троммера.

5. Для этого в каждую пробирку вносят по 1,5-2,0 мл 10% раствора NaOH, перемешивают и добавляют по каплям 5% раствор C11SO4 до появления неисчезающей мути (ОСТОРОЖНО! Избыток $CuS0_4$ может замаскировать реакцию).

6. В кипящей водяной бане нагревают содержимое пробирок. Появление желтого окрашивания (гидрат закиси меди), переходящего в красное (закись меди), указывает на присутствие продуктов гидролиза сахарозы.

7. Степень окраски в опытных пробах сравнивают с контрольной пробой.

Оформление работы. В рабочую тетрадь вносят таблицу с наблюдениями и делают выводы о ферментативной активности нативных и денатурированных энзимов.

Форма записи

Таблица

Ферментативная активность нативной и денатурированной амилазы слюны и инвертазы дрожжей

№ проб	Субстрат 2 мл	Проба, 1,0 мл	Темп. Инк. °С	Время инк, мин	РЕЗУЛЬТАТЫ	
					Реакции с йодом	Реакции Троммера
1	Крахмал	Амилаза	37	10		
2	Крахмал	Амилаза, денатурир.	37	10		
3	Крахмал	Дист.вода	37	10		
4	Сахароза	Инвертаза	37	10		
5	Сахароза	Инвертаза, денатурир.	37	10		
6	Сахароза	Дист.вода	37	10		

Выявление термостабильности амилазы слюны и инеертазы дрожжей

Материал исследования: амилаза слюны (приготовление см. выше).

Реактивы: крахмал, 1%-ный раствор; раствор Ь в KI (раствор Люголя - приготовление см. в приложении); дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1 и 2 мл; штатив для пипеток; колба; фильтровальная бумага; спички; ледяная баня; термостат (37°С); кипящая водяная баня.

Ход работы.

1. В пять пробирок вно,сят по 0,5-1,0 мл амилазы слюны, в шестую - 0,5-1,0 мл дистиллированной воды (контрольная проба на степень гидролиза крахмала при 100°С).

2. В пятую и шестую пробы добавляют по 1,0-2,0 мл 1% крахмала.

3. Замечая время и соблюдая удобный временной интервал, переносят пробирки в разные температурные условия. Одну пробирку помещают в баню со льдом (0-2°С); вторую - оставляют при комнатной температуре (20°С); третью - помещают в термостат (37°С); четвертую, пятую и шестую - в кипящую водяную баню (90-100°С).

4. Через 20-30 мин все пробирки (последовательно, соблюдая временной интервал) переносят в термостат на 37°С (ВНИМАНИЕ! Пробирки из кипящей водяной бани предварительно осторожно охлаждают под струей холодной воды).

5. Спустя 3-5 мин в каждую пробирку добавляют по 1,0-2,0 мл 1% крахмала и сразу тщательно перемешивают *(для удобства в работе и точного учета времени протекания ферментативной реакции, субстрат следует вносить не- одновременно во все пробирки, а с интервалом в 30-60 сек между ними).* Внимание! В пятой и шестой пробирках субстрат присутствует, и добавлять надо только 0,5-1 мл.

6. Через 10 мин пробирки помещают в ледяную баню *(также с выбранным вами интервалом времени),* добавляют в них 1-2 кап. раствора Люголя и тщательно перемешивают.

7. Отмечают степень окраски крахмала в опытных пробах и сравнивают между собой.

Аналогичный опыт можно проводить с инвертазой дрожжей, используя в качестве субстрата сахарозу и окрашивая продукты реакции с помощью пробы Троммера.

Оформление работы. В рабочую тетрадь вносят таблицу с наблюдениями и делают выводы о термостабильности амилазы слюны и о влиянии фермент-субстратного комплекса при воздействие высокой температуры на энзим.

Форма записи

Таблица

Влияние различных температур на фермептативную активность амилазы слюны

№ проб	Субстрат 2 мл	Проба, 1,0 мл	Темп. инк. °С	Время, мин	Окраска с йодом	Выводы
1	Крахмал	Амилаза (0-2°С)	37	10		
2	Крахмал	Амилаза (20°С)	37	10		
3	Крахмал	Амилаза (37°С)	37	10		
4	Крахмал	Амилаза (90°С)	37	10		
5	Крахмал 1 мл	Амилаза (90°С) + Крахмал, 1 мл	37	10		
6	Крахмал 1 мл	Дист. Вода (90°С)+ Крахмал, 1 мл	37	10		

Сравнительный гидролиз крахмала и сахарозы ферментными препаратами и соляной кислотой

Как указывалось выше, энзимы являются катализаторами и поэтому имеют много общих свойств с химическими, небиологическими катализаторами, но вместе с тем они обладают рядом специфических признаков, отражающих их биологическую природу. Скорость реакций, идущих в присутствии как биологических, так и неорганических катализаторов, возрастает с повышением температуры. Однако, во втором случае при комнатной температуре многие из реакций протекают чрезвычайно медленно и делаются заметными только при повышении температуры до 100°Сивыше.

Например, гидролиз гликозидных связей в полисахаридах может происходить не только ферментативным путем, но и при действии неорганических катализаторов, в частности кислот. В сказанном можно убедиться, исследуя гидролиз крахмала под действием амилазы слюны и HC1 при 0; 37 и 100°С.

Материал исследования: амилаза слюны.

Реактивы: крахмал, 1%-ный раствор; НО, 10%-ный раствор; раствор Люголя; дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1 и 2 мл; штатив для пипеток; колба; стаканчик; фильтровальная бумага; ледяная баня; термостат (37°С); кипящая водяная баня; плитка.

Ход работы.

1. В три пробирки вносят по 1,0 мл амилазы слюны, в три другие - по 1,0 мл 10% HC1. В седьмую пробирку вносят 1,0 мл дистиллированной воды (контрольная проба на изменение крахмала под действием 100°С; изменения крахмала при 0 и 37°С не столь существенные, поэтому для экономии времени эти контрольные пробы можно не ставить).

2. Берут две пробирки (одну с амилазой, другую - с HC1), добавляют в них по 2,0 мл 0,1‰ раствора крахмала (см. п.4 работы 2) помещают их в ледяную баню и замечают время.

3. В следующую пару пробирок (одна с амилазой, другая - с HC1) добавляют в них по 2,0 мл 0,1% раствора крахмала, тщательно перемешивают, помещают в термостат на 37°С и замечают время.

4. В оставшиеся 3 пробирки (одна с амилазой; другая - с HC1; третья - с дистиллированной водой) добавляют по 2,0 мл крахмала, перемешивают и, заметив время, помещают в кипящую водяную баню.

5. Через 15 мин (последовательно, соблюдая выбранный вами временной интервал) добавляют в каждую пробирку по 3-5 кап. раствора Люголя и отмечают окраску проб. ВНИМАНИЕ! Следует помнить, что пробирки из термостата сразу помещают в ледяную баню, а пробирки из ки-

пящей водяной бани, предварительно необходимо охладить иод струей холодной воды.

Оформление работы. В рабочую тетрадь вносят таблицу с наблюдениями и делают выводы: 1) о степени гидролиза субстрата под действием катализаторов при 0; 37 и 100°С, сравнивая их между собой; 2) о работе фермента при 0; 37/и 100°С; 3) о работе HCl при 0; 37 и 100°С; 4) действие какого катализатора больше зависит от температурного фактора.

Форма записи

Таблица

Степень гидролиза крахмала под действием биологического и неорганического катализаторов. Влияние температуры на протекание реакций

№ проб	Проба, 1,0 мл	Субстрат, 2 мл	Темп. инк. °С	Время, мин	Окраска с йодом	Выводы
1	Амилаза	Крахмал	0	15		
2	Амилаза	Крахмал	37	15		
3	Амилаза	Крахмал	100	15		
4	10% HCl	Крахмал	0	15		
5	10% HCl	Крахмал	37	15		
6	10% HCl	Крахмал	100	15		
7	Дист. вода	Крахмал	100	15		

Занятием 5. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Специфичность действия амилазы слюны и инвертазы *дрожжей*

Ферменты обладают специфичностью действия, т.е. действуют, как правило, на какой-либо один субстрат, ускоряя одну определенную реакцию. Так, например, амилаза (КФ 3.2.1.1 а-1,4-глюкан-4-глюкангидролаза) и сахараза или инвертаза (КФ 3.2.1.26 P-D-фруктофуранозид-фруктогидролаза) являются глюкозидазами и расщепляют глюкозидные связи в поли- и дисахаридах.

АМИЛАЗА с наибольшей скоростью гидролизует связи, расположенные внутри молекулы крахмала. Молекулы, имеющие меньше трёх ос-1,4-

глюкозидных связей, не гидролизуются амилазой, они гидролизуются с помощью экзогидролаз: мальтазы, сахаразы и др.

ИНВЕРТАЗА или САХАРАЗА расщепляет сахарозу на глюкозу и фруктозу по уравнению:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 2C_6H_{12}O_6.$$

Фермент гидролизует также рафинозу и катализирует также фруктотрансферазные реакции.

Специфичность действия ферментов в данной работе изучается на примере амилазы слюны и инвертазы, полученной из дрожжей.

Материал исследования: амилаза слюны (см. занятие №1); инвертаза (получение из дрожжей см. приложение).

Реактивы: крахмал, 0,1%-ный раствор, на 0,3%-ном растворе NaCI; сахароза,]%-ный раствор; раствор Люголя (приготовление см. в приложении); NaOH, 10%-ный раствор; $CuSO_4$, 5%-ный раствор; дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1 и 2 мл; штатив для пипеток; колба; стаканчик; фильтровальная бумага; ледяная баня; термостат (37°С); кипящая водяная баня; плитка.

Ход работы.

1. Берут 3 пробирки и вносят по 1,0-2,0 мл 0,1%-ного крахмала. В первую пробирку, перемешивая, вносят 0,5-1,0 мл слюны, во вторую 0,5-1,0 мл инвертазы, в третью - 0,5-1,0 мл дистиллированной воды (контрольная проба). Все пробирки помещают в термостат на 37°С.

2. Через 15 мин пробирки помещают в ледяную баню и добавляют в каждую по 1-2 кап. раствора Люголя, и тщательно перемешивают.

3. Отмечают степень окраски крахмала в опытных и контрольной пробах.

4. Берут следующие 3 пробирки и вносят по 1,0-2,0 мл 1%-ного раствора сахарозы. В первую пробирку, перемешивая, вносят 0,5-1,0 мл слюны, во вторую - 0,5-1,0 мл инвертазы, в третью - 0,5-1,0 мл дистиллированной воды (контрольная проба). Все пробирки помещают в термостат на 37°С.

5. Через 15 мин пробирки помещают в ледяную баню, добавляют щелочь и сернокислую медь, перемешивают и проводят реакцию Троммера (см. работу № 2).

6. Отмечают степень окраски в опытных и контрольной пробах.

Оформление работы. В рабочую тетрадь вносят таблицу с наблюдениями и делают выводы: 1) о степени гидролиза субстрата под действием различных катализаторов, сравнивая их между собой; 2) отмечают специфичность действия амилазы и инвертазы.

Форма записи

Таблица

Субстратная специфичность действия амилазы слюны и инвертазы дрожжей

№ проб	Субстрат, 2 мл	Проба, 1,0 мл	Темп. инк., °С	Время мин	Окраска с йодом	Выводы
1	Крахмал	Амилаза	37	15		
2	Крахмал	Амилаза	37	15		
3	Крахмал	Дист. вода	37	15		
4	Сахароза	Инвертаза	37	15		
5	Сахароза	Инвертаза	37	15		
6	Сахароза	Дист. вода	37	15		

Влияние температурного фактора ни активность *амилазы слюны*

Как указывалось ранее, а-амилаза широко распространенна в биологических объектах. Однако оказалось, что термолабильность а-амилаз различна. Наиболее лабильной, т.е. быстрее всего разрушается при нагревании, фибная а-амилаза. На втором месте стоит зерновая (фермент из проросшего зерна или солода) и наиболее устойчива к нафеванию - бактериальная а-амилаз.

В данной работе воздействие температурного фактора изучается на примере амилазы слюны. При этом следует особенно тщательно следить за температурными условиями при проведении реакции.

Материал исследования: амилаза слюны (приготовление см. занятие №1).

Реактивы: крахмал, 0,1%-ный раствор на 0,3%-ном растворе NaCl; раствор Люголя (приготовление см. в приложении); дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1 мл; штатив для пипеток; стаканчик; колба; фильтровальная бумага; ледяная баня; термостат (37°С); кипящая водяная баня, плитка; ФЭК; кюветы с толщиной слоя 1 см.

Ход работы.

1. **В** пять пробирок наливают по 0,5-1,0 мл 0,1%-ного р-ра крахмала. Ещё в четыре пробирки наливают по 0,5-1,0 мл раствора амилазы слюны, а в пятую - 0,5-1,0 мл дистиллированной воды (контроль).

2. Первую пару пробирок (одна с ферментом, другая - с крахмалом) помещают в ледяную баню. Вторую пару оставляют стоять при комнатной температуре. Третью пару пробирок помещают в термостат на 37°С. Четвертую пару и пятую (контрольную) - помещают в кипящую водяную баню.

3. Через 5-10 мин содержимое каждой пары пробирок сливают вместе, тщательно перемешивают.

4. Через 15 мин пробирки помещают в ледяную баню и добавляют в каждую по 3-4 кап. раствора Люголя и тщательно перемешивают.

5. Отмечают степень окраски крахмала в опытных и контрольной пробах. Можно измерить оптическую плотность проб на ФЭКе при 590 нм.

Оформление работы. Полученные результаты записывают в таблицу и строят график, откладывая на оси абсцисс значения температуры, а на оси ординат - значения оптической плотности полученных растворов. Делают выводы о характере влияния температуры на активность амилазы. Отмечают оптимальные значения температуры для амилазы. Сравнивают результаты, полученные с разными образцами слюны.

Форма записи

Таблица

Влияние температуры на активность амилазы

№ проб	Проба, 0,5-1,0 мл	Субстрат, 0,5-1,0 мл.	Темп. инк. °С	Время, мин	Окраска с йодом, OD	Выводы
1	Амилаза	Крахмал	0	15		
2	Амилаза	Крахмал	20	15		
3	Амилаза	Крахмал	37	15		
4	Амилаза	Крахмал	100	15		
5	Дист. вода	Крахмал	100	15		

Определение оптимального значения pH для действия амилазы слюны

Ферменты, являясь белками, характеризуются наличием заряда, величина которого зависит от pH раствора. В сильнокислой среде ферменты могут приобрести положительный заряд, в сильнощелочной среде - отрицательный. Все это, как указывалось выше, введет к изменению физико-химических и биологических свойств ферментов.

В данной работе воздействие pH изучается на примере амилазы слюны. При этом следует особенно тщательно приготовить ряд растворов с различными значениями pH, добавить к ним субстрат и пробу, содержащую фермент.

Материал исследования: амилаза слюны (приготовление см. занятие №4).

Реактивы: крахмал, 1%-ный раствор на 0,3%-ном растворе NaCl; двузамещённый фосфат натрия, 0,2 М раствор (приготовление см. в приложении); лимонная кислота, 0,1 М раствор (приготовление см. в приложении); раствор Люголя (приготовление см. в приложении); дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1мл; штатив для пипеток; колба; стаканчик; фильтровальная бумага; ледяная баня; термостат (37°С); ФЭК; кюветы с толщиной слоя 1 см.

Ход работы.

1. Берут 6 пробирок и тщательно приготавливают ряд растворов с различными значениями pH. Для этого в пробирки вносят растворы с фосфатом натрия и лимонной кислотой в количествах, указанных в таблице.

Таблица

0,1 М фосфатно-цитратный буфер, pH 5,0-8,0

Величина pH	0,2 М Na_2HPO_4, мл	0,1 М лимонная к-та, мл
5,0	0,50	0,50
5,5	0,58	0,42
6,4	0,69	0,31
6,8	0,77	0,23
7,2	0,87	0,13
8,0	0,97	0,03

2. Затем в каждую пробирку вносят по 1,0 мл крахмала и 0,5 мл слюны. Пробирки тщательно перемешивают и помещают в термостат на 37°С.

3. Через 10 мин отбирают каплю раствора из пробирки № 4 на предметное стекло и добавляют каплю раствора Люголя. Отмечают изменение окраски. Как только гидролиз в этой пробе закончится, опыт прекращают.

4. Пробирки помещают в ледяную баню и добавляют в каждую по 2-3 кап. р-ра Люголя.

5. Отмечают степень окраски крахмала в пробах. Измеряют оптическую плотность проб на ФЭКе при 590 нм.

Оформление работы. Полученные результаты записывают в таблицу и строят график, откладывая на оси абсцисс значения pH, а на оси ординат - значения оптической плотности полученных растворов. Делают выводы о характере влияния pH на активность амилазы. Отмечают оптимальные значения pH для амилазы. Сравнивают результаты, полученные с разными образцами слюны.

Форма записи

Таблица

Влияние величины pH среды на активность амилазы слюны

№ проб	Проба, 0,5 мл	Субстрат, 1,0 мл	PH	Время, мин	Окраска с йодом, OD	Выводы
1	Амилаза	Крахмал	5,0	10		
2	Амилаза	Крахмал	5,5	10		
3	Амилаза	Крахмал	6,4	10		
4	Амилаза	Крахмал	6,8	10		
5	Амилаза	Крахмал	7,2	10		
6	Амилаза	Крахмал	8,0	10		

Занятие №6. ДЕЙСТВИЕ АКТИВАТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА НА СКОРОСТЬ РЕАКЦИИ

Действие активаторов и ингибиторов на ферментативную активность амилазы слюны

Помимо температуры и pH, большое влияние на активность ферментов оказывают активаторы и ингибиторы - ионы металлов или органические вещества, иногда довольно сложного состава.

а-амилаза (КФ 3.2.1.1) - это металлоэнзим. Характерной особенностью всех а -амилаз является наличие в них по крайней мере одного моля прочно связанного кальция на моль фермента. Роль кальция заключается в стабилизации вторичной и третичной структуры молекулы амилазы, обеспечивая ее каталитическую активность и вместе с тем, предохраняя фермент от действия протеолитических ферментов. Но а-амилаза - это диссоциирующий энзим, от которого легко отщепляется ион кальция. Например, обработка фермента этилендиаминтетраацетатом, связывающим кальций, приводит к его инактивации. Активатором амилазы является хлорид натрия, ингибитором может-выступать и сульфат меди.

Материал исследования: амилаза слюны (приготовление см. занятие №4).

Реактивы: крахмал, 0,1%-ный раствор на 0,3%-ном растворе NaCl; раствор Люголя (приготовление см. в приложении); NaCl, 1%-ный раствор; этилендиаминтетраацетат, 1%-ный раствор; дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1мл; штатив для пипеток; колба; стаканчик; предметное стекло; фильтровальная бумага; ледяная баня; термостат (37°С).

Ход работы.

1. В три пробирки наливают по 1,0 мл раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 0,25 мл раствора NaCl, во вторую 0,25 мл раствора $CuS0_4$, в третью - 0,25 мл дистиллированной воды (контроль).

2. Во все пробирки вносят по 0,5 мл амилазы слюны и помещают в термостат на 37°С.

3. Через 3-5 мин из каждой пробирки отбирают 1-2 капли пробы на предметное стекло, добавляют каплю раствора Люголя и устанавливают степень гидролиза крахмала в разных вариантах опыта. Как только гидролиз в первой пробе закончится, опыт прекращают.

4. Пробирки помещают в ледяную баню и добавляют в каждую по 3-4 кап. раствора Люголя и тщательно перемешивают.

5. Отмечают степень окраски крахмала в опытных и контрольной пробах.

Оформление работы. Полученные результаты записывают в табл. 3.10. Делают выводы о характере влияния хлорида натрия и сульфата меди на активность амилазы. Сравнивают результаты, полученные с разными образцами слюны.

Форма записи

Таблица

Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны

№ проб	Проба, 0,5 мл	Субстрат, 1,0 мл	Темп. инк °С	Время мин	Окраска с йодом	Выводы
1	Амилаза	Крахмал + 1% NaCl	37	10-15		
2	Амилаза	Крахмал + 1% ЭДТА	37	10-15		
3	Амилаза	Крахмал + Дист. вода	37	10-15		

Влияние концентрации амилазы слюны на скорость ферментативного гидролиза крахмала

Материал исследования: амилаза слюны (приготовление см. занятие №4).

Реактивы: крахмал, 0,1%-иый раствор на 0,3%-ном растворе NaCl; раствор Люголя (приготовление см. в приложении); дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1 и 5мл; штатив для пипеток; колба; стаканчик; предметное стекло; фильтровальная бумага; ледяная баня; термостат (37°С); ФЭК; кюветы с толщиной слоя 1 см.

Ход работы.

1. Берут 9 пробирок и тщательно приготавливают ряд биохимического разведения ферментного препарата. Для этого в первую пробирку вносят 4,5 мл диет, воды, а в остальные - по 1,0 мл дистиллированной воды. В первую пробирку добавляют 0,5 мл исходного раствора амилазы (разведение **1:10),** тщательно перемешивают (попеременно втягивая и выпуская раствор в пипетку). Затем переносят 1,0 мл полученного раствора во вторую пробирку (разведение 1:20), тщательно перемешивают (как указано выше) и переносят 1,0 мл в следующую пробирку с водой (разведение 1:40) и т.д. Из первой и последней пробирок в работу берут только по 1,0 мл полученного раствора, т. е. во всех исследуемых пробах количество ферментного препарата должно содержаться по 1,0 мл.

2. Постановку опыта проводят в соответствии со схемой представленной в табл. 3.П

3. В каждую пробирку вносят по 1,0 мл крахмала. ВНИМАНИЕ! Начинать вносить субстрат лучше с последней пробирки с удобным для вас интервалом. Пробирки тщательно перемешивают и помещают в термостат на 37°С.

4. Через 10-15 мин пробирки помещают в ледяную баню и добавляют в каждую по 1 -2 кап. р-ра Люголя.

5. Измеряют оптическую плотность проб на ФЭКе при 590 нм, полученные результаты записывают в таблицу.

Оформление работы. На основании данных таблицы строят график, откладывая на оси абсцисс степень разведения ферментного препарата, а на оси ординат - значения оптической плотности полученных растворов. Делают выводы о характере влияния концентрации фермента на степень гидролиза субстрата. Отмечают оптимальное разведение фермента для проявления максимальной активности амилазы слюны в данных условиях.

Форма записи

Таблица

Степень гидролиза крахмала под действием различной концентрации амилазы слюны

№ проб	Проба, 1,0 мл	Субстрат, 2,0 мл	Т. инк. °С	Время, мин	Окраска с йодом, OD	Выводы
1	Амилаза, исход. р-р	Крахмал	37	15		
2	Амилаза, 1: 10	Крахмал	37	15		
3	Амилаза, 1: 20	Крахмал	37	15		
4	Амилаза, 1: 40	Крахмал	37	15		
5	Амилаза, 1: 80	Крахмал	37	15		
6	Амилаза, 1: 160	Крахмал	37	15		
7	Амилаза, 1: 320	Крахмал	37	15		
8	Амилаза, 1: 640	Крахмал	37	15		
9	Дист. вода	Крахмал	37	15		

Открытие дегидрогеназ в сыром молоке и мышцах

Суть данного метода заключается в восстановлении окисленного индикатора, который при этом обесцвечивается:

Если бесцветный раствор метиленового синего встряхнуть на воздухе, то раствор вновь приобретает синий цвет:

$$МС \cdot H_2 + O_2 \rightarrow МС + H_2O_2.$$

Материал исследования: адьдегидоксидаза (КФ 1.2.3.1 альдегид: 0_2-оксидоредуктаза) в молоке, сукцинатдегидрогеназная активность в мышечном гомогенате.

Реактивы: 0,4%-ный раствор формальдегида (приготовление см. в приложении); янтарная кислота, 0,1н раствор; метиленовый синий, 0,01%-ный раствор; фосфатный буфер pH 6,8 (приготовление см. в приложении); вазелиновое масло дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1 и 5мл; штатив для пипеток; колба; фильтровальная бумага; пробиркодержатель; спиртовка; ледяная баня; термостат (37°С).

Ход работы.

В три пробирки наливают по 2,5 мл свежего коровьего молока.

Первую пробирку кипятят в течение 2-3 мин и остужают (контрольная проба).

В первую и вторую пробирку добавляют по 1,0 мл 0,4%-ный р-р формальдегида и тщательно перемешивают, в третью пробирку добавляют 1,0 мл диет, воды (вторая контрольная проба).

4. Затем во все три пробирки приливают по 0,5 мл 0,01% р-ра метиленового синего.

Содержимое пробирок тщательно перемешивают и заливают в каждую по 3-4 кап. вазелинового масла для предохранения жидкости от соприкосновения с кислородом воздуха.

5. Пробы помещают в термостат на 37°С.

6. Через 10 минут во второй пробирке можно наблюдать обесцвечивание р-ра метиленового синего за счет образования его восстановленной формы.

7. Если эту пробу встряхнуть на воздухе, то р-р вновь приобретает синий цвет.

Аналогичный опыт можно проделать с мышечным гомогенатом, используя в качестве субстрата янтарную кислоту.

Ход работы.

В три пробирки помещают по 100 мг мышечной кашицы и приливают по 1,0 мл фосфатного буфера, pH 6,8.

2. Первую пробирку кипятят в течение 2-3 мин и остужают (контрольная проба).

3. В первую и вторую пробирку добавляют по 2,0 мл 0,1н раствора янтарной кислоты и тщательно перемешивают, в третью пробирку добавляют 2,0 мл дистиллированной воды (вторая контрольная проба).

4. Затем во все три пробирки приливают по 0,5 мл 0,01% раствора метиленового синего.

Содержимое пробирок тщательно перемешивают и заливают в каждую по 3-4 кап. вазелинового,масла для предохранения жидкости от соприкосновения с кислородом воздуха

5. Пробы и помещают в термостат на 37°С.

6. Через 10 минут во второй пробирке можно наблюдать обесцвечивание р-ра метиленового синего за счет образования его восстановленной формы

7. Если эту пробу встряхнуть на воздухе, то раствор вновь приобретает синий цвет.

Оформление работы. Полученные результаты заносят в таблицу и записывают уравнение реакций, в которых участвуют данные ферменты, отмечают оптимальное условия для их определения. Делают выводы о характере катализируемых реакций и к какому классу относятся исследуемые энзимы, объясняют почему определение активности данных ферментов требует анаэробных условий.

Форма записи

Таблица

Выявление дегидрогеназ в биологическом материале

№ проб	Проба, 1,0 мл	Субстрат, 2,0 мл	Т.инк. °С	Окраска метил. синий	Выводы
1	Молоко, нагрет.	Формальд.	37		
2	Молоко	Формальд.	37		
3	Молоко	Дист.вода	37		
4	Гомогенат, нагрет.	Сукцинат	37		
5	Гомогенат	Сукцинат	37		
6	Гомогенат	Дист.вода	37		

Занятие № 7. **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ**

Количественное определение активности амилазы слюны по методу Вольгемута

В организме человека амилаза вырабатывается в поджелудочной железе, околоушных железах и в слизистой тонкого кишечника. В крови выявляются преимущественно 2 типа амилазы: панкреатическая и слюнная. У здорового человека количество панкреатической и слюнной амилазы примерно одинаково.

Метод определения амилазной активности по Волыемуту относится к "пороговым". Он основан на определении минимального "порогового" количества фермента, которое способно при определённых условиях расщепить 1 мл 0,1 % раствора крахмала. Это минимальное количество фермента принимают за единицу амилазной активности.

Материал исследования: амилаза слюны (слюну собирают в пробирку и разводят в 10 раз).

Реактивы: крахмал, 0,1%-ный раствор; раствор Люголя (приготовление см. в приложении); дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1 и 2 мл; штатив для пипеток; колба; стаканчик; фильтровальная бумага; термостат (38°С).

Ход работы.

1. В 10-ти пробирках готовят ряд разведений слюны: для этого используется исходный раствор слюны, разведенный в 10 раз. Разведение проводят как описано в работе № 11. Из десятой пробирки 1 мл пробы выливают, таким образом, все пробы должны содержать по 1,0 мл исследуемого раствора.

2. Во все пробы добавляют по 2,0 мл крахмала (ВНИМАНИЕ! Добавление крахмала рекомендуется начинать с пробирки № 10) и помещают в термостат при 38°С на 30 мин.

3. Затем в пробирки добавляют по 1-2 кап. р-ра Люголя и отмечают то максимальное разведение слюны, при котором произошло полное расщепление крахмала.

4. Зная разведение слюны и количество добавленного крахмала, вычисляют сколько крахмала мог бы расщепить 1 мл неразведенной слюны.

Полученную величину обозначают А 38/30 мин, где 38°С - температура водяной бани, а 30 мин - время инкубации в термостате.

Пример расчета. Расщепление крахмала произошло в пробирках № 1-4, помня, что слюна перед опытом была разведена в 10 раз и, что в пробирке № 4 она разведена ещё в 16 раз, то общее разведение слюны составит 1: 160. Составляем пропорцию: если 1/160 мл слюны расщепляет 2 мл крахмала, то 1,0 мл не разведенной слюны смог бы расщепить Х мл субстрата, откуда:

$$X = \frac{2 \cdot 160}{1} = 320,0$$

Таким образом, активность амилазы, определяемая при 38°С в течение 30 мин, составляет 320 ед., т.е. А 38730 = 320ед.

В норме амилазная активность слюны у человека по Волыемуту варьирует в пределах 160-320 ед.

Оформление работы. В рабочую тетрадь наблюдения вносят в таблицу и подсчитывают амилазное число. Сравнивают результаты, полученные с разными образцами слюны.

Форма записи

Таблица

Определение активности амилазы слюны по Вольгемуту

№ проб	Проба, 2,0 мл	Субстрат, 2 мл	Темп. инкуб. °С	Время, мин	Окраска с йодом	Выводы
1	Амилаза, 1: 20	Крахмал	38	30		
2	Амилаза, 1: 40	Крахмал	38	30		
3	Амилаза, 1: 80	Крахмал	38	30		
4	Амилаза, 1: 160	Крахмал	38	30		
5	Амилаза, 1: 320	Крахмал	38	30		
6	Амилаза, 1: 640	Крахмал	38	30		
7	Амилаза, 1: 1280	Крахмал	38	30		
8	Амилаза, 1: 2560	Крахмал	38	30		
9	Амилаза, 1: 5200	Крахмал	38	30		
10	Амилаза, 1:14000	Крахмал	38	30		

Количественное определение активности катализы крови по Баху и Зубковой

Метод основан на способности каталазы крови (КФ 1.11.1.6), содержащейся в пероксисомах клеток тканей, а также в эритроцитах крови, разлагать перекись водорода с образованием воды и кислорода по уравнению:

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{каталаза}} 2H_2O + O_2$$

Каталаза - сложный фермент, состоит из четырех субъединиц, каждая из которых связана с гемом. Каталаза - "скоростной фермент", одна её молекула разлагает до 40 тыс. молекул H_2O_2 в одну секунду. Каталаза утилизирует образующуюся H_2O_2 в клетках для окисления разнообразных веществ, в том числе фенолов, муравьиной кислоты, формальдегида и этанола с помощью "переокислительной" реакции:

$$H_2O_2 + P\ H_2 \longrightarrow P + 2\ H_2O.$$

Указанная реакция - спасательный механизм, предотвращающий опасное накопление в организме сильного окислителя H_2O_2. Пероксисомы клеток печени и почек играют важную роль в обезвреживании различных веществ. Например, половина употребляемого этанола окисляется в орга-

низме до ацетальдегида таким способом. Каталаза ингибируется при отравлении фосфором, мышьяком, ртутью и другими веществами.

Материал исследования: каталаза крови (свежая кровь).

Реактивы: перекись водорода, 1%-ный раствор (или 0,29 М); серная кислота, 10%-ныи,раствор (1,02 М); перманганат калия, 0,1 н раствор (готовить из фиксанала за 10 дней); азида натрия, 1%-ный раствор; дистиллированная вода.

Оборудование: штатив; пробирки; пипетки на 1, 2 и 10мл; штатив для пипеток; колба; фильтровальная бумага; термостат (37°С); мерные колбы на 100 мл; конические колбы; электрическая плитка, титровальпая установка.

Ход работы

1. Наливают около 10 мл дистиллированной воды в мерную колбу на 100 мл.

2. Вносят микропипеткой 0,1 мл исследуемой крови, предварительно обтерев кончик капилляра от приставшей снаружи крови. Пипетку промывают путем всасывания и выпускания обратно жидкости из мерной колбы.

3. Доливают мерную колбу водой до метки и замечают время, когда кровь была разведена. Получается так называемый основной раствор крови (разведенный в 1000 раз), который используют для определения каталазного числа.

4. В две конические колбы наливают по 7,0 мл дистиллированной воды и по 1,0 мл разведенной в 1000 раз крови (0,1 мл крови разведением в мерной колбе дистиллированной, водой до 100 мл).

5. Содержимое одной колбы кипятят 5 мин для инактивации каталазы.

6. В каждую колбу добавляют точно по 2,0 мл 1% р-ра перекиси водорода и оставляют при комнатной температуре на 30 мин.

7. В каждую колбу приливают по 5,0 мл 10% р-ра серной кислоты (для остановки реакции) и титруют содержимое в колбах 0,1 М р-ром перманганата калия до розового окрашивания.

8. Рассчитывают активность каталазы крови.

Пример расчета активности ферментного препарата.

Активность каталазы крови рассчитывают исходя из того, что на титрование в контрольной колбе пойдет больше раствора перманганата калия, чем в опыте. Следует отметить, что грамм-эквивалент $Нг0_2$ равен 17. Следовательно, 1 мл 0,1 н р-ра H2O2 содержит 1,7 мг $Н_20_2$, который эквивалентен 1 мл 0,1 мл 0,1 н р-ра перманганата калия. Далее, полученную разность между контролем и опытом, умножают на 1,7 и вначале получают каталазное число. Это каталазное число умножают на коэффициент 0,59 и получают величину активности каталазы крови в нМоль/ч-л. В норме активность каталазы крови человека принята равной 7-13 нМоль/ч-л.

РАЗДЕЛ 3. УГЛЕВОДЫ

Занятие №8. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА УГЛЕВОДЫ

Моносахариды

Благодаря наличию свободной кетонной или альдегидной группировки, моносахариды способны окисляться до соответствующих кислот, одновременно восстанавливая соли металлов. Это свойство используется для ряда качественных и количественных реакций.

Гексозы

Реакция Троммера

Растворы гексоз, например, глюкозы и фруктозы, в щелочной среде восстанавливают при нагревании оксид меди (II) в гемиоксид меди, а сами окисляется до альдоновых кислот. Эту реакцию для глюкозы в общем виде можно представить уравнениями:

$$CH_2OH(CHOH)_4COH + 2CuS0_4 + 5NaOH => CH_2OH(CHOH)_4COONa + +2CuOH + 2Na_2S0_4 + 2H_20$$

$$2CuOH => Cu_20 + H_20$$

Материалы и реактивы. Раствор глюкозы, 5%-й; раствор гидроксида натрия, 5%-й; раствор сульфата меди, 5%-й.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки, пипетки градуированные, капельницы, штатив для пробирок, спиртовка.

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

Реакция Фелинга

В реактиве Фелинга ионы меди (II) находятся в виде комплексного соединения с тартратами. Механизм реакции гексоз (и всех редуцирующих углеводов) с реактивом Фелинга такой же, как и в реакции Троммера. Преимуществом реактива Фелинга является то, что медь при избытке реактива не выпадает

в виде окиси меди (II). Дисахариды и полисахариды взаимодействуют с реактивом Фелинга после кипячения с минеральными кислотами.

Материалы и реактивы. Раствор глюкозы, 5 *%;* реактив Фелинга, состоящий из двух растворов. Для приготовления первого раствора 200 г сегнетовой соли и 150 г гидроксида натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят; объем до I л. Для приготовления второго 40 г перекристаллизованного сульфида меди растворяют в дистиллированной воде до объема 1 л. Равные объемы первого и второго растворов смешивают перед работой.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки, пипетки градуированные, штатив для пробирок, спиртовка.

Ход работы. В пробирку вносят 1 мл раствора глюкозы, 1 мл реактива Фелинга. Смесь перемешивают и нагревают в пламени спиртовки до кипения. Наблюдают образование красного осадка гемиоксида меди.

Пентозы и их свойства

Реакция дезоксипентоз с дифеничамином

При нагревании 2-дезоксипентоз в кислой среде образуется фурфуроловый спирт, оксилевулиновый альдегид и сходные хромогены, которые, конденсируясь с дифениламином, образуют соединения, окрашенные в синий цвет.

Материалы и реактивы. Раствор дезоксирибозы, 0.2%-й; раствор дифениламина, 1 %-й.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки химические, штатив для пробирок, водяная баня, часы.

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл раствора дезоксирибозы и 1 мл раствора дифениламина, перемешивают и кипятят 10 минут. Наблюдают образование соединений, окрашенных в синий цвет.

Реакция Подобедова-Мильша с а-нафтолом и тимолом

При взаимодействии концентрированней серной или соляной кислот с пентозами (например, рибозой) происходит дегидратация пентоз и образование из них фурфурола (или оксиметилфурфурола). Эти соединения, вступая в реакцию с а-нафтолом и тимолом, образуют продукты конденсации красного цвета.

Материалы и реактивы. Концентрированная серная кислота; 0,1 % раствор рибозы, 1 %-е спиртовые растворы а-нафтола и тимола.

Оборудование. Пробирки, пипетки, штатив для пробирок.

Ход работы. В две пробирки вносят по 5 мл раствора рибозы. В одну из них добавляют также 2 мл раствора а-нафтола, а в другую - 2 мл раствора тимола. Затем в обе пробирки осторожно по стенке пробирок добав-

ляют по 3 мл концентрированной серной кислоты, которая опускается на дно пробирок. На дне или же на границе раздела жидкостей образуются красные или фиолетово-красные кольца.

Дисахариды

Редуцирующие дисахариды (например, лактоза и мальтоза) способны окисляться до соответствующих кислот, восстанавливать ионы металлов, участвуя в реакциях, характерных для моносахаридов. Однако нередуцирующие дисахариды (например, сахароза) в такие реакции не вступают. Наиболее широко для обнаружения подобных дисахаридов используют методы, в основе которых лежит гидролиз дисахаридов до моносахаридов с последующим обнаружением продуктов гидролиза - моносахаридов.

Восстанавливающая способность лактозы и мальтозы

Благодаря наличию свободной атьдегидной группы в молекуле лактозы (в остатке глюкозы) и мальтозы (у второго остатка глюкозы) эти дисахариды обладают редуцирующими свойствами и способны участвовать в реакциях восстановления. В частности, мальтоза и лактоза дают положительную реакцию Троммера (см. раздел гексозы, работа 1).

Материалы и реактивы. Растворы лактозы, мальтозы, гидроксида натрия, сульфата меди, 5%-е.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки, пипетки, капельницы, штатив для пробирок, спиртовки.

Ход работы. В одну пробирку наливают 2 мл раствора лактозы, а в другую - 2 мл раствора мальтозы. В обе пробирки затем вносят по 1 мл раствора гидроксида натрия и по 5 капель раствора сульфата меди. Пробирки осторожно нагревают в пламени спиртовки и наблюдают образование красного осадка закиси меди.

Гидролиз сахарозы и обнаружение продуктов гидролиза по реакции Троммера

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирка, пипетки градуированные, водяная баня, термометр лабораторный, часы.

Ход работы. В две пробирки наливают по 6 мл раствора сахарозы. В одну из них добавляют также 2 капли концентрированной соляной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане при 100°С в течение 15 минут. Вторая пробирка содержит контрольный раствор сахарозы. Затем берут две пробирки и в одну из них вносят 3 мл нейтрализованного гидролизата сахарозы, а в другую - 3 мл контрольного растворе сахарозы. К со-

держимому их пробирок добавляют по 1 мл раствора гидроксида натрия и по 5 капель раствора сульфата меда. Затем нагревают на водяной бане до кипения (проводят реакцию Троммера). Наблюдают образование красного осадка закиси меди в пробирке, содержащей гидролизат (положительная реакция Троммера) и отсутствие такового в контрольной пробе (отрицательная реакция Троммера).

С оставшимися 3 мл гидролизата сахарозы проводят реакцию Селиванова на обнаружение фруктозы. С этой целью в обе пробирки добавляю! по 1 мл раствора соляной кислоты и несколько кристаллов резорцина. Содержимое пробирок нагревают на водяной бане в течение 5-10 минут при 10°С. В пробирке, содержащей гидролизат сахарозы, наблюдают появление вишнево-красного окрашивания (положительная реакция Селиванова) и отсутствие такого окрашивания в контрольной пробе.

Полисахариды

Реакция крахмала и гликогена с иодом

При взаимодействии крахмала и гликогена с иодом образуется комплексные адсорбционные соединения, окрашенные в реакции с крахмалом в синий цвет, а с гликогеном - в красно-бурый цвет. Различие в цвете комплексов обусловлено химической структурой крахмала гликогена. При нагревании окраска исчезает, но появляется опять при охлаждении, что свидетельствует об образовании нестойких комплексов крахмала и гликогена с иодом. Обесцвечивание происходит также при добавлении гидроксида натрия или калия. Исчезновение окраски при нагревании и добавлении щелочи обусловлено тем, что в образовании комплексов принимает участие молекулярный иод, а не иодид-ионы.

Материалы и реактивы. Реактив Люголя; 0,1%-е растворы крахмала и гликогена; 10 % раствор гидроксида натрия.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки, пипетки, капельницы, штатив для пробирок, водяная баня.

Ход работы. В одну пробирку помещают 2 мл раствора крахмала, в другую - 2 мл раствора гликогена. Затем в обе пробирки вносят но 1 -2 капли раствора Люголя. Содержимое пробирок перемешивают и наблюдают образование синего окрашивания в пробирке с крахмалом и красно-бурого - с гликогеном. Затем из каждой пробирки по 1 мл жидкостей переносят в две другие пробирки, куда добавляет по 1 мл раствора гидроксида натрия. Наблюдают обесцвечивание в пробирках. Смеси, оставшиеся в пробирках, где первоначально возникла окраска, нагревает на водяной бане. Наблюдают исчезновение окрашивания, которое вновь появляется при охлаждении.

Гидролиз крахмала

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

Материалы и реактивы.

Концентрированная соляная кислота; раствор крахмала, 1%-й; раствор гидроксида натрия, 15%-й; раствор сульфата меди, 1%-й.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки, пипетки, капельницы, штатив для пробирок, водяная баня, часы.

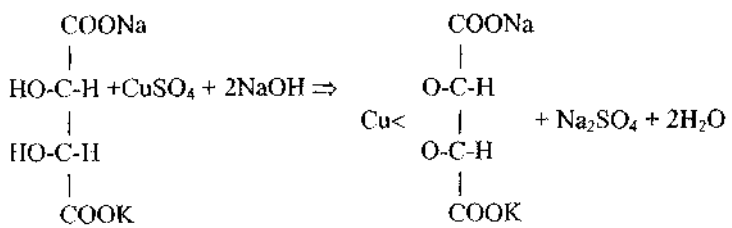
Ход работы. В две пробирки помещают по 5 мл раствора крахмала. В одну из них вносят также 2-3 капли концентрированной соляной кислоты и кипятят на водяной бане 15 минут. Вторая пробирка является контрольной. Затем в обе пробирки приливают по 2 мл 15 %-го раствора гидроксида натрия, и по 5 капель раствора сульфата меди и нагревают (проделывают реакцию Троммера). В пробирке, где проводился гидролиз крахмала соляной кислотой при нагревании, наблюдают образование красного осадка гемиоксида меди (реакция Троммера резко положительная), а в контрольной пробирке наблюдается слабовыраженная реакция Троммера.

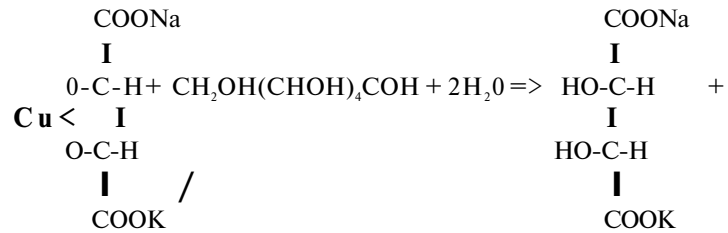
Занятие №9. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

Определение глюкозы с помощью реакции восстановления меди из оксида в гемиоксид

В основе лежит способность ионов меди(Н) в определенных условиях количественно окислять глюкозу. В основе метода лежит реакция Троммера (раздел **III,** гексозы, работа I).

В реакции Троммера происходит образование как альдоновых кислот, так и гидроксида меди (II), что указывает на отсутствие количественной связи между глюкозой и гемиоксидом меди. Однако если к реакционной смеси добавляют сегнетовую соль, то образуется комплекс, в котором медь реагирует с глюкозой в стехиометрическом соотношении:





$$+ CH_2OH(CHOH)_4COOH + Cu_20$$

Количество закиси меди (Cu_20), эквивалентное окисленной глюкозе, определяют иодометрическим методом:

$$Cu_20 + I_2 => CuO + CuI_2$$

Эта реакция в присутствии солей щавелевой или винной кислот протекает практически до конца.

Количество иода в излишке, которое не прореагировало с гемиоксидом меди, можно определить титрованием тиосульфатом натрия (индикатор - раствор крахмала):

$$2Na_2S_20_3 + I_2 => 2NaI + Na_2S_4O_)$$

Материалы и реактивы. Исследуемый раствор глюкозы (1-4 мг/мл); реактив Фелинга I и II (см. раздел гексозы, работа 2); насыщенный раствор щавелевой кислоты; раствор иода, 0,05 моль/л; раствор тиосульфата натрия, 0,05 моль/л; раствор крахмала, 1%-й.

Оборудование. Стеклянные палочки, пипетки, конические колбы (объем 50 мл, капельницы, водяная баня, бюретки, часы.

Ход работы. В две колбы помещают но 5 мл реактива Фелинга I и П. В одну из колб (проба) добавляют 10 мл исследуемого раствора глюкозы, а в другую (контроль) - 10 мл дистиллированной воды. Содержимое обеих колб нагревают до кипения, кипятят 5 минут, а затем охлаждают. После этого в обе колбы наливают по 10 мл насыщенного раствора щавелевой кислоты, по 10 мл раствора иода и после перемешивания отстаивают в течение 5 минут. По истечении этого времени в колбы вносят по 5 капель раствора крахмала и титруют раствором тиосульфата до исчезновения окраски, образовавшемся после добавления крахмала.

Массовую концентрацию глюкозы в исследуемом растворе (мг/мл) рассчитывают по формуле:

$$O(B-A)QV_0/V,$$

где А и В - объемы растворов тиосульфата натрия, затраченного на титрование пробы и контроля, соответственно; Q - масса глюкозы (3,52 мг), эквивалентная 1 мл 0,05 моль/л раствора тиосульфата натрия; V_0 - общий объем пробы; Vi - объем исследуемого раствора, взятого для анализа.

Определение содержания глюкозы в крови методом Хагендорна-Йенсена

Метод основан на способности глюкозы в безбелковом фильтрате крови в щелочной среде при нагревании восстанавливать красную кровяную соль (гексацианo-(Ш)феррат калия - $K_3\,Fe(CN)_6$) в желтую кровяную соль (гексацианo-(П)феррат калия - $K_4\,Fe(CN)_6$) . Уравнение реакции имеет вид:

$$2K_3Fe(CN)_6 + 3KOH + CH_2OH(CHOH)_4COH \Rightarrow CH_2OH(CИOH)_4COOK + \\ + 2K_4Fe(CN)_6 + 2H_20$$

Вследствие обратимости этой реакции гексацианo-(И)феррат калия под действием сульфата цинка переводят в нерастворимую соль - цинк-гексацианo-(11)феррат калия.

$$2K_4Fe(CN)_6 + 3ZnS0_4 \Rightarrow 2K_2Zn_3\,[Fe(CN)_6]_2 + 3K_2S0_4$$

Гексацианo-(Ш)феррат калия берут в избытке и неиспользованный в реакции его остаток определяют иодометрически в кислой среде например, в присутствии уксусной кислоты, титруя количество образовавшегося иода тиосульфатом натрия:

$$2K_3Fe(CN)_6 + 2KJ + 8CH3COOH \Rightarrow 2K_4Fe(CN)_6 + I_2 + 8CH3COOH$$
$$2Na_2S_20_3 + I_2 \Rightarrow Na_2S_40_6 + 2NaI$$

В качестве индикатора на молекулярный иод используют крахмал. Содержание глюкозы рассчитывают по специальной таблице. Таблица составлена так, что в ней определенному объему тиосульфата натрия, затраченного на титрование иода, а следовательно, избытка гексацианo-(Ш)феррат калия, соответствует то число миллиграммов-глюкозы, которое прореагировало в реакции.

Материалы и реактивы. Бумажные фильтры для фильтрования растворов; кровь экспериментального животного; раствор гидроксида калия,

0,1 моль/л; раствор сульфата цинка, 0,45 %-й; щелочной раствор гексациано-(Ш)феррат калия (1,65 г K_3 $Fe(CN)_6$ и 10,6 г безводного карбоната натрия растворяют в дистиллированной воде до объема 1 л); раствор сульфата цинка в растворе'хлорида натрия (10 г сульфата цинка и 50 г хлорида натрия растворяют, в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 200 мл); раствор иодита калия (5 г иодита калия растворяют в 25 мл дистиллированной воды) раствор тиосульфата, 2,5 моль/л; раствор уксусной кислоты, 3%-й; раствор крахмала, 1%-й.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки, колбы конические (объем 50 мл), воронки стеклянные, пипетки, капельницы, водяная баня, бюретки, штатив для пробирок, чашки, часы.

Ход работы. В две пробирки помещают по 1 мл раствора гидроксида калия и по 5 мл 0,45% раствора сульфата цинка. В образовавшуюся суспензию добавляют 0,1 мл крови (проба), а в другую (контроль) - 0,1 мл дистиллированной воды. После перемешивания ставят на 2-3 минуты в кипящую водяную баню. Готовят стаканчики с вложенными в них фильтрами, смачивают фильтры горячей дистиллированной водой и тщательно удаляют остатки воды с фильтра и из стаканчика стряхиванием.

После этого смеси фильтруют в конические колбы через бумажный фильтр, вложенный в воронку. Воронку и фильтр промывают горячей дистиллированной водой 3 раза по 2 мл, не наливая новой порции воды до полного оттока предыдущей. *К* фильтрату в каждой колбе приливают 2 мл щелочного раствора гексациано-(Ш)феррат калия, смеси кипятят на водяной бане 15 минут. Затем в каждую колбу добавляют по 2,6 мл раствора сульфата цинка в растворе хлорида натрия, по 0,4 мл раствора иодита калия и после перемешивания по 2 мл раствора уксусной кислоты и по 3 капли раствора крахмала. Смесь титруют 2,5 ммоль/л раствором тиосульфата натрия до исчезновения окраски, образовавшейся при добавлении крахмала. По затраченным на титрование пробы и контроля объемам тиосульфата натрия определяют, используя таблицу, массу глюкозы (мг) и вычисляют разность между массой глюкозы в контроле и пробе.

Массовую концентрацию глюкозы (мг/мл) рассчитывают по формуле:

$$C = (B - A) / V ,$$

где А и В - массы глюкозы, определенные по таблице, V - объем крови, взятый для анализа.

Таблица

Расчет содержания сахара в крови по методу Хагендорна-Йенсена

Гипосульфит	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,374	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

РАЗДЕЛ 4. ЛИПИДЫ

Занятие №10. ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПИДОВ

Качественная реакция на желчные кислоты (реакция Петтенкофера)

При взаимодействии желчных кислот с оксиметилфурфуролом появляется красно-фиолетовое окрашивание. Реакция обусловлена образованием окрашенных продуктов конденсации желчных кислот с оксиметилфурфуролом. Фурфурол образуется из фруктозы (сахарозы) при взаимодействии концентрированной серной кислоты.

Материалы и реактивы. Раствор свежеприготовленной сахарозы, 20%-й; концентрированная серная кислота; желчь, разведенная водой (1:2).

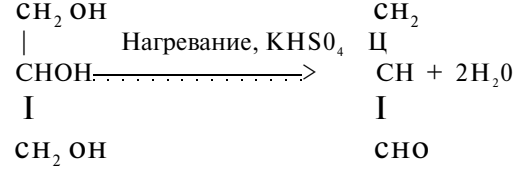
Оборудование. Чашка Петри или часовое стекло, капельницы, стеклянные палочки.

Ход работы. На сухую чашку Петри или часовое стекло наносят 2 капли желчи, 2 капли раствора сахарозы и тщательно перемешивают стек-

лянной палочкой. После того доливают 7 капель концентрированной серной кислоты и снова перемешивают стеклянной палочкой. Через несколько минут наблюдается красная окраска, которая при стоянии переходит в красно-фиолетовую.

Качественная реакция на остатки глицерола (акролеиновая реакция)

При нагревании глицерола с гидросульфитом калия происходи! дегидратация, в результате которой глицерол превращается в акролеин - ненасыщенный альдегид этилового ряда со специфическим запахом:



Глицерол Акролеин

Материалы и реактивы. Гидросульфат калия; растительное масло; глицерин.

Оборудование. Пробирки, капельницы, спиртовки.

Ход работы. На дно двух пробирок кладут несколько кристаллов KHS04, затем в одну пробирку вносят 5 капель растительного масла, а в другую - 5 капель глицерола, нагревают в пламени спиртовки. Образование акролеина определяют по характерному запаху альдегида - запах горелого сала. Наличие альдегида можно обнаружить при внесении в выделяющийся пар фильтровальной бумаги, смоченной аммиачным раствором серебра: бумага при этом темнеет.

Качественная реакция на лецитин

Лецитин является одним из представителей фосфатидов, входящих в состав биологических мембран. Лецитин не растворяется в ацетоне, но растворяется в горячем этаноле и образует стойкую эмульсию с водой.

Материалы и реактивы. Высушенный яичный желток или препарат лецитина; спирт; ацетон; водяная баня, дистиллированная вода.

*Оборудование^* Химические стаканы, пробирки, капельницы, воронки, пипетки.

*Ход работы^* В химический стакан, содержащий 200-300 мг высушенного и растертого яичного желтка, прибавляют 15 мл горячего спирта и перемешивают. Через 10-15 минут смесь охлаждают и фильтруют в сухую пробирку. В другую сухую пробирку наливают 2-3 мл ацетона и

Ч

каплями добавляют полученный фильтрат. Наблюдают появление мути, а затем выпадение осадка лецитина, что указывает на нерастворимость лецитина в ацетоне. Если в пробирку к 2-3 мл фильтрата прибавлять каплями дистиллированную воду, образуется стойкая эмульсия.

Физико-химические свойства липидов

Растворимость липидов и образование эмульсий

Характерное свойство жиров - их хорошая растворимость во многих органических растворителях (ацетон, хлороформ, диэтиловый эфир и др.) и нерастворимость в воде. При смешивании жиров с водой образуются эмульсии, их стойкость зависит от среды, в которой они образуются. Наличие в воде эмульгаторов (мыла, желчные кислоты, карбонаты) делают эмульсии более стойкими. Образование эмульсий обусловлено тем, что в поверхностный водный слой, окружающий жировые капельки, устремляются поверхностно-активные частицы желчных кислот, мыла, карбоната, которые обволакивают капельки жира и препятствуют их слиянию.

Материалы и реактивы. Растительное масло; желчь, спирт; бензол; хлороформ; раствор $Na_2C(>s$, 1%-й.

Оборудование. Штатив с пробирками, капельницы, пипетки.

Ход работы. В пять пробирок помещают по 0,2-0,3 мл растительного масла, затем в первую добавляют 5 мл воды, во вторую - 5 мл спирта, в третью - 5 мл бензола, в четвертую - 5 мл хлороформа, в пятую - желчи. Содержимое всех пробирок энергично встряхивают. В первой пробирке масло и вода быстро разделяются на два слоя, во второй - образуется мутный раствор вследствие недостаточной растворимости масла в спирте, в третьей и четвертой образуются прозрачные растворы. В две пробирки вносят по несколько капель масла. В одну из них добавляют 2 мл воды, в другую - 2 мл раствора Na_2C0_3. Содержимое пробирок интенсивно встряхивают и наблюдают образование эмульсии. Отмечают различия в стойкости эмульсий в двух пробирках.

Гидролиз липидов

Переваривание (гидролиз) жиров у человека начинается, хотя и в незначительной степени, в желудке. Главным местом переваривания жиров является двенадцатиперстная кишка. Липаза панкреатического сока выделяется поджелудочной железой частично в неактивном состоянии; неактивная липаза под действием желчных кислот переходит в активную. В результате действия липаз жиры подвергаются гидролизу, расщепляясь при этом на глицерин и жирные кислоты. В качестве субстрата лучше взять

молоко, жир которого, находясь в эмульгированном состоянии, быстро расщепляется на глицерин и жирные кислоты. Последние можно оттитровывать щелочью.

1. Счищают поджелудочную железу от жира и измельчают ее ножницами.

2. Около 5г п/зджелудочной железы помещают в ступку и тщательно растирают с 10-15 мл воды в течении 4-5 минут.

3. Полученную смесь отфильтровывают в пробирку через 2-3 слоя марли.

4. В 2 колбы (N 2 и 1) отмеривают цилиндром по 25 мл молока и добавляют в каждую колбу по 2 мл отфильтрованной вытяжки липазы. В колбу 1 добавляют, кроме того, 5-6 капель желчи (для активирования липазы).

5. Быстро перемешивают содержимое каждой колбы. Сейчас же отбирают по 10 мл жидкости и переносят их в 2 другие колбы (для титрования).

6. Первые 2 колбы (1 и 2) помещают в водяную баню при 37°.

7. В колбы для титрования прибавляют по 10 мл дистиллированной воды и по 2-3 капли фенолфталеина .

8. Оттитровывают содержимое каждой колбы 0,1 н щелочью до слабого розового окрашивания при непрерывном и тщательном помешивании. По окончании титрования записывают результаты ; содержимое выливают , и колбы тщательно моют .

9. Еще 3 - 4 раза через каждые 15 минут берут из колбы 1 и 2 пробы по 10 мл и оттитровывают их с водой и фенолфталеином, как описано выше.

10. Сравнивают объемы 0,1н щелочи, пошедшие на титрование каждой пробы из колб 1 и 2, и, откладывая их по времени, вычерчивают кривые расщепления жира. Так как гидролиз идет постепенно, количество освобождающихся жирных кислот нарастает во времени. Желчь (собственно соли желчных кислот) имеет большое значение для переваривания даже такого сильно эмульгированного жира, как жир молока. Роль желчи для переваривания других жиров еще важнее, так как, помимо активации липазы желчь переводит жиры в эмульгированное состояние (а также способствует всасыванию жирных кислот). При недостаточном поступлении желчи в кишечник жиры переходят в кал почти неизменяемыми. Так, например, при закупорке желчного протока в кале обнаруживается много неусвоенного жира.

РАЗДЕЛ 5. ВИТАМИНЫ И МИКРОЭЛЕМЕНТЫ

Занятие МП. ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

Качественная реакция на витамин А

Материалы и реактивы. Рыбий жир; насыщенный хлороформный раствор треххлористои сурьмы; уксусный ангидрид.

Оборудование. Стеклянные-палочки, пробирки, пипетки, штатив для пробирок.

Ход работы.

1. Наливают в чистую сухую пробирку 1-2 капли рыбьего жира.

2. Добавляют 5-6 капель хлороформного раствора треххлористои сурьмы и перемешивают. Наблюдают синее окрашивание, которое появляется в случае витамина А. Выполнение этой реакции требует особой тщательности, т.к. при малейших количествах влаги из треххлористои сурьмы образуется хлорная окись сурьмы, которая не вступает в реакцию с витамином А и вызывает помутнение. В целях связывания воды к реагирующему раствору добавляют 1-2 капли уксусного ангидрида.

Качественная реакция на витамин С

Материалы и реактивы. Исследуемый раствор; соляная кислота, 10%; перекись водорода, 3%; раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,02%.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки, пипетки, штатив для пробирок.

Ход работы.

1. Наливают в 2 пробирки по 2 мл исследуемого раствора.

2. В одной из пробирок разрушают витамин С путем добавления нескольких капель перекиси водорода и кипячением.

3. Добавляют в обе пробирки по 1 капле раствора соляной кислоты 10% и затем (при легком встряхивании) по каплям раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола при наличии витамина С раствор обесцвечивается. При дальнейшем прибавлении индикатора раствор окрашивается в розовый цвет ,т.к. вся аскорбиновая кислота в пробе уже окислена и индикатор более не восстанавливается. В пробирке, где витамин С был разрушен, обесцвечивания не происходит и даже от 1-2 капель индикатора происходит розовое окрашивание.

Количественное определение витамина С

Материалы и реактивы. Исследуемый раствор; 10%; соляной кислоты, раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,001н.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки, пипетки, штатив для пробирок,колбы.

Ход работы.

1. Берут точную навеску 0,1 г шиповника (или 1 г хвои).

2. Отмеривают соответственно 9,9 мл (9 мл в случае хвои) 2% раствора соляной кислоты.

3. Растирают навеску в ступке с щепоткой битого стекла, постепенно добавляя небольшими порциями отмеренное количество раствора соляной кислоты. Быстро отфильтровывают в сухую колбочку несколько мл полученной вытяжки.

4. Отмеривают пипеткой 3 мл фильтрата в коническую колбочку и оттитровывают из бюретки 0,001 н. раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола до слабо розового окрашивания, удерживающегося полминуты.

5. Вычисляют количество витамина С, зная, что 1 мл 0,001 н. раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты (молекулярный вес аскорбиновой кислоты 176, а грамм-эквивалент-88г), учитывая разведение и количество исходного вещества.

ПРИМЕР: навеска шиповника равна 0,094г (94мг); общее количество водной вытяжки навески 10 мл; взято вытяжки на титрование 3 мл; пошло на титрование 8,72 мл 0,001 н раствора 2, 6-дихлорфенолиндофенола тогда аскорбиновой кислоты в исследуемом шиповнике составит:

$$\frac{8{,}72 \times 0{,}088 \times 10 \times 100}{3 \times 94} = 2{,}72\%$$

Качественная реакция на витамин В]

Материалы и реактивы. Витамин Bi; раствор гидроксида натрия, 30 %-й; изобутиловый спирт; раствор железосинеродистого калия, 2%.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки, пипетки, штатив для пробирок.

Ход работы.

1. Наливают в пробирку около 0,5 мл раствора тиамина, 1 мл раствора железосинеродистого калия и 2 мл едкого натра и тщательно перемешивают.

2. Через 10 мин добавляют .3-5 мл изобутилового спирта, взбалтывают и дают отстоятся.

3. Верхний слой изобутаноловый переливают в пробирку ультрафиолетового стекла и рассматривают синюю флуоресценцию в лучах ртутно-кварцевой лампы.

Качественная реакция на витамин B_2

Материалы и реактивы. Витамин B_2; соляная кислота концентрированная; металлический цинк.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки, пипетки, штатив для пробирок.

Ход работы.

В пробирку наливают 10 капель витамина B_2 добавляют 5 капель конц. соляной кислоты и опускают зернышко металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается.

Определение кальция в крови

Материалы и реактивы. Кровь; оксалат аммония насыщенный; раствор аммиака, 2%; раствор серной кислоты, 5%; раствор перманганата калия, 0,01 н.

Оборудование. Стеклянные палочки, пробирки, пипетки, штатив для пробирок, микробюретка, стеклянные палочки.

Ход работы.

1. Отмеривают в одну центрифужную пробирку 2 мл ,а в другую (контроль) 4 мл дистиллированной воды.

2. В первую пробирку приливают 2 мл крови.

3. В обе пробирки приливают по 1 мл раствора щавелевокислого аммония, слегка встряхивают пробирки и оставляют стоять в течение 10 мин.

4. Центрифугируют содержимое пробирок в течение 10 мин.

5. Осторожно, чтобы не замутить осадок, сливают всю жидкость из пробирок , после чего края пробирок протирают фильтровальной бумагой для полного удаления жидкости. Щавелевокислый кальций остается на дне первой пробирки в виде белого осадка.

6. Наливают в обе пробирки по 4 мл раствора аммиака, встряхивают и вновь центрифугируют в течении 10 мин.

7. Сливают жидкость из пробирок и еще раз промывают осадок 2% раствором аммиака, повторяя манипуляцию, описанную в пункте 6.

8. Сливают после центрифугирования последние порции аммиака и в обе пробирки наливают по 2 мл раствора серной кислоты. Размешивают

осадок стеклянными палочками, и не вынимая палочек, погружают пробирки на 2 мин. в горячую водяную баню.

9. Оттитровывают, помешивая палочками, горячий раствор 0,01л раствором марганцевокислого калия до появления розового окрашивания, неисчезающего в течении минуты.

10. Для вычисления содержания кальция в крови из результата титрования опытной пробы вычитают результат титрования контрольной.

Контрольный опыт служит контролем содержания в реактивах кальция и на полноту отмывания от избытка щавелевокислого аммония. Полученную разность умножают на титр марганцовокислого калия по кальцию, выраженный в мг, т. е. на количество мг кальция соответствующее 1 мл раствора (титрованного) (для марганцевокислого калия эта величина равна 0,2 мг) и на 50, т. к. определение проводилось в 2 мл крови, а вычисляется содержание в 100 мл.

Т.о., если через х обозначить содержание кальция в крови в мг-процентах, а через *а* - результат титрования опытной пробы, через *б* - количество мл 0,01н. марганцовокислого *калия,* пошедшего на титрование контрольной пробы, то:

$$X = 0{,}2\ (a - б) \times 50$$

РАЗДЕЛ 6. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Занятие №12. СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Выделение дезоксирибонуклеопротеидов из селезенки и других органов

Реактивы: хлорид натрия 5%-й раствор, содержащий 0,04% трехзамещенного цитрата натрия; гидроксид натрия, 0,4%-й раствор, дифениламиновый реактив (1 г дифениламина растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты. К раствору прибавляют 2,75 мл концентрированной серной кислоты); биуретовый реактив (реактив Бенедикта: 173 г цитрата натрия и 100 г карбоната натрия растворяют в 300 их дистиллированной воды на водяной бане. Отдельно в 300 мл воды растворяют 17,3 г сульфата меди. Оба раствора сливают и доводят общий объем до 1000 мл).

Оборудование: штатив с пробирками; ступка с пестиком; кварцевый песок, пипетка; мерные цилиндры вместимостью 50 и 300 мл; кристаллизатор; деревянные палочки с насечками; водяная баня; круглодонная колба с обратным холодильником; марля для фильтрования.

Материал: селезенка или другие органы, свежие или замороженные; выделенные из органов дезоксирибонуклеопротеиды; РНК, свежеприготовленный 0,1%-й раствор.

Ход определения; 2-3 г селезенки (или других органов) тщательно растирают в ступке с кварцевом песком, приливая постепенно небольшими порциями 35-40 мл раствора хлорида натрия. Полученный вязкий раствор фильтруют через два слоя марли в малый кристаллизатор.

Отмеряют цилиндром шестикратный (по отношению к фильтрату) объем дистиллированной воды и медленно выливают ее в фильтрат. Образовавшиеся нити дезоксирибонуклеопротеидов осторожно *наматывают*. на деревянную палочку, переносят в пробирку для использования в последующей работе.

Данный метод основан на способности дезоксирибонуклеопротеидов растворяться в солевых растворах большой ионной силы и выпадать в осадок при снижении их концентрации.

Качественная реакция на ДНК. Гидролиз ДНП

Метод основан на способности дезоксирибозы, входящей в состав дезоксирибонуклеопротеида, образовывать соединение синего цвета с дифениламином при нагревании в среде, содержащей смесь уксусной и концентрированной серной кислот (реакция Дише). С рибозой аналогичная реакция дает зеленое окрашивание.

Ход определения: к 1/4 части осадка ДНП приливают 1 мл 0,4% раствора гидроксида натрия (до растворения), добавляют 0,5 мл дифениламинового реактива. Содержимое пробирки перемешивают и ставят на кипящую водяную баню на 15-20 минут.

Аналогичную реакцию проводят в другой пробирке с 1 мл РНК. Отмечают характерное окрашивание в пробах.

Гидролиз ДНП

Ход определения: оставшуюся часть осадка ДНП помещают в колбочку для гидролиза, добавляют 30-40 мл 5%-го раствора серной кислоты.

Закрывают колбочку пробкой с обратным холодильником и осторожно кипятят содержимое на асбестовой сетке на медленном огне в течение 30-40 минут. Полученный гидролизат охлаждают и используют для определения составных компонентов ДНК в последующей работе (гидролизат хранят в холодильнике).

Практическое значение работы. Выделение и очистку ДНП из гомогенатов и ядер клеток с помощью растворов хлорида натрия разной концентрации используют в экспериментальной биохимии. Дифениламиновая

проба лежит в основе методов качественного и количественного определения нуклеолротеидов и нуклеиновых кислот в биологическом материале. В клинической цитологии эти реакции применяют при нативной окраске нуклеиновых кислот, например, в мазках клеток крови.

Качественные реакции на компоненты нуклеиновых *кислот*

Реактивы: нитрат серебра, 2%-й аммиачный раствор (к 2-3% раствору серебра добавляют концентрированный раствор аммиака до растворения осадка); концентрированный раствор аммиака; аскорбиновая кислота, 1% раствор; молибдат аммония, раствор в азотной кислоте (7,5 г молибдата аммония растворяют в 100 ил воды и прибавляют 100 мл 32%-й азотной кислоты); орциновый реактив (к 1 г орцина прилить 500 мл 30% соляной кислоты плотностью 1,15 г/см . Перемешать до растворения и добавить 4-5 мл 10%-го раствора хлорида железа. (Реактив хранят в плотно закупоренной темной склянке); дифениламиновый реактив (см. предыдущую работу).

Оборудование: глазные пипетки; пипетки вместимостью I мл; штатив с пробирками; водяная баня.

Материал: гидролизаты ДНК (см. предыдущие работы); лекарственные препараты нуклеотидной природы: фосфаден (аденозинмонофосфат), 2% раствор в ампулах и аденозинтрифосфат натрия, 1%-й раствор в ампулах.

а) *проба на пуриновые основания*

Метод основан на способности пуриновых оснований с аммиачным раствором нитрата серебра образовывать осадок серебряных содей пуриновых оснований (аденина, гуанина), окрашенных в светло-коричневый цвет.

Ход определения: в пробирку вносят 10 капель гидролизата, помешают в него кусочек лакмусовой бумаги и приливают по каплям примерно 10 капель концентрированного раствора аммиака до щелочной реакции по лакмусу. Добавляют 10 капель аммиачного раствора нитрата серебра. При стоянии образуется осадок с характерной окраской.

б) дифениламиновая проба на пентозы

Принцип метода - см. реакцию Дише (предыдущие работы).

Ход определения; для определения берут 5 капель гидролизата и проделывают реакцию, как описано в предыдущей работе (реакция Дише).

в) молибденовая проба на фосфорную кислоту

Принцип метода основан на реакции фосфорной кислоты с молибдатом аммония, в результате которой образуется фосфорномолибденовой комплекс:

$$H_3P0_4 + 12\,(NH_4)_2Mo04 + 21HNO_{,,} => (NH_4)_3P0_4Mo0_3 + 21NH_4N0_3$$

молибдат аммония фосфомолибдат аммония

Под действием восстановителей (аскорбиновая кислота) фосфомолибдат аммония переходит в молибденовую синь.

Ход определения; берут 10 капель гидролизата и добавляют 10 капель раствора молибдата аммония, перемешивают содержимое встряхиванием и наливают 10 капель аскорбиновой кислоты. Вновь перемешивают и оставляют пробы стоять до развития специфического окрашивания.

г) качественные реакции на лекарственные препараты нуклеотидной природы

Метод основан на обнаружении рибозы в препаратах нуклеотидной природы с помощью дифениламиновой реакции и пробы с орциновым реактивом. Последняя состоит в том, что фурфурол, образующийся из рибозы при нагревании в среде с соляной кислотой, дает с орцином окрашенное соединение зеленого цвета.

Ход определения: в две пробирки добавляют по 5 капель соответственно раствора фосфадена и аденозинтрифосфата натрия. К ним приливают но 10 капель дифениламинового реактива, нагревают 10 минут на кипящей водяной бане. Отмечают результат реакции.

В две другие пробирки вносят по 5 капель тех хе веществ и добавляют по 5 капель орцинового реактива. Нагревают 20 минут на кипящей водяной бане. Отмечают результат реакции.

Практическое значение работы. Реакции на компоненты нуклеиновых кислот и нуклеотиды могут применяться для их идентификации и количественного анализа в биохимических исследованиях, а в фармации для контроля качества препаратов нуклеотидной и нуклеозидной природы.

Крахмал, 0,1%-ный раствор. 0,1 г крахмала суспендируют в 10 мл холодной воды, тонкой струйкой вливают в 70 мл кипящей дистиллированной воды, доводя[1]! до кипения, снимают с плитки, охлаждают и доводят объем до 100 мл.

Выделение инвертазы или сахарозы

1-й способ: 10,0 г сухих дрожжей растирают в ступке в порошок, переносят в 50,0 мл дистиллированной воды и взбалтывают в течение 1-2 часов. Фильтруют через складчатый бумажный фильтр и фильтрат используют как источник инвертазы (сахаразы).

2-й способ: 2г прессованных дрожжей или высушенных на воздухе пивных дрожжей заливают 5 мл фосфатного буфера и растирают в течение 20 мин с кварцевым песком или толченым стеклом. Затем добавляет 20 мл того же буфера, нагретого до 60°С, и через 30 мин фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

В обоих случаях фильтрат должен быть прозрачным, для чего первые порции мутного фильтрата снова выливают в воронку для фильтрования. Фильтрование происходит медленно, поэтому раствор можно оставить фильтровать на ночь при 4°С, либо фильтрование можно заменить центрифугированием - 10 мин при 3000 об/мин.

Натрий едкий, 10,0% раствор

В фарфоровый стакан вносят 10,0 г х. ч. едкого натра и 90,0 мл дистиллированной воды, не содержащей $C0_2$. Раствор хранится в полиэтиленовой посуде.

Сернокислая медь, 5% и 1% растворы.

5 г $CuS0_4$ растворяют в 95мл дистиллированной воды. Для получения 1%-ного раствора сернокислой меди, исходный раствор необходимо развести в 5 раз.

Приготовление ферментной вытяжки а- и f}- амилаз из солода.

5г солода (измельченные проросшие зерна ячменя) заливают 50 мл смеси глицерин-вода (2:1), нагретой до 40°С, настаивают в течение 30 мин, помешивая палочкой, фильтруют и используют фильтрат в качестве препарата амилазы.

Раствор Люголя

20 г йодистого калия и 10 г йода растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Полученный реактив хранят в тёмной склянке. Для проведения реакции на крахмал полученный раствор разводят в 10 раз.

Буферный раствор (0,1 М фосфатно-цитратный буфер, pH 5,0-8,0)

Исходные растворы:

0,2 М раствор Na_2HP0_4 - 35,61 г соли растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1 л.

0,1 М раствор лимонной кислоты - 21,01 г кислоты растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1 л.

Мышечная кашица отмытая

Около 100 г мышц попускают через мясорубку, промывают на марле водой и отжимают. Отмытые мышцы заливают физиологическим раствором (0,9%-ным раствором NaCl).

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Фролов, Ю.П. Биохимия и молекулярная биология: учеб. пособие для вузов / Ю.П. Фролов, М.М. Серых, О.Н. Макурина, Н.А. Кленова, В.Г. Подковкин; под, общ. ред. Ю.П. Фролова. - Самара: Изд-во «Самарский университет», ^004.

2. Березов, *Т.Т.* Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. - М.: Медицина, 2002.

3. Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3 т / А. Ленинджер.- М.:Мир,1985. -Т.1-3.

4. Марфи, Р. Биохимия человека: в 2 т / Р. Марфи, Д. Греннер, П. Мейес и др.- М: Мир, 1993. - Т. 1-2.

5. Филиппович, Ю.Б. Практикум по общей биохимии / Ю.Б.Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова. - М.: Просвещение 1982.-311с.

6. Номенклатура ферментов // Рекомендации Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов, а также по единицам ферментов и символам кинетики ферментативных реакций М, 1979.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие 3

Основные правила безопасности при работе в биохимической лаборатории 3

Раздел 1. Белки 6

Раздел 2. Ферменты 16

Раздел 3. Углеводы 37

Раздел 4. Липиды 45

Раздел 5. Витамины и микроэлементы 49

Раздел 6. Нуклеиновые кислоты 52

Приложения 56

Рекомендуемая литература 58

Учебное издание

Макурина Ольга Николаевна,
Подковкин Владимир Георгиевич,
Кленова Наталья Анатольевна

ПРАКТИКУМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Публикуется в авторской редакции

Компьютерная верстка, макет Н.П. Бариновой

Подписано в печать 27.09.06. Формат 60x84 1/16
Бумага офсетная. Печать офсетная. Усл. печ.л. 3,5; уч.- изд. л. 3,75
Тираж 200 экз. Заказ № 1252
Издательство «Самарский университет» 443011 г. Самара, ул. Акад. ПавловаЛ.
Отпечатано на УОП СамГУ.