

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Учебная программа дисциплины

Конспект лекций

➤ Лабораторный практикум

Методические указания по самостоятельной работе

Банк тестовых заданий в системе UniTest



УДК 577.1
ББК 28.072
Т45

Электронный учебно-методический комплекс по дисциплине «Биохимия и молекулярная биология» подготовлен в рамках инновационной образовательной программы «Создание и развитие Департамента физико-химической биологии и фундаментальной экологии», реализованной в ФГОУ ВПО СФУ в 2007 г.

Рецензенты:

Красноярский краевой фонд науки;
Экспертная комиссия СФУ по подготовке учебно-методических комплексов дисциплин

Титова, Н. М.

Т45 Биохимия и молекулярная биология. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : лаб. практикум / Н. М. Титова, Т. Н. Замай, Г. И. Боровкова. – Электрон. дан. (1 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – (Биохимия и молекулярная биология : УМКД № 175-2007 / рук. творч. коллектива Н. М. Титова). – 1 электрон. опт. диск (DVD). – Систем. требования : *Intel Pentium* (или аналогичный процессор других производителей) 1 ГГц ; 512 Мб оперативной памяти ; 1 Мб свободного дискового пространства ; привод *DVD* ; операционная система *Microsoft Windows 2000 SP 4 / XP SP 2 / Vista* (32 бит) ; *Adobe Reader 7.0* (или аналогичный продукт для чтения файлов формата *pdf*).

ISBN 978-5-7638-0882-7 (комплекса)

ISBN 978-5-7638-1434-7 (лабораторного практикума)

Номер гос. регистрации в ФГУП НТЦ «Информрегистр» 0320802400 от 21.11.2008 г. (комплекса)

Настоящее издание является частью электронного учебно-методического комплекса по дисциплине «Биохимия и молекулярная биология», включающего учебную программу, конспект лекций, методические указания к самостоятельной работе, контрольно-измерительные материалы «Биохимия и молекулярная биология. Банк тестовых заданий», наглядное пособие «Биохимия и молекулярная биология. Презентационные материалы».

Представлены подробные, четко структурированные работы по основным разделам биологической химии разной степени сложности. Практикум состоит из двух частей. В первой лабораторные работы для изучения основ статической биохимии, во второй части – лабораторные работы по динамической биохимии. Кроме того, практикум включает рабочую программу курса и основные правила по технике безопасности при работе в биохимической лаборатории.

Предназначен для студентов направления подготовки бакалавров 020200.62 «Биология» укрупненной группы 020000 «Естественные науки».

© Сибирский федеральный университет, 2008

Рекомендовано Инновационно-методическим управлением СФУ
в качестве учебного пособия

Редактор В. Р. Наумова

Разработка и оформление электронного образовательного ресурса: Центр технологий электронного обучения информационно-аналитического департамента СФУ; лаборатория по разработке мультимедийных электронных образовательных ресурсов при КрЦНИТ

Содержимое ресурса охраняется законом об авторском праве. Несанкционированное копирование и использование данного продукта запрещается. Встречающиеся названия программного обеспечения, изделий, устройств или систем могут являться зарегистрированными товарными знаками тех или иных фирм.

Подп. к использованию 22.09.2008

Объем 1 Мб

Красноярск: СФУ, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

ОГЛАВЛЕНИЕ

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА КУРСА	6
Статическая биохимия.....	6
Динамическая биохимия	10
ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В	
БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.....	16
ЧАСТЬ 1 РАЗДЕЛ 1. УГЛЕВОДЫ.....	19
1.1. Открытие углеводов в растворах	19
Работа 1. Реакция Подобедова-Молиша.....	19
Работа 2. Открытие фруктозы (реакция Селиванова)	19
Работа 3. Реакция крахмала и гликогена с йодом.....	20
1.2. Восстанавливающие свойства углеводов	20
Работа 4. Реакция Троммера.....	20
Работа 5. Количественное определение редуцирующих сахаров. Титрование	
раствором Фелинга	21
1.3. Полисахариды.....	22
Работа 6. Кислотный гидролиз крахмала.....	22
Работа 7. Выделение гликогена из печени.....	22
Контрольные вопросы	22
РАЗДЕЛ 2. ЛИПИДЫ.....	23
Работа 8. Определение кислотного числа.....	23
Работа 9. Определение числа омыления	24
Работа 10. Обнаружение желчных кислот в моче (проба Петенкофера)	24
Работа 11. Качественные реакции на обнаружение витамина Е	25
Работа 12. Качественные реакции на ацетон и ацетоуксусную кислоту.....	25
Контрольные вопросы	26
РАЗДЕЛ 3. БЕЛКИ.....	27
3.1. Химическая природа белка (цветные реакции)	27
Работа 13. Биуретовая реакция на пептидную связь (Пиотровского).....	27
Работа 14. Нингидриновая реакция на α -аминокислоты	28
Работа 15. Ксантопротеиновая реакция на циклические аминокислоты (Мульдера) ...	29
Работа 16. Реакция Фоля на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу	
(цистеин, цистин)	29
Контрольные вопросы	30
3.2. Физико-химические свойства белка	31
3.2.1. Реакции осаждения белков	31
Работа 17. Осаждение белков при нагревании.....	31
Работа 18. Осаждение белка органическими растворителями.....	33
Работа 19. Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами	33
Работа 20. Осаждение белка органическими кислотами	34
Работа 21. Осаждение белка солями тяжелых металлов	34
3.2.2. Растворимость белков.....	35
Работа 22. Растворимость альбуминов и глобулинов	35
3.2.3. Высаливание белков.....	36
Работа 23. Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка.....	36

3.2.4. Определение изоэлектрической точки белков	37
Работа 24. Определение изоэлектрической точки казеина	37
Контрольные вопросы	38
3.3. Гидролиз белков	39
Работа 25. Кислотный гидролиз простого белка	39
Работа 26. Хромопротеиды	39
Работа 27. Фосфопротеиды	40
Работа 28. Гликопротеиды. Открытие углеводного компонента в яичном белке	41
Контрольные вопросы	42
РАЗДЕЛ 4. НУКЛЕОТИДЫ	43
Работа 29. Исследование состава нуклеиновых кислот	43
Контрольные вопросы	44
РАЗДЕЛ 5. ВИТАМИНЫ	45
Работа 30. Количественное определение аскорбиновой кислоты	46
Работа 31. Количественное определение витамина Р в чае	47
Контрольные вопросы	48
РАЗДЕЛ 6. ФЕРМЕНТЫ	49
6.1. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции	49
Работа 32. Влияние температуры на активность амилазы слюны	49
Работа 33. Влияние температуры на активность холинэстеразы	50
6.2. Влияние рН на скорость ферментативных реакций	51
Работа 34. Влияние рН на активность амилазы слюны	51
6.3. Специфичность действия ферментов	52
Работа 35. Специфичность действия α -амилазы слюны	52
Работа 36. Специфичность действия сахаразы	53
6.4. Открытие ферментов различных классов	54
Работа 37. Идентификация оксидоредуктаз в биологическом материале	54
Работа 38. Открытие пероксидазы	55
Работа 39. Открытие каталазы	55
Работа 40. Открытие действия ферментов гидролаз	55
Работа 41. Открытие действия фермента липазы	56
Контрольные вопросы	57
ЧАСТЬ 2 РАЗДЕЛ 1. РЕАКЦИЯ СРЕДЫ. ВОДОРОДНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ. БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ. БУФЕРНАЯ ЕМКОСТЬ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РН РАСТВОРА	58
Работа 42. Буферные растворы	58
Контрольные вопросы	60
РАЗДЕЛ 2. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ	61
Работа 43. Количественное определение углеводов	61
Работа 44. Влияние инсулина на содержание глюкозы в крови	63
Работа 45. Влияние адреналина на содержание глюкозы в крови	64
Работа 46. Определение гликолитической активности эритроцитов	64
Работа 47. Количественное определение содержания гликогена в печени и скелетных мышцах крысы	66
Контрольные вопросы	67
РАЗДЕЛ 3. БИОЭНЕРГЕТИКА	68

Работа 48. Сравнительное изучение активности сукцинатдегидрогеназы в различных тканях крыс и ее конкурентное торможение.....	68
Работа 49. Количественное определение макроэргических соединений в мышцах (АТФ и креатинфосфат)	69
Контрольные вопросы	70
РАЗДЕЛ 4. ОБМЕН ЛИПИДОВ	72
Работа 50. Исследование действия липазы поджелудочной железы	72
Работа 51. Определение общих липидов в сыворотке крови	73
Работа 52. Количественное определение липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в сыворотке крови.....	74
Работа 53. Определение общего холестерина в сыворотке крови, основанное на реакции Либермана-Бурхарда (метод Илька)	75
Работа 54. Определение общих фосфолипидов в плазме крови	76
Контрольные вопросы	78
РАЗДЕЛ 5. ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	79
Работа 55. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот	79
Работа 56. Определение температуры «плавления» водородных связей	81
Работа 57. Определение содержания мочевой кислоты	82
Работа 58. Определение активности рибонуклеазы (КФ 2.7.7.16).....	83
Контрольные вопросы	84
РАЗДЕЛ 6. ОБМЕН БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ.....	85
Работа 59. Количественное определение белка	85
Работа 60. Определение концентрации мочевины в сыворотке крови и моче.....	88
Работа 61. Определение активности аргиназы печени.....	89
Работа 62. Количественное определение креатинина в моче и сыворотке крови	90
Работа 63. Определение активности аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы	92
Работа 64. Переаминирование аминокислот	96
Работа 65. Оценка биосинтетической функции ткани по соотношению РНК и ДНК к белку	98
Контрольные вопросы	99
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	100
ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	100
ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА	100
ПРИЛОЖЕНИЕ	101
Список сокращений.....	101

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА КУРСА

Статическая биохимия

Введение

Биохимия как наука о строении химических веществ, входящих в состав живой материи, их преобразованиях, лежащих в основе разнообразных проявлений жизни, о связи между молекулярной структурой и биологической функцией химических компонентов живых организмов. Роль и место биохимии в системе естественных наук. Разделы современной биохимии. Перспективы биохимических исследований.

Белки

Белки и их функции. Элементарный состав белков. Методы выделения и очистки белков. Аминокислотный состав белков. Классификация аминокислот, заменимые и незаменимые аминокислоты, общие свойства аминокислот. Структурная организация белков. Первичная структура белков, методы исследования. Структурные особенности пептидной связи. Номенклатура пептидов и полипептидов. Природные пептиды: глутатион, карнозин, ансерин, грамицидин S, окситоцин, энкефалины. Вторичная структура белков: α -спираль, ее основные характеристики, β -структура, β -изгиб. Роль водородных связей в формировании вторичной структуры. Сверхвторичные (надвторичные) структуры белка. Третичная структура белков. Типы нековалентных связей, стабилизирующих третичную структуру. Роль S-S-мостиков в формировании третичной структуры некоторых белков. Четвертичная структура белков. Количество и типы субъединиц. Взаимодействия между субъединицами, стабилизирующие четвертичную структуру. Функциональное значение четвертичной структуры белков. Физико-химические свойства белков: молекулярная масса, методы ее определения, оптические, кислотно-основные свойства. Простые белки: протамины, гистоны, проламины, глутелины. Сложные белки. Хромопротеины: миоглобин, гемоглобин, цитохромы, флавопротеины, хлорофилл. Гемоглобин: строение, функции. Формы гемоглобина. Кооперативное присоединение кислорода к гемоглобину и его регуляция 2,3-дифосфоглицератом и протонами водорода. Аномальные гемоглобины. Гликопротеины и протеогликаны. Фосфопротеины. Липопротеины. Металлопротеины. Нуклеопротеины. Фибриллярные белки: коллаген, эластин, кератины. Строение и биологическая роль.

Нуклеиновые кислоты

Биологическая роль нуклеиновых кислот. Клеточные, вирусные (фаговые) ДНК и РНК. Химический состав нуклеиновых кислот. Пуриновые и пи-

римидиновые основания: строение, физико-химические свойства. Углеводный компонент. Нуклеозиды и нуклеотиды, их строение и номенклатура, физико-химические свойства. Анти- и синконформации нуклеозидов и нуклеотидов. Минорные компоненты нуклеиновых кислот. Первичная структура нуклеиновых кислот. Фосфодиэфирная связь. Нуклеотидный состав ДНК и РНК. Правила Э. Чаргаффа. Изучение первичной структуры ДНК методом Сенгера, Максама – Гилберта. Вторичная структура ДНК. Модель Уотсона – Крика. Характеристика В, А, С, Z - форм ДНК. Роль водородных связей и гидрофобных взаимодействий в стабилизации биспиральной молекулы ДНК. Третичная структура ДНК. Уровни суперспирализации ДНК в хроматине. Физико-химические свойства ДНК. Структура и свойства транспортных, рибосомальных, и матричных РНК у эукариот и прокариот. Вторичная и третичная структуры рибонуклеиновых кислот. Малые ядерные РНК: строение и биологическая роль.

Ферменты

Химическая природа ферментов. Сущность явлений катализа. Особенности ферментативного катализа. Уровни структурной организации ферментов. Простые и сложные ферменты (холоферменты). Кофакторы: коферменты, простетические группы, ионы металлов. Роль витаминов в функционировании ферментов. Активные и аллостерические центры, их характеристика. Теории ферментативного катализа. Образование и превращение фермент-субстратного комплекса. Энергия активации ферментативного процесса. Факторы, влияющие на эффективность ферментативного катализа. Специфичность действия ферментов, виды специфичности. Работы Э. Фишера и Д. Кошланда. Стационарная кинетика ферментативных реакций. Факторы, влияющие на скорость реакций, катализируемых ферментами: концентрация субстратов и кофакторов, концентрация фермента, температура, pH. Уравнение Михаэлиса-Ментен. Понятие субстратной константы, константы Михаэлиса, максимальной скорости реакции. Единицы ферментов. Ингибиторы ферментов. Классификация. Необратимое ингибирование на примере ацетилхолинэстеразы и сукцинатдегидрогеназы. Обратимые ингибиторы. Активаторы ферментов. Металлоэнзимы и металлоэнзимные комплексы. Локализация ферментов в клетке. Изоферменты, биологическая роль. Регуляция активности ферментов. Изостерическая регуляция. Аллостерический контроль активности ферментов. Регуляция ферментов ковалентной модификацией. Регуляция ферментов ограниченным протеолизом (активация зимогенов). Регуляция активности мультиэнзимных комплексов. Классификация и номенклатура ферментов. Характеристика отдельных классов ферментов. Ферменты в клинической диагностике. Энзимопатии.

Углеводы

Углеводы, их биологическая роль, классификация и номенклатура. Моносахариды (альдегиды и кетоны). Стереоизомерия моносахаридов. Энантиомеры, диастереомеры, эпимеры. Образование циклических форм моносахаридов: фуранозный и пиранозный циклы. α - и β -аномеры моносахаридов. Явление мутаротации. Конформационные формулы моносахаридов. Структура, свойства и распространение в природе основных представителей моносахаридов (D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, D-галактоза, D-рибоза, D-рибулоза, D-ксилоза, D-ксилулоза, D- и L-арабиноза и др). Простые производные моносахаридов. Дезоксисахара: 2-дезокси-D-рибоза, рамноза, фукоза. Аминосахара и их ацетильные производные. Уроновые кислоты. Альдаровые и альдоновые кислоты. Сахароспирты (альдиты, полиолы): рибит, сорбит, маннит, ксилит, мио-инозит. N-ацетилнейраминная кислота и ее производные. Фосфорные эфиры моносахаридов. Олигосахариды. Образование гликозидной связи. Редуцирующие и нередуцирующие олигосахариды. Линейные и разветвленные олигосахариды. Структура, свойства и распространение в природе основных дисахаридов (сахароза, мальтоза, лактоза, целлобиоза, изомальтоза, трегалоза). Три- и тетрасахариды (рафиноза, стахиоза). Полисахариды (гликаны). Гомо- и гетерополисахариды. Резервные полисахариды крахмал, гликоген, инулин и др.: структура, свойства и биологическая роль. Структурные полисахариды (целлюлоза, хитин, полисахариды водорослей и грибов). Глюкозамингликаны (мукополисахариды). Гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, дерматансульфаты, кератансульфаты, гепарин и гепарансульфат: строение, свойства и биологическая роль. Пространственная структура олиго- и полисахаридов.

Липиды

Общая характеристика и классификация липидов. Простые, сложные, омыляемые и неомыляемые липиды. Жирные кислоты: насыщенные, моноеновые, полиеновые, циклические, оксикислоты. Физико-химические свойства жирных кислот. Воска: сложные эфиры высших спиртов и высших монокарбоновых кислот. Представители восков: спермацет, ланолин, пчелиный воск и др. Триацилглицеролы: строение, свойства, биологическая роль. Глицерофосфолипиды (фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозитолы, фосфатидилглицеролы, дифосфатидилглицеролы (кардиолипиды)): строение, физико-химические свойства, участие в построении биологических мембран. Сфингофосфолипиды. Строение сфингозина и дигидросфингозина. Образование церамида. Сфингомиелины: свойства, биологическая роль. Гликолипиды (цереброзиды, церамидолигосахариды, ганглиозиды): строение, биологическая роль. Стероиды – производные циклопентапергидрофенантрена. Классификация стероидов. Стеролы (стерины). Зоо-, фито- и микостерины. Холестерин – важнейший зоостерин:

строение, свойства, биологическая роль. Желчные кислоты. Главные желчные кислоты (холевая и хенодезоксихолевая): строение, свойства, биологическая роль. Вторичные желчные кислоты. Образование конъюгатов желчных кислот с глицином и таурином, значение этого процесса. Терпены: общая характеристика. Монотерпены, сесквитерпены, дитерпены, тритерпены, тетратерпены.

Витамины

Общие представления о витаминах и их классификация. Номенклатура витаминов: буквенная, химическая, физиологическая. Жирорастворимые витамины. Витамины группы А: ретинол, ретиналь, ретиноевая кислота. Витамины группы Д: витамины Д₂ и Д₃. Витамины группы Е (α,β,γ-токоферолы). Витамины группы К (филлохиноны, менахиноны). Витамин F (комплекс ненасыщенных жирных кислот). Водорастворимые витамины. Витамин В₁ (тиамин). Витамин В₂ (рибофлавин). Витамин В₃ (пантотеновая кислота). Витамин В₅, РР (никотиновая кислота, никотинамид). Витамин В₆ (пиродоксин, пиридоксаль, пиридоксамин). Витамин В₁₂ (кобаламин). Витамин В_с, В₉ (фолиевая, птероилглутаминовая кислота). Витамин С (аскорбиновая кислота). Витамин Н (биотин). Витамин Р (рутин, биофлавоноиды). Витамин U (S-метилметионин). Витаминоподобные вещества: витамин В₁₅ (пангамовая кислота), витамин Вт (карнитин), витамин Q (убихинон), холин, п-аминобензойная кислота, инозит, липоевая кислота, пиролохинолинхинон (PQQ). Провитамины. Антивитамины. Гиповитаминоз, авитаминоз, гипервитаминоз.

Динамическая биохимия

Биоэнергетика

Роль высокоэнергетических фосфатов в биоэнергетике. Нуклеозидфосфаты, креатинфосфат, фосфоенолпируват, карбомиоилфосфат. Биологическая роль АТФ. Свободная энергия гидролиза АТФ и других органических фосфатов. Биологическое окисление. Классификация процессов биологического окисления, локализация их в клетке. Ферменты, участвующие в биологическом окислении: оксидазы, аэробные и анаэробные дегидрогеназы, гидроксипероксидазы (пероксидазы, каталаза), диоксигеназы, монооксигеназы (оксидазы со смешанной функцией, гидроксилазы). Свободное окисление и его биологическая роль. Участие цитохрома Р-450 в микросомальном окислении эндогенных органических соединений и ксенобиотиков. Окисление, сопряжённое с фосфорилированием АДР. Субстратное фосфорилирование на примере реакций, катализируемых глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой и енолазой. Понятие энергетического заряда клетки. Цепь переноса электронов и протонов внутренней мембраны митохондрий (дыхательная цепь, редокс-цепь). Компоненты дыхательной цепи: флавопротеины, железосерные белки, коэнзим Q, цитохромы v , c_1 , c , aa_3 . Топография дыхательных переносчиков в редокс-цепи. Окислительно-восстановительные потенциалы дыхательных переносчиков. Энергетическое значение ступенчатого транспорта электронов от окисляемых субстратов к молекулярному кислороду. Окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи. Коэффициент окислительного фосфорилирования P/O , $P/2e$. Локализация пунктов сопряжения окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи на основании редокс-потенциалов, действия специфических ингибиторов (ротенон, амитал, антимицин А, цианид, CO, NaN_3); выделение белково-липидных комплексов. Организация компонентов дыхательной цепи в виде 4-х комплексов: NADH-дегидрогеназы (комплекс I), сукцинатдегидрогеназы (комплекс II), цитохромов bc_1 (комплекс III), цитохромоксидазы (комплекс IV). Роль коэнзима Q и цитохрома c в интеграции комплексов. Коллекторная функция NAD^+ и коэнзима Q в дыхательной цепи. Полные и редуцированные дыхательные цепи. Представления о механизмах сопряжения окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. Хемосмотическая теория Митчелла. Электрохимический протонный градиент как форма запасания энергии. Строение АТФ-синтазного комплекса. Механизм образования АТФ. Обратимость реакции, катализируемой АТФ-синтазой. Разобщение транспорта электронов и синтеза АТФ, действие 2,4-динитрофенола. Окисление цитоплазматического NADH в дыхательной цепи. Глицеролфосфатный и малат-аспартатный челночные механизмы.

Обмен углеводов

Катаболизм углеводов. Расщепление углеводов в пищеварительном тракте. Амилолитические ферменты: характеристика. Всасывание моносахаридов в тонком кишечнике и их дальнейший транспорт. Анаэробное расщепление глюкозы. Гликолиз. Внутриклеточная локализация процесса. Отдельные реакции гликолиза, их термодинамические характеристики. Окисление Д-глицеральдегид-3-фосфата, сопряжённое с фосфорилированием карбоксильной группы: механизм сопряжения. Образование фосфоенолпирувата. Синтез АТФ в реакциях, катализируемых фосфоглицераткиназой и пируваткиназой. Энергетический баланс анаэробного гликолиза. Регуляция гликолиза на уровне гексокиназы, фосфофруктокиназы пируваткиназы. Регенерация НАД⁺, роль лактатдегидрогеназы в этом процессе. Образование 2,3-дифосфоглицерата в шунте Рапопорта-Люберинга. Расщепление гликогена (гликогенолиз). Строение, механизм действия и регуляция гликогенфосфорилазы. Энергетический баланс превращения остатка глюкозы в гликогене до лактата. Биосинтез гликогена, роль УДФ-глюкозы. Характеристика гликогенсинтазы. Реципрокная регуляция расщепления и синтеза гликогена, роль гормонов в этих процессах. Спиртовое брожение. Эндогенный и экзогенный этанол. Роль печени в метаболизме этанола. Глюконеогенез. Внутриклеточная локализация процесса. Реакции, участвующие в преодолении необратимых стадий: образование фосфоенолпирувата, фруктозо-6-фосфата, глюкозы. Глюконеогенез в печени, скелетных мышцах и мозговой ткани: особенности. Регуляция глюконеогенеза. Цикл Кори (глюкозолактатный цикл). Катаболизм лактозы и галактозы. Два пути окисления фруктозы в печени. Нарушения углеводного обмена. Аэробный метаболизм пирувата. Митохондрии: структура и энергетические функции. Окислительное декарбоксилирование пирувата. Строение мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса. Суммарное уравнение и энергетический баланс окислительного декарбоксилирования пирувата. Регуляция активности пируватдегидрогеназного комплекса: ковалентная модификация, аллостерический механизм. Цикл лимонной кислоты. Отдельные реакции цикла, их термодинамические характеристики. Суммарное уравнение окисления ацетилСоА в цикле Кребса. Необходимость анаэробных путей, пополняющих запас компонентов, участвующих в цикле. Зависимое от АТФ и биотина карбоксилирование пирувата – анаэробный путь синтеза оксалоацетата. Роль цикла лимонной кислоты в катаболизме углеводов. Амфиболическое значение цикла Кребса. Регуляция цикла Кребса на уровне цитратсинтазы, изоцитратдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса. Пентозофосфатный путь (гексозо-монофосфатный шунт) – альтернативный путь окисления глюкозо-6-фосфата. Внутриклеточная локализация процесса. Отдельные реакции: их термодинамические характеристики. Суммарное уравнение пентозофосфатного пути. Циклический характер этого процесса, участки перекреста с гликолизом. Регуляция пентозофосфатного пути на уровне глюкозо-6-

фосфатдегидрогеназы. Биохимическая роль пентозофосфатного пути окисления глюкозы.

Обмен липидов

Катаболизм липидов. Ступенчатое расщепление липидов пищи в желудочно-кишечном тракте. Липолитические ферменты: липаза, фосфолипазы, сфиногмиелиназы. Эмульгирование жиров, роль желчных кислот. Всасывание продуктов расщепления липидов в тонком кишечнике. Тканевой липолиз. Участие в этом процессе триглицерид-, диглицерид- и моноглицеридлипаз. Липопротеинлипаза плазмы крови. Роль сывороточного альбумина в транспорте кровью жирных кислот. Активирование жирных кислот, роль в этом процессе ацилСоА-синтетазы. Транспорт ацилСоА-производных жирных кислот из цитозоля в митохондрии, участие карнитина. Механизм β -окисления насыщенных жирных кислот с четным числом углеродных атомов. Особенности окисления жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. Метаболизм пропионовой кислоты. Окисление моноеновых и полиеновых жирных кислот. Суммарное уравнение β -окисления жирных кислот. Биосинтез жирных кислот. Строение комплекса синтазы жирных кислот. Роль ацилпереносящего (АСР) белка и его 4-фосфопантотеновой «ручки» в функционировании мультиферментного комплекса. Источники НАДРН для биосинтеза жирных кислот. Образование малонилСоА. Механизм наращивания углеродной цепи жирной кислоты. Циклический характер биосинтеза жирных кислот. Четыре этапа цикла: восстановление, конденсация, дегидратация, насыщение. Суммарное уравнение биосинтеза пальмитиновой кислоты. Энергетические затраты на синтез жирных кислот. Роль митохондрий и ЭПР в удлинении углеродного скелета пальмитиновой кислоты и образование моноеновых жирных кислот – пальмитоолеиновой и олеиновой. Десатуразы. Регуляция процессов окисления и биосинтеза жирных кислот. Образование и превращение кетоновых тел: ацетоацетата, β -гидроксибутирата, ацетона. Биосинтез глицерофосфолипидов. Роль СТР в этом процессе. Биосинтез сфингофосфолипидов и гликолипидов. Биосинтез холестерина. Внутриклеточная локализация процесса. Образование изопентенилдифосфата – активной изопреноидной единицы, участвующей в синтезе холестерина и других биологически активных соединений (каротиноидов, витаминов Е, К и А). Три стадии в биосинтезе холестерина: образование мевалоновой кислоты, образование сквалена, многоступенчатое превращение ланостерина в холестерин. ОксиметилглутарилСоА-редуктаза – аллостерический фермент, регулирующий скорость синтеза холестерина. Два пути биосинтеза триацилглицеролов: фосфатидный (α -глицерофосфатный) и β -моноацилглицерольный. Транспорт синтезированных триацилглицеролов из кишечника в кровь. Образование хиломикронов. Биосинтез желчных кислот.

Обмен белков

Общая суточная потребность в белках взрослого человека. Полноценные и неполноценные белки. Расщепление белков в желудочно-кишечном тракте. Протеолитические ферменты. Активация пепсиногена, трипсиногена, химитрипсиногена, прокарбоксипептидаз, проэластазы. Трипсин – ключевой фермент активации всех проферментов, синтезируемых поджелудочной железой. Всасывание продуктов гидролиза белков. Транспорт аминокислот через мембрану кишечного эпителия (симпорт с катионами натрия) и других клеток (γ -глутамильный цикл). Расщепление тканевых белков. Внутриклеточные протеазы. Биологическое значение тканевого протеолиза. Катаболизм аминокислот. Переаминирование. Роль витамина В₆ в этом процессе. Дезаминирование аминокислот и его типы. Окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты. Характеристика L-глутаматдегидрогеназы. Окислительное дезаминирование при участии оксидаз D- и L-аминокислот. Декарбоксилирование аминокислот, образование некоторых биогенных аминов. Метаболизм аммиака. Пути обезвреживания аммиака. Биосинтез мочевины (орнитинный цикл Кребса). Суммарное уравнение синтеза мочевины. Катаболизм углеродного скелета аминокислот. Глико- и кетогенные аминокислоты. Аминокислоты, превращающиеся в ацетилСоА через пируват: аланин, цистеин, триптофан, серин, треонин, глицин. Аминокислоты, превращающиеся в ацетилСоА через ацетоацетилСоА: фенилаланин, тирозин, лизин, триптофан, лейцин. Аминокислоты, превращающиеся в α -кетоглутарат: аргинин, гистидин, глутаминовая кислота, глутамин, пролин. Аминокислоты, превращающиеся в оксалоацетат: аспарагиновая кислота, аспарагин. Аминокислоты, превращающиеся в фумарат: фенилаланин, тирозин. Образование активного сульфата при катаболизме цистина и цистеина. Метионин как метилирующий агент. Образование S-аденозилметионина и реакции, идущие с его участием. Роль тетрагидрофолиевой кислоты в метаболизме аминокислот. Наследственные дефекты метаболизма аминокислот. Превращение аминокислот в специализированные продукты. Синтез серотонина и мелатонина. Биосинтез меланинов. Биосинтез тиреоидных гормонов. Биосинтез катехоламинов. Биосинтез полиаминов. Синтез креатина и креатинина. Синтез гема. Образование конъюгатов глицина и таурина с желчными кислотами.

Обмен нуклеиновых кислот

Катаболизм нуклеиновых кислот. Характеристика нуклеаз (эндонуклеазы, экзонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, рибонуклеазы, рестриктазы). Обмен нуклеозидфосфатов. Расщепление пуриновых оснований. Мочевая кислота – основной продукт катаболизма пуриновых нуклеотидов у человека. Расщепление пиримидиновых оснований. Биосинтез пуриновых нуклеотидов. Источники азота и углерода в пуриновом цикле. Последовательность реакций в синтезе пуриновых нуклеотидов. Образование фосфорибозилпиро-

фосфата. Инозинмонофосфат (ИМФ) – предшественник АМР и ГМР. Превращение АМР и ГМР под действием специфических киназ в нуклеозидди- и трифосфаты. Регуляция биосинтеза пуриновых нуклеотидов по принципу обратной связи. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов. Источники азота и углерода в пиримидиновом цикле. Уридинмонофосфат (УМР) – предшественник других пиримидиновых нуклеотидов. Биосинтез дезоксирибонуклеотидов. Участие в этом процессе тиоредоксина и тиоредоксинредуктазы. Превращение dUMP в dTMP, роль тимидилатсинтетазы и дигидрофолатредуктазы.

Воспроизводство и реализация генетической информации

Биосинтез ДНК у про- и эукариот. Полуконсервативный механизм репликации ДНК, предложенный Дж. Уотсоном и Ф. Криком. Компоненты реплицирующего аппарата клетки. ДНК-полимеразы I, II, III прокариот. ДНК-лигаза: строение, механизм действия. Хеликазы. Топоизомераза I и II. Эукариотические ДНК-полимеразы: α , β , γ . Отличия от ДНК-полимераз прокариот. Механизм ДНК-полимеразной реакции. Этапы биосинтеза ДНК. Инициация репликации. Образование репликативного комплекса ферментов и белковых факторов. Формирование репликативной вилки. Праймосома, компоненты праймосомы. Праймаза, образование праймера. Ведущая и запаздывающая цепи ДНК. Синтез запаздывающей цепи прерывистым способом. Фрагменты Оказаки в про- и эукариотических клетках. Элонгация репликации. Терминация репликации. Биосинтез РНК на ДНК-матрице. РНК-зависимая ДНК-полимераза. Точность процесса репликации. Репарация ДНК. Биосинтез РНК (транскрипция). Промоторы: особенности их нуклеотидных последовательностей. ДНК-зависимая РНК-полимераза *E. coli*, субъединичная структура. Роль σ -фактора в транскрипции. РНК-полимеразы А, В и С эукариотических клеток, внутриядерная локализация. Асимметричность считывания с цепей ДНК. Этапы транскрипции: инициация, элонгация и терминация. Зависимая и независимая от ρ -фактора терминация транскрипции. Особенности транскрипции у эукариот. Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции. Работы Жакоба и Моно. Белки-регуляторы (активаторы и репрессоры). Регуляция экспрессии лактозного оперона: негативная регуляция, позитивная регуляция комплексом сАМР-БАК (белок – активатор катаболизма). Регуляция экспрессии триптофанового оперона: репрессия, аттенуация транскрипции. Процессинг первичных транскриптов в про- и эукариотических клетках. Процессинг мРНК: кэппинг, удаление лишних нуклеотидных последовательностей, присоединение поли(А)-фрагмента, сплайсинг. Сплайсосома. Роль малых ядерных РНК в вырезании интронов из первичных транскриптов. Рибозимы. Транспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Информомеры и информосомы. Генетическая инженерия. Генетический код: основные характеристики. Синтез белка (трансляция). Белоксинтезирующий аппарат клетки. Синтез белка в прокариотических клетках. Активирование амино-

кислот. Характеристика аминоксил-тРНК-синтетаз. Строение рибосом, формирование функциональных центров. Инициация трансляции. Белковые факторы инициации. Образование функционально активной 70 S-рибосомы. Элонгация трансляции. Белковые факторы элонгации. Последовательность событий в процессе элонгации. Элонгация – циклический процесс. Терминация трансляции. Белковые факторы терминации. Точность процесса трансляции. Энергетические затраты на синтез белка. Ингибиторы трансляции. Посттрансляционное сворачивание белковой молекулы. Роль шаперонов в этом процессе. Посттрансляционная модификация белков.

Регуляция биохимических процессов

Катаболические, анаболические и амфиболические пути. Потенциальная опасность «холостых» циклов в метаболизме. Регуляция метаболизма путем изменения количества ферментов. Регуляция метаболизма путем изменения активности ферментов. Согласованность клеточного метаболизма с физиологическими потребностями организма. Внеклеточная регуляция гормонами. Классификация гормонов. Механизм действия гормонов белковой, пептидной природы и производных аминокислот. Взаимодействие этих гормонов с рецепторами на мембране клеток. Аденилатциклаза и образование вторичного посредника – сАМР. Роль G-белков в трансдукции гормонального сигнала. сАМР – аллостерический регулятор протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании различных внутриклеточных белков. Инозитолтрифосфат, ионы кальция, диацилглицерол и сGMP как вторичные мессенджеры. Механизм действия стероидных и тиреоидных гормонов. Образование комплекса гормон-цитоплазматический рецептор, транслокация его в ядро, регуляция транскрипции определенных генов.

При выполнении лабораторных работ вам поможет приложение. В него включены сокращения, а также множители и приставки, применяемые для обозначения кратных и дольных единиц ([табл. 1 приложения](#)), показатели нормы основных клинико-биохимических исследований ([табл. 2 приложения](#)).

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Работая в лаборатории, необходимо соблюдать меры предосторожности, придерживаясь следующих правил.

Общие сведения

Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде.

Работать в биохимической лаборатории допускается только в специальном халате, так как вероятна возможность загрязнения, порчи одежды при попадании на нее едких реактивов.

Обращение с реактивами

Все концентрированные кислоты и щелочи должны находиться в вытяжном шкафу.

Все опыты с ядовитыми и неприятно пахнущими веществами проводить в вытяжном шкафу.

Наливать или насыпать реактивы следует только над столом.

Не следует оставлять открытыми банки с реактивами.

Пролитые или рассыпанные реактивы нужно немедленно удалить со стола, вытерев стол тряпкой и обмыв водой.

Пролитые концентрированные кислоты следует засыпать песком, затем собрать песок лопаткой. Облитое место необходимо облить раствором соды и вытереть тряпкой.

При работе с органическими растворителями (спирты, эфиры, ацетон, бензин и др.) нельзя определять вещество по запаху, так как может произойти отравление их парами.

Наполнение пипеток растворами органических растворителей, кислот, щелочей проводят только при помощи груши.

Внимательно следить за тем, чтобы реактивы (особенно кислоты и щелочи) не попадали на лицо, руки и одежду.

Не ходить по лаборатории с емкостями с концентрированными кислотами в руках, а наливать их только в определенном, отведенном для этого месте.

Не загрязнять реактивы во время работы (не путать пробки от склянок, содержащих разные реактивы; избыток взятого реактива не выливать обратно в склянку; пользуясь пипеткой, набирать каждый реактив только предназначенной для этого пипеткой, ни в коем случае не путать их).

В случае попадания на кожу концентрированной кислоты облитое место нужно промыть большим количеством воды, а затем разбавленным рас-

твором соды. При попадании растворов щелочей на кожу пораженное место нужно обмыть сначала разбавленной кислотой, а потом водой.

Обращение с нагревательными приборами

Перед тем как зажечь спиртовку, убедиться в том, что поблизости нет горючих жидкостей (спирт, эфир и др.).

Зажигать спиртовку можно только спичкой.

В пробирке можно нагревать только небольшое количество раствора, жидкость должна занимать не более 1/3 объема пробирки.

Пробирку при нагревании нужно направить в сторону от себя и рядом находящихся людей.

Нельзя наклоняться над спиртовкой. Вначале пробирку с раствором нужно прогреть всю, а затем нагревать в нужном месте, не вынимая из пламени спиртовки.

Нельзя нагревать пробирку долго в одном месте, так как жидкость быстро закипит и выплеснется из пробирки.

Нагревать пробирку нужно ниже уровня жидкости в ней.

При нагревании жидкости держать пробирку отверстием в сторону от себя и тех, кто находится рядом, не касаться пробиркой горящего фитиля, всегда соблюдать большую осторожность при нагревании, не допускать выплескивания жидкости (время от времени отводить пробирку от пламени, не нагревать ее в вертикальном положении), не приближать лицо к сосуду, в котором нагревается жидкость.

После нагревания следует сразу затушить спиртовку, накрыв пламя колпачком.

Работа с водяной баней осуществляется только под тягой.

При неосторожной работе возможны ожоги нагретой стеклянной посудой. При ожогах на обожженное место нужно положить ватку, смоченную раствором марганцовокислого калия.

Закончив работу, привести рабочее место в порядок.

А вот как интерпретировал эти правила академик М. Г. Воронков.

«Если вы откупорили что-либо – **закупорьте**.

Если в руках у вас жидкое – **не разлейте**, порошкообразное – **не насыпьте**, газообразное – **не выпустите наружу**.

Если включили – **выключите**.

Если открыли – **закупорьте**.

Если разобрали – **соберите**.

Если вы не можете собрать – **позовите на помощь умельца**.

Если вы не разбирали – **не вздумайте собирать**.

Если вы одолжили что-нибудь – **верните**.

Если вы пользуетесь чем-либо – **держите в чистоте и порядке**.

Если вы привели что-нибудь в беспорядок – *восстановите статус-кво*.

Если вы сдвинули что-либо – *верните на место*.

Если вы хотите воспользоваться чем-либо, принадлежащим другому, *попросите разрешения*.

Если вы не знаете, как это делается, ради Бога, *не трогайте*.

Если это вас не касается – *не вмешивайтесь*.

Если вы не знаете, как это делается, *сразу спросите*.

Если не можете что-то понять – *почешите в затылке*.

Если все же не поймете – *то и не пытайтесь*.

Если вы горите на работе – *попытайтесь, чтобы у вас ничего не загоралось*.

Если у вас что-либо взорвалось, *проверьте, остались ли вы живы*.

Если не усвоили этих правил – *не входите в лабораторию»* [\[10; С. 431\]](#).

Эти правила он назвал «правилами выживания в химической лаборатории».

ЧАСТЬ 1

РАЗДЕЛ 1. УГЛЕВОДЫ

Углеводами называют полиоксиальдегиды и полиоксикетоны с общей формулой $(\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O})_n$, а также производные этих соединений. В организме человека и животных углеводы выполняют разнообразные функции. Они служат источником энергии, являются пластическим материалом для построения клеток, а также используются в качестве исходных продуктов для синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот. Углеводы классифицируются на моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Моносахариды, или простые сахара, состоят из одной полиоксиальдегидной или полиоксикетонной единицы.

Олигосахариды содержат в своем составе 2–10 остатков моносахаридов, связанных между собой гликозидными связями.

Полисахариды содержат более 10 остатков моносахаридов и подразделяются на гомополисахариды и гетерополисахариды.

1.1. Открытие углеводов в растворах

Работа 1. Реакция Подобедова-Молиша

Чувствительными реакциями на углеводы являются реакции с α -нафтолом и тимолом.

Реактивы: раствор сахарозы, α -нафтол, тимол, концентрированная H_2SO_4 .

Оборудование: пробирки, капельницы, пипетки.

Ход работы. В две пробирки наливают по 0,5 мл раствора сахарозы. В первую пробирку добавляют 1–2 капли раствора α -нафтола, во вторую – 1–2 капли раствора тимола. В обе пробирки осторожно наслаивают концентрированную серную кислоту. Серная кислота опускается на дно пробирки, и на границе двух жидкостей образуется в случае с α -нафтолом фиолетовое кольцо, в случае с тимолом – красноватое. Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, образующиеся из углеводов под действием серной кислоты, конденсируясь с двумя молями сульфированного α -нафтола или тимола, дают хромогены, которые окисляются серной кислотой в окрашенное хиноидное соединение.

Подобные реакции дают все углеводы (кроме глюкозамина).

Работа 2. Открытие фруктозы (реакция Селиванова)

Реактивы: раствор фруктозы, раствор глюкозы, реактив Селиванова.

Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

Ход работы. В первую пробирку вносят 0,5 мл раствора фруктозы, во вторую – 0,5 мл раствора глюкозы. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл реактива Селиванова. Пробирки осторожно нагревают на спиртовке. В пробирке с фруктозой постепенно наблюдается красное окрашивание. На первой стадии образуется оксиметилфурфурол, который во второй стадии, конденсируясь с резорцином, дает красное окрашивание.

Работа 3. Реакция крахмала и гликогена с йодом

Реактивы: раствор крахмала, раствор Люголя, 10%-ный раствор NaOH, этиловый спирт.

Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

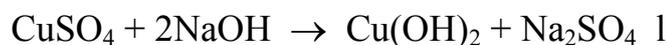
Ход работы. К 2 мл раствора крахмала прибавляют 1–2 капли раствора Люголя. Раствор окрашивается в синий цвет. Содержимое пробирки делят на три части: к первой части прибавляют 1 мл раствора NaOH, ко второй – 2 мл этилового спирта, третью часть содержимого нагревают. Во всех случаях окраска исчезает, но в третьей пробе окраска вновь появляется при охлаждении. Реакция основана на образовании нестойкого адсорбционного соединения йода с амилозой.

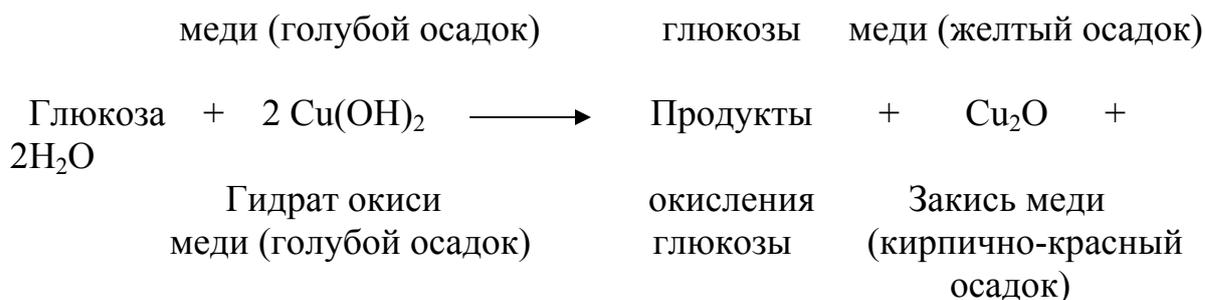
1.2. Восстанавливающие свойства углеводов

Углеводы, в составе которых имеются свободные карбонильные группы, дают ряд реакций, основывающихся на окисляемости этой группы.

Работа 4. Реакция Троммера

В основе реакции Троммера лежит окислительно-восстановительный процесс: в щелочной среде при нагревании альдегидная группа сахара окисляется, а гидрат окиси меди (осадок голубого или синего цвета) восстанавливается в гидрат закиси меди (кирпично-красный осадок). Углевод при этом дает различные продукты окисления, так как при окислении в щелочной среде моносахариды претерпевают глубокие изменения с расщеплением углеродной цепи. Среди продуктов окисления не удастся выделить кислоту с тем же числом атомов углерода, как у исходного сахара (в отличие от окисления обычных альдегидов). Сахара, не имеющие свободной альдегидной группы, пробу Троммера не дают. Окислительно-восстановительную реакцию можно представить в виде следующей схемы:





Реактивы: 0,5-процентные растворы глюкозы, фруктозы, сахарозы, мальтозы и крахмала, 2 н раствор NaOH, 0,2 н раствор CuSO₄.

Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

Ход работы. В пробирку наливают раствор глюкозы и 6–8 капель 2н NaOH. Затем по каплям добавляют 0,2 н раствор CuSO₄ до образования нерастворимого голубого осадка. Осторожно нагревают пробирку на спиртовке. Голубой, нерастворимый в воде осадок гидрата окиси меди (II) постепенно переходит в желтый, а затем – в красный осадок закиси меди (I). Это указывает на положительную реакцию Троммера.

Аналогичный опыт проводят с сахарозой, мальтозой, фруктозой и крахмалом. Делают заключение о восстанавливающих свойствах этих углеводов.

Избыток медной соли маскирует реакцию, так как гидроокись меди (II) при нагревании теряет воду и дает черный оксид меди (II).

Работа 5. Количественное определение редуцирующих сахаров. Титрование раствором Фелинга

Метод основывается на принципе пробы Троммера. Благодаря добавлению сегнетовой соли обеспечивается удержание в растворе гидроокиси меди в виде комплексного соединения. Вследствие этого раствор становится более удобным для количественного определения. Употребляют два раствора, которые должны храниться отдельно.

Реактивы: Раствор 1. Растворяют 34,639 г чистой кристаллической сернокислой меди в 500 мл воды. Раствор 2. Растворяют 173 г совершенно чистой сегнетовой соли в небольшом количестве воды, приливают 100 мл 50-процентной натронной щелочи и доливают водой до 500 мл. Перед употреблением смешивают равные объемы растворов 1 и 2. 20 мл этого раствора соответствуют 0,1 г глюкозы.

Оборудование: колбочки, кипящая водяная баня, бюретка.

Ход работы. Точно отмеривают 20 мл фелинговой жидкости в колбу и разбавляют ее 80 мл воды. Этот раствор нагревают до начинающегося кипения и приливают сюда же из бюретки некоторое количество исследуемого

раствора сахара. Кипятят несколько секунд и, если жидкость при этом остается синей, добавляют некоторое количество испытуемого раствора. Эти операции продолжают до тех пор, пока жидкость над образовавшимся красным осадком Cu_2O не станет бесцветной (но не желтой). Затраченное для достижения этого момента количество испытуемого раствора содержит 0,1 г глюкозы. Метод является быстрым, но не очень точным.

1.3. Полисахариды

Работа 6. Кислотный гидролиз крахмала

Реактивы: 0,1-процентный раствор крахмала, 2 н раствор H_2SO_4 , раствор Люголя, 2 н раствор $CuSO_4$, 2 н раствор $NaOH$.

Оборудование: колбочка, пробирки, пипетки, спиртовка.

Ход работы. В колбочку помещают 5 мл 0,1-процентного раствора крахмала, 3 мл 2 н раствора серной кислоты. Нагреть на спиртовке в течение 5 мин, отбирая пипеткой поминутно по 0,5 мл гидролизата и добавляя в них по 1 капле раствора Люголя.

Обратить внимание на изменение окраски гидролизата с йодом в ходе гидролиза. С оставшимся гидролизатом проделать реакцию Троммера. По результатам реакции сделать вывод о строении крахмала.

Работа 7. Выделение гликогена из печени

Исследуемый материал: печень крысы.

Реактивы: 5-процентный раствор ТХУ, дистиллированная вода, раствор Люголя.

Оборудование: ступка, пестик, фильтры, пробирки, пипетки.

Ход работы. 0,5 г печени крысы помещают в ступку, добавляют 3 мл 5-процентного раствора ТХУ и растирают пестиком 10 минут. Затем к экстракту добавляют 5 мл дистиллированной воды, суспензию перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, смоченный водой. С фильтратом проделывают реакцию с раствором Люголя. Сделать соответствующий вывод.

Контрольные вопросы

1. Что называют углеводами?
2. Какова классификация углеводов?
3. Какие углеводы относятся к редуцирующим?
4. Каковы принципы методов обнаружения: а) глюкозы; б) фруктозы; в) мальтозы, сахарозы?
5. В чем сходство и различие в строении крахмала и гликогена?

РАЗДЕЛ 2. ЛИПИДЫ

Липиды – органические соединения, нерастворимые в воде, но растворимые в органических растворителях. К липидам относятся нейтральные жиры и жироподобные вещества (липоиды). Липиды экстрагируют из тканей при помощи органических растворителей (хлороформ, спирт, эфир и др.). По своей химической природе липиды чаще всего являются сложными эфирами жирных кислот и многоатомных спиртов. Биологическая роль липидов многообразна, но в основном они выполняют структурную (входят в состав мембран) и энергетическую (при окислении липидов освобождается большое количество энергии) функции.

Классификация липидов. 1. Простые липиды: а) нейтральные жиры (глицериды, глицеролы); б) воска. 2. Сложные липиды: а) фосфолипиды; б) гликолипиды. 3. Липоиды: а) стерины и стероиды; каротиноиды; в) терпеноиды.

Работа 8. Определение кислотного числа

Кислотное число характеризует кислотность жира и измеряется оно количеством миллиграммов гидроксида калия, необходимым для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Кислотное число наряду с другими физико-химическими показателями характеризует качество масла. Например, если масло получено из зрелых семян, то свободных жирных кислот в нем мало, в масле же незрелых семян содержание свободных жирных кислот значительно. При хранении масла наблюдается гидролиз глицеридов, который приводит к накоплению свободных жирных кислот, то есть к нарастанию кислотности. Повышенная кислотность масла указывает на снижение его качества.

Метод определения кислотного числа основан на том, что свободные жирные кислоты, имеющиеся в масле, оттитровывают 0,1 н раствором КОН. Обычно титрование проводят гидроксидом калия, а не натрия, так как образующиеся калиевые мыла лучше растворяются в условиях опыта.

Реактивы: масло растительное или жир животный, этиловый спирт, 0,1 н раствор КОН в этиловом спирте, фенолфталеин.

Оборудование: весы, колба коническая, цилиндр мерный, пипетки, бюретка.

Ход работы. Для определения кислотного числа навеску жира (масла) в 2 г помещают в коническую колбу и растворяют в 10 мл нейтральной смеси спирта и эфира (1:1). После растворения жира в колбу вносят 1–2 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н спиртовым раствором гидроксида калия до слабо-розового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать в течение одной минуты.

Кислотное число определяют по формуле

$$\text{Кислотное число} = V \cdot T / a,$$

где V – количество (мл) 0,1 н раствора КОН, израсходованное на титрование взятой навески жира; T – титр 0,1 н раствора КОН (мг); a – навеска жира (г).

Работа 9. Определение числа омыления

Числом омыления называется количество миллиграммов КОН, необходимое для нейтрализации как свободных, так и связанных жирных кислот, содержащихся в 1 г масла.

Содержание свободных жирных кислот в масле характеризуется кислотным числом, а содержание кислот, связанных в виде эфиров, – эфирным числом, то есть количеством миллиграммов КОН, необходимым для нейтрализации освобождающихся при омылении эфирных связей жирных кислот в 1 г масла.

Экспериментально эфирное число определяется по разности между числом омыления и кислотным числом.

Реактивы: 0,5 н спиртовой раствор КОН, 0,5 н HCl, фенолфталеин.

Оборудование: весы, баня водяная, колбы конические, пробирки с обратным холодильником, пипетки, бюретка.

Ход работы. В одну пробирку вносят 0,5 г жира, а в другую – 0,5 мл воды; затем в обе пробирки добавляют по 5 мл 0,5 н спиртового раствора КОН. Пробирки закрывают пробками с обратными воздушными холодильниками и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин при периодическом встряхивании. По окончании омыления содержимое пробирок выливают в колбы, добавляют по 5 мл воды, 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 н раствором HCl до исчезновения розовой окраски (определяют количество несвязавшейся щелочи). Исходя из того, что 1 мл 0,5 н раствора КОН соответствует его 28 мг, расчет числа омыления ведут по формуле

$$\text{Число омыления} = (V_1 - V_2) \cdot 28 / a,$$

где V_1 – количество (мл) 0,5 н. раствора HCl, затраченное на титрование контроля (колба с водой); V_2 – количество (мл) 0,5 н раствора HCl, затраченное на титрование опыта (колба с жиром); a – навеска жира (г).

Работа 10. Обнаружение желчных кислот в моче (проба Петенкофера)

Проба основана на образовании окрашенного продукта при взаимодействии желчных кислот и оксиметилфурфурола, который образуется из сахара при действии концентрированной серной кислоты.

Исследуемый материал: моча.

Реактивы: концентрированная серная кислота, 5-процентный раствор сахарозы.

Оборудование: пробирки, пипетки.

Ход работы. В пробирку налить 5 мл мочи, добавить 10 капель раствора сахарозы и осторожно, по стенке пробирки, добавить 10 капель концентрированной серной кислоты. Не взбалтывать! Пробирку оставить на 10–15 мин в штативе.

При наличии в моче желчных кислот на границе жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо.

Работа 11. Качественные реакции на обнаружение витамина Е

Взаимодействие α -токоферола с концентрированной азотной кислотой приводит к окрашиванию реакционной смеси в красный цвет. Это обусловлено тем, что продукт окисления α -токоферол имеет хиноидную структуру. При взаимодействии с хлорным железом (III) α -токоферол окисляется до α -токоферилхинона – соединения, окрашенного в красный цвет.

Реактивы: спиртовой раствор α -токоферола, концентрированная HNO_3 , 1-процентный раствор FeCl_3 .

Оборудование: пробирки, пипетки.

Ход работы. *Реакция с азотной кислотой.* В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора витамина Е и добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты. Пробирку интенсивно встряхивают и наблюдают постепенное появление красного окрашивания.

Реакция с хлорным железом. В сухую пробирку вносят 0,5 мл спиртового раствора витамина Е, затем – 0,5 мл раствора хлорного железа. Тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдают появление красного окрашивания.

Работа 12. Качественные реакции на ацетон и ацетоуксусную кислоту

К кетоновым телам относятся ацетон, β -оксимасляная кислота и ацетоуксусная кислота. Биосинтез кетоновых тел происходит в печени. У здорового человека в печени ацетоацетил-СоА конденсируется с ацетил-СоА с образованием β -окси- β -метилглутарил-СоА. В крови в норме они содержатся в очень небольшом количестве: 13,4–185 мкмоль/л (0,14–1,9 мг%). В моче ацетоновые тела также содержатся в небольшом количестве и не выявляются обычными реакциями.

Повышенное выделение кетоновых тел из организма – ацетонурия – наблюдается при нарушении жирового или углеводного обмена. Образование кетоновых тел происходит в печени, откуда они доставляются другим тканям в качестве энергетического материала.

Исследуемый материал: моча, содержащая ацетон и ацетоуксусную кислоту.

Реактивы: нитропруссид натрия, ледяная уксусная кислота, 10-процентная NaOH.

Оборудование: пробирки, пипетки.

Ход работы. *Проба Люголя на ацетон.* Ацетон и ацетоуксусная кислота в щелочной среде образуют с нитропруссидом натрия оранжево-красное окрашивание. После подкисления ледяной уксусной кислотой образуется соединение вишневого цвета.

В пробирку наливают 0,5 мл мочи, 0,5 мл NaOH, 0,5 мл нитропруссид натрия. Появляется оранжево-красное окрашивание. Добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты – появляется вишнево-красное окрашивание.

Клинико-диагностическое значение. Гиперкетонемия и кетурия наблюдаются при сахарном диабете, приеме кетогенной пищи (дефицит углеводов), голодании, гиперпродукции гормонов-антагонистов инсулина, кортикостероидов. Когда печень бедна гликогеном, происходит усиленный распад жиров как источника энергии. В раннем детском возрасте продолжительные желудочно-кишечные заболевания (дизентерия, токсикозы) могут вызвать кетонемия в результате голода и истощения.

Контрольные вопросы

1. Какова классификация липидов.
2. Что такое число омыления, и как оно определяется?
3. Что такое кислотное число, как оно определяется и что характеризует?
4. Раскройте принцип метода определения желчных кислот.
5. Раскройте принцип метода определения кетоновых тел.
6. Раскройте принцип метода определения витамина E.
7. Каково клинико-диагностическое значение определения содержания кетоновых тел в сыворотке крови и моче?

РАЗДЕЛ 3. БЕЛКИ

Белки представляют собой высокомолекулярные полимерные органические соединения, структурными единицами которых являются аминокислоты. Аминокислоты в молекуле белка соединены между собой пептидными связями ($-\text{CO} - \text{NH} -$), образуя полипептидные цепи. Пептидная связь возникает между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой, что сопровождается выделением молекулы воды. В белках различают несколько уровней структурной организации. *Первичная структура* белка определяется числом и последовательностью аминокислотных остатков, соединенных между собой при помощи пептидной связи. *Вторичная структура* возникает за счет образования водородных связей между группами $\text{N} - \text{H}$ и $\text{O} = \text{C}$ данной полипептидной цепи, что приводит к упорядоченному расположению гибкой полипептидной цепи в виде спиральной или складчатой структуры. *Третичная структура* возникает в результате взаимодействия между боковыми цепями аминокислотных остатков полипептидных цепей. К таким взаимодействиям относятся водородные, дисульфидные и ионные связи, ван-дер-ваальсовы и гидрофобные силы. В результате таких взаимодействий полипептидная цепь свертывается очень сложным, но вместе с тем определенным образом, приобретая характерную пространственную конфигурацию. Межмолекулярные взаимодействия между отдельными полипептидными цепями, обладающими вторичной и третичной структурой, могут приводить к образованию агрегатов, то есть к возникновению *четвертичной структуры* белка. Структура белковой молекулы очень лабильна и легко разрушается под влиянием различных физических и химических воздействий, в результате чего изменяются ее биологические и физико-химические свойства.

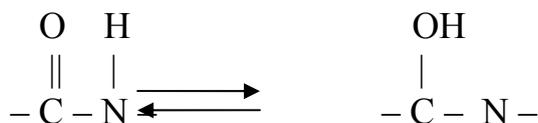
3.1. Химическая природа белка (цветные реакции)

Присутствие белка в растворах можно обнаружить с помощью цветных реакций, обусловленных наличием в белке аминокислот, их специфических групп и пептидных связей. Существуют универсальные цветные реакции, т. е. на все белки (биуретовая и нингидриновая), и специфические, т. е. на определенные аминокислоты (ксантопротеиновая, Миллона, Фоля и др.).

Работа 13. Биуретовая реакция на пептидную связь (Пиотровского)

Биуретовая реакция обусловлена наличием в белке пептидных связей, которые в щелочной среде образуют с сернокислой медью комплексы фиолетового цвета с красным или синим оттенком. Группа, образующая пептид-

ную связь, в щелочной среде присутствует в своей таутомерной енольной форме:



При избытке щелочи происходит диссоциация ОН-группы, появляется отрицательный заряд, с помощью которого кислород взаимодействует с медью. Возникает солеобразная связь. Кроме того, медь образует дополнительные координационные связи с атомами азота, участвующими в пептидной связи, путем использования их электронных пар. Возникающий таким образом комплекс очень стабилен. Интенсивность окраски комплекса зависит от концентрации белка и количества медной соли в растворе.

Биуретовой реакцией обнаруживаются все без исключения белки, а также продукты их неполного гидролиза – пептоны и полипептиды. Для ди- и трипептидов биуретовая реакция ненадежна. Оттенок зависит от длины полипептидной цепочки. Пептоны при этой реакции дают розовое или красное окрашивание. Биуретовая реакция положительна и с веществами небелкового характера, имеющими в составе не менее двух –СО – NH₂-групп, к ним относятся, например, оксамид – NH₂ – СО – СО – NH₂, биурет – N₂H – СО – NH – СО – NH₂.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1-процентный раствор желатины.

Реактивы: 10-процентный раствор NaOH, 1-процентный раствор CuSO₄.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Ход работы. К 5 каплям водного раствора белка добавляют 3 капли 10-процентного раствора NaOH и 1 каплю 1-процентного раствора CuSO₄. Содержимое перемешивают. Оно приобретает сине-фиолетовый цвет. Нельзя добавлять избыток CuSO₄, так как синий осадок маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса.

Работа 14. Нингидриновая реакция на α-аминокислоты

Белки, полипептиды и свободные α-аминокислоты дают синее или фиолетовое окрашивание с нингидрином. При нагревании белка с водным раствором нингидрина аминокислоты окисляются и распадаются, образуя СО₂, NH₃ и соответствующий альдегид. Нингидрин, являясь сильным окислителем, вызывает окислительное дезаминирование α-аминокислоты, приводящее к образованию аммиака, двуокиси углерода, соответствующего альдегида и восстановленной формы нингидрина. Нингидрин восстанавливается и связывается со второй молекулой нингидрина посредством молекулы аммиа-

ка, образуя продукты конденсации, окрашенные в синий, фиолетовый, красный, а в случае пролина – в желтый цвет.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1-процентный раствор желатины.

Реактивы: нингидрин, 1-процентный водный раствор.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Ход работы. К 5 каплям раствора белка приливают 5 капель 0,1-процентного водного раствора нингидрина и кипятят 1–2 мин. Появляется розово-фиолетовое окрашивание. С течением времени раствор синееет. Данная реакция не специфична, так как ее дают некоторые амины и амиды кислот.

Работа 15. Ксантопротеиновая реакция на циклические аминокислоты (Мульдера)

Ксантопротеиновая реакция открывает наличие в белках циклических аминокислот – триптофана, фенилаланина, тирозина, – содержащих в своем составе бензольное ядро. Большинство белков при нагревании с концентрированной азотной кислотой дает желтое окрашивание, переходящее в оранжевое при подщелачивании. Реакция обусловлена нитрованием бензольного кольца этих аминокислот с образованием нитросоединений желтого цвета. При подщелачивании возникает хиноидная структура, окрашенная в оранжевый цвет.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1-процентный раствор желатины.

Реактивы: концентрированная HNO_3 , 10-процентный раствор NaOH .

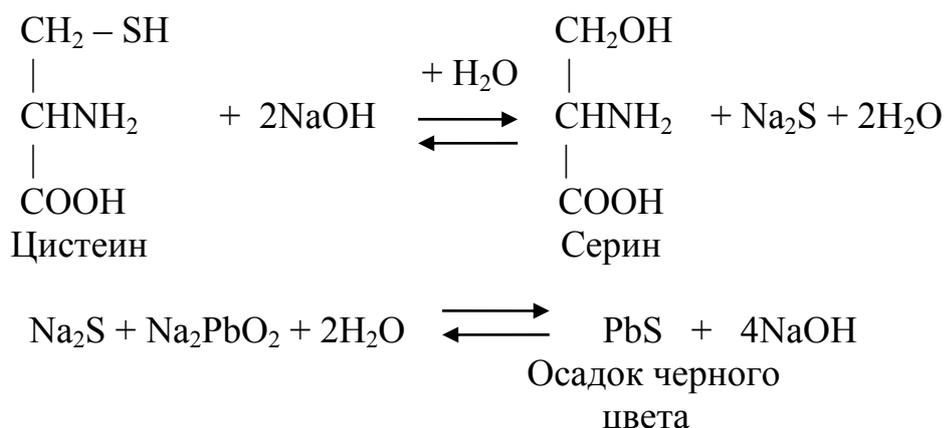
Оборудование: пробирки, капельницы.

Ход работы. К 5 каплям раствора белка добавляют 3 капли концентрированной HNO_3 и осторожно кипятят. Вначале появляется осадок свернувшегося белка (под влиянием кислоты), который при нагревании окрашивается в желтый цвет. После охлаждения в пробирку наливают по каплям 10-процентный раствор NaOH (до появления оранжевого окрашивания вследствие образования натриевой соли динитротирозина).

Работа 16. Реакция Фоля на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу (цистеин, цистин)

Реакция Фоля указывает на присутствие в белке аминокислот цистина и цистеина, содержащих слабосвязанную серу. В метионине сера имеет прочное соединение, поэтому эту реакцию не дает. Реакция состоит в том, что при кипячении белка со щелочью цистеин или цистин легко отщепляют серу в виде сернистого натрия, который с плюмбитом дает черный или бурый осадок сернистого свинца. Интенсивность окраски зависит от количества в белке аминокислот цистина и цистеина и от концентрации белка в растворе.

Реакция протекает по следующим уравнениям:



Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1-процентный раствор желатины.

Реактивы: 30-процентный раствор NaOH, 5-процентный раствор $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Ход работы. В одну пробирку наливают раствор яичного белка, в другую – раствор желатины. В каждую пробирку добавляют по 5 капель раствора 30-процентного NaOH и по 1 капле 5-процентного раствора $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$. При интенсивном кипячении жидкость в пробирке с яичным белком темнеет, образуя черный осадок сернистого свинца. В пробирке с желатиной черного осадка не образуется, так как желатина почти не содержит серосодержащих аминокислот.

Оформление работы. Результаты работ оформляют в виде табл. 1.

Таблица 1

Название реакции	Исследуемый материал	Употребляемые реактивы	Наблюдаемая окраска	Чем обусловлена реакция?

Контрольные вопросы

1. Что такое белок?
2. Как связаны между собой аминокислоты в молекуле белка? Напишите трипептид из различных аминокислот. С помощью какой реакции можно их открыть?
3. Напишите аминокислоты, имеющие в своем составе бензольное кольцо. С помощью какой реакции их можно открыть?

4. Напишите аминокислоты, содержащие серу. С помощью какой реакции их можно открыть?
5. Что открывает нингидриновая реакция?
6. Значение цветных реакций на белки.
7. Классификация аминокислот. Строение (формулы) и номенклатура аминокислот.
8. Перечислите структуры белков.
9. Какие существуют дополнительные связи (помимо основной пептидной), сохраняющие пространственную конфигурацию молекулы белка?

3.2. Физико-химические свойства белка

3.2.1. Реакции осаждения белков

Для осаждения белка нужно лишить его факторов, удерживающих белок в растворе, используя различные агенты, снижающие заряд или разрушающие гидратную оболочку белковой частицы. Реакции осаждения могут быть обратимыми и необратимыми.

1. *Обратимые* реакции осаждения не приводят к глубоким изменениям структуры белка, поэтому получаемые осадки могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе. Белки при этом сохраняют свои начальные нативные, включая биологические, свойства.

2. *Необратимые* реакции вызывают глубокие изменения структуры белка, поэтому получаемые осадки не могут быть растворены в первоначальных растворителях. Наступает денатурация белка. Денатурацией называют такое изменение белка, при котором он утрачивает свои естественные биологические и физико-химические свойства, становится менее гидрофильным и теряет способность растворяться в воде.

Практическое значение реакций осаждения белков состоит в том, что они дают возможность: 1) изучить свойства белков; 2) освободить жидкость от присутствия белка; 3) установить наличие белка в моче при патологических состояниях; 4) разделить отдельные белковые фракции на альбумины и глобулины.

Работа 17. Осаждение белков при нагревании

Почти все белки денатурируют при нагревании (50–55 °С и выше). Механизм тепловой денатурации связан с перестройкой структуры белковой молекулы, в результате которой белок теряет свои нативные свойства, уменьшается его растворимость (уменьшение гидрофильных свойств ведет к нарушению гидратной оболочки). Присутствие солей и концентрация водородных ионов играют важную роль в выпадении в осадок денатурированного при нагревании белка. Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в

изоэлектрической точке белка, то есть при такой величине рН, при которой коллоидные частицы белка являются наименее устойчивыми. Поэтому для полного осаждения белка при нагревании следует создавать реакцию среды, соответствующую его изоэлектрической точке. Белки, обладающие кислыми свойствами, осаждают в слабокислой среде, белки, обладающие щелочными свойствами, – в слабощелочной. В сильнокислых и сильнощелочных растворах денатурированный при нагревании белок не выпадает в осадок, так как частицы белка перезаряжаются (или происходит усиление имеющегося заряда) и несут в первом случае положительный, во втором – отрицательный заряд. Это повышает их устойчивость в растворе в результате электростатических сил отталкивания. Поэтому в сильнокислых и сильнощелочных растворах белки обычно не выпадают в осадок при нагревании. Однако в сильнокислых растворах белки могут коагулировать при добавлении достаточного количества какой-либо нейтральной соли. Степень влияния ионов нейтральных солей на осаждаемость белков зависит от их способности адсорбироваться на частицах белка. Адсорбированные ионы солей (если они противоположны по знаку заряду коллоидной частицы) нейтрализуют заряд частицы. Наступает момент, когда силы притяжения между молекулами превышают силы отталкивания – и белок выпадает в осадок.

Исследуемый материал: раствор яичного белка.

Реактивы: 1-процентный раствор CH_3COOH , 10-процентный раствор NaOH , насыщенный раствор NaCl .

Оборудование: пробирки, капельницы, спиртовка.

Ход работы. В 5 пробирок наливают по 5 капель раствора яичного белка (без NaCl). В первой пробирке нейтральный раствор нагревают до кипения. Жидкость мутнеет, поскольку разрушаются водные оболочки вокруг молекул белка и происходит укрупнение его частиц. Мицеллы белка несут заряд и удерживаются во взвешенном состоянии. Во 2-й пробирке раствор белка нагревают до кипения и прибавляют 1 каплю 1-процентного раствора уксусной кислоты (для слабого подкисления). Через некоторое время выпадает хлопьевидный осадок белка. Частицы белка теряют заряд и приближаются к изоэлектрическому состоянию. В 3-ю пробирку добавляют 5 капель 1-процентного раствора уксусной кислоты (для получения сильнокислой реакции среды). При кипячении жидкости осадка не образуется, поскольку белковые мицеллы перезаряжаются и несут положительный заряд, что повышает их устойчивость. В 4-ю пробирку добавляют 2 капли 10-процентного раствора NaOH , создавая щелочную среду. При кипячении жидкости осадка не образуется, поскольку в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка увеличивается. В 5-ю пробирку наливают 5 капель 1-процентного раствора уксусной кислоты и 2 капли насыщенного раствора NaCl и нагревают. Выпадает белый хлопьевидный осадок белка, так как частицы белка теряют заряд вследствие взаимодействия белка с разноименно заряженными ионами хлористого натрия.

Оформление работы. Записать в табл. 2 результаты осаждения белков при кипячении в различных средах и в каждом случае указать причину появления или отсутствия осадка белка.

Таблица 2

Щелочная среда	Нейтральная среда	Слабокислая среда	Сильнокислая среда	Сильнокислая среда+электролит

Работа 18. Осаждение белка органическими растворителями

Белки нерастворимы во многих органических растворителях. Однако их осаждение происходит только из нейтральных и слабокислых растворов и особенно полно в присутствии электролитов (ионные соли связываются коллоидными частицами и снимают заряд). Органические растворители дегидратируют частицы белка (разрушают водную оболочку) и этим понижают их устойчивость в растворе. Кратковременное воздействие органических растворителей сохраняет белок в естественном состоянии, продолжительное воздействие приводит к денатурации.

Исследуемый материал: раствор яичного белка.

Реактивы: спирт или ацетон, насыщенный раствор NaCl.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Ход работы. В пробирку наливают 5 капель раствора яичного белка и 20 капель спирта или ацетона. Раствор мутнеет. При добавлении нескольких капель насыщенного раствора NaCl выпадает осадок белка.

Работа 19. Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами

Осаждение белка концентрированными кислотами происходит вследствие дегидратации белковых частиц и в итоге нейтрализации их зарядов, а также в связи с рядом других причин (денатурация, образование солей и др.). В избытке серной и соляной кислот, а также при их длительном воздействии выпавший осадок денатурированного белка растворяется, по-видимому, за счет перезарядки белка и частичного гидролиза. В избытке азотной кислоты растворения не происходит.

Исследуемый материал: раствор яичного белка.

Реактивы: концентрированные HCl, H₂SO₄, HNO₃.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Ход работы. В 3 пробирки наливают по 15–20 капель концентрированной соляной, серной и азотной кислот. Затем осторожно, чтобы жидкости не смешивались, накладывают равный объем белка. На границе двух слоев

жидкости появляется осадок белка в виде тонкой пленки. Осторожно встряхивая пробирки, обнаруживают растворение осадка белка в случае осаждения соляной и серной кислотами; в пробирке с азотной кислотой белок не растворяется.

Работа 20. Осаждение белка органическими кислотами

Белки из растворов могут осаждаться органическими кислотами, однако различные органические кислоты неодинаково действуют на белок. Механизм осаждения белков органическими кислотами объясняется дегидратацией белковой молекулы и снятием заряда.

Исследуемый материал: раствор яичного белка.

Реактивы: 10-процентный раствор CCl_3COOH , 20-процентный раствор $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})(\text{COOH})\text{SO}_3\text{H}$.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Ход работы. В две пробирки наливают по 5 капель раствора белка, затем в одну пробирку добавляют 1–2 капли раствора ТХУ, в другую – столько же раствора сульфосалициловой кислоты. В пробирках образуется осадок.

Работа 21. Осаждение белка солями тяжелых металлов

При действии солей тяжелых металлов на растворы белка происходит денатурация белковой молекулы. Осаждение денатурированного белка обусловлено адсорбцией тяжелого металла на поверхности белковой молекулы и образованием нерастворимых комплексов. Свойство белков связывать тяжелые металлы используют в медицине, белки применяют как противоядие при отравлении солями ртути, свинца, меди и других металлов. Белок ограничивает всасывание тяжелого металла, образуя с ним нерастворимые комплексы. При осаждении белков некоторыми солями тяжелых металлов избыток этих солей ведет к растворению (пептизации) первоначально образовавшегося осадка, что связано с адсорбцией тяжелого металла на поверхности коллоидных частиц и появлением положительного заряда на молекуле белка. При избытке серебра и ртути пептизации не наблюдается.

Исследуемый материал: раствор яичного белка.

Реактивы: 10-процентный раствор CuSO_4 , 5-процентный раствор уксуснокислого свинца.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Ход работы. В две пробирки вносят по 5 капель раствора яичного белка и по 1 капле в первую пробирку 7-процентного раствора сульфата меди, во вторую – 5-процентного раствора уксуснокислого свинца. В пробирках образуется осадок. В первую пробирку добавляют еще 5–10 капель 7-процентного раствора сульфата меди, при этом наблюдается растворение осадка.

Оформление работы. Результаты всех опытов вносят в [табл. 3](#).

Таблица 3

Название групп осадителей	Употребляемые реактивы	Характер и цвет осадка	Чем обусловлена реакция?
Органические растворители			
Концентрированные минеральные кислоты			
Органические кислоты			
Соли тяжелых металлов			

3.2.2. Растворимость белков

Работа 22. Растворимость альбуминов и глобулинов

Многие белки хорошо растворяются в воде, что обусловлено наличием на поверхности белковой молекулы свободных гидрофильных групп (–ОН, –NH₂, –COOH и др.). Различные белки растворяются по-разному, белки опорных тканей (кератин, проколлаген, коллаген, эластин и др.) нерастворимы в воде. Растворимость белка в воде зависит от характера белка, реакции среды и присутствия электролитов. В кислой среде лучше растворяются белки, обладающие кислыми свойствами (альбумины, глобулины, проламины, глютелины). Щелочные белки (протамины, гистамины) лучше растворяются в щелочной среде. Различия в растворимости отмечаются как среди кислых, так и среди щелочнореагирующих белков. Альбумины растворяются в дистиллированной воде, а глобулины растворяются в воде только в присутствии электролитов.

Исследуемый материал: яичный белок.

Реактивы: 5-процентный раствор NaCl, дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Ход работы. В одну пробирку вносят 2 капли неразведенного яичного белка, 20 капель воды. Содержимое перемешивают. При этом альбумин растворяется, а глобулин выпадает в виде небольшого осадка. В другую пробирку вносят 2 капли яичного белка и 20 капель 5-процентного раствора хлорида натрия. В слабом солевом растворе растворяют альбумины и глобулины. В две другие пробирки помещают небольшое количество кератина (волосы). В одну пробирку вносят 20 капель воды, в другую – 20 капель раствора хлорида натрия. Кератин не растворяется ни в воде, ни в солевом растворе.

Оформление работы. Результаты работы оформляются в виде [табл. 4](#), где растворимость обозначают знаком «плюс» (+), а отсутствие растворимости – знаком «минус» (–).

Таблица 4

Название белка	H ₂ O	5-процентный NaCl
Яичный альбумин		
Яичный глобулин		
Кератин		

3.2.3. Высаливание белков

Работа 23. Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка

Высаливанием называется процесс выделения белков из водных растворов нейтральными растворами концентрированных солей щелочных и щелочноземельных металлов. При добавлении больших концентраций солей к раствору белка происходит дегидратация белковых частиц и снятие заряда; при этом белки выпадают в осадок. Степень выпадения белков в осадок зависит от ионной силы раствора осадителя, размера частиц белковой молекулы, величины ее заряда, гидрофильности. Разные белки осаждаются при различных концентрациях солей. Поэтому в осадках, полученных путем постепенного повышения концентрации солей, отдельные белки находятся в различных фракциях. Высаливание белков является обратимым процессом, и после удаления соли белок вновь приобретает природные свойства. Поэтому высаливанием пользуются в клинической практике при разделении белков сыворотки крови, а также при изолировании, очистке различных белков.

Исследуемый материал: яичный белок.

Реактивы: насыщенный (NH₄)₂SO₄, измельченный порошок (NH₄)₂SO₄, 10-процентный раствор NaOH, 1-процентный раствор CuSO₄.

Оборудование: пробирки, пипетки.

Ход работы. В пробирку наливают 20 капель неразведенного яичного белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, содержимое перемешивают. Получается полунасыщенный раствор сульфата аммония, выпадает осадок яичного глобулина. Через 5 мин осадок отфильтровывают. В фильтрате остается другой белок – яичный альбумин. Для высаливания альбумина к фильтрату добавляют измельченный порошок сульфата аммония до полного насыщения, то есть до тех пор, пока не прекратится растворение соли. Выпавший осадок альбумина отфильтровывают и с фильтратом проделывают биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белка.

Оформление работы. Результаты работы заносят в [табл. 5](#).

Таблица 5

Название белка	Используемая соль	Степень насыщения	Образование белка
Глобулин			
Альбумин			

3.2.4. Определение изоэлектрической точки белков

Изоэлектрической точкой белка называется определенная величина рН среды, при которой белок находится в виде нейтральных молекул (в изоэлектрическом состоянии), несущих равные количества положительных и отрицательных зарядов. При других концентрациях ионов водорода в растворе имеются преимущественно положительные и отрицательные ионы белка. Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы и легко выпадают в осадок. Для большинства белков изоэлектрическая точка близка к нейтральной среде, но не вполне совпадает с ней; для многих белков она сдвинута в кислую сторону, а некоторые белки имеют изоэлектрическую точку при слабощелочной реакции среды. Определение изоэлектрической точки может быть сведено к определению рН раствора, при котором наблюдается наиболее быстрое и полное выпадение белка в осадок.

Работа 24. Определение изоэлектрической точки казеина

Исследуемый материал: молоко.

Реактивы: 10-процентная CH_3COOH , дистиллированная вода, 0,2 М раствор CH_3COONa , 0,2 М раствор CH_3COOH .

Оборудование: пробирки, воронка, фильтры, стеклянная палочка.

Ход работы. 1. *Выделение казеина из молока.* К 2 мл молока добавляют 2 мл дистиллированной воды и 2 капли 10-процентной уксусной кислоты. Образуется осадок казеина, который отфильтровывают. Фильтрат отбрасывают, а осадок казеина осторожно снимают с фильтра стеклянной палочкой и помещают в чистые пробирки.

2. *Определение изоэлектрической точки казеина.* Для определения изоэлектрической точки казеина в 7 сухих пробирок наливают нужные реактивы в количествах, указанных в [табл. 6](#). При смешивании растворов в каждой пробирке устанавливается определенная концентрация ионов водорода. Содержимое пробирок хорошо перемешивают. Через 5–10 мин во всех пробирках появляется осадок (помутнение). Наибольшее количество осадка наблюдается в той пробирке, рН которой соответствует изоэлектрической точке данного белка.

Таблица 6

Количество 0,2М CH ₃ COOH, мл	Количество H ₂ O, мл	Количество 0,4-процентного раствора казеина в 0,2 М CH ₃ COONa, мл	pH смеси	Степень помутнения
1,6	0,4	0,2	3,8	
0,8	1,2	0,2	4,1	
0,4	1,6	0,2	4,4	
0,2	1,8	0,2	4,7	
0,1	1,9	0,2	5,0	
0,06	1,94	0,2	5,3	
0,3	1,97	0,2	5,6	

Оформление работы. Результаты опытов представить в виде [табл. 6](#). В графе «Степень помутнения» отсутствие осадка обозначить знаком «минус» (-), наличие его – знаком «плюс» (+), значительное помутнение – несколькими «плюсами».

Контрольные вопросы

1. Как ведут себя аминокислоты и белки в водном растворе и в присутствии избытка кислоты и щелочи?
2. От чего зависит заряд белка в водном растворе?
3. От чего зависит растворимость белка? Какие факторы стабилизируют белок в растворе?
4. Каковы общие механизмы осаждения белка из раствора? Какими способами можно осадить белок, не вызывая его денатурацию?
5. Что такое изоэлектрическая точка, и как ее определить?
6. Что такое высаливание белка?
7. Что такое денатурация белка? Какие агенты, денатурирующие белки, вам известны?
8. В чем заключается разница между осаждением и денатурацией?
9. Каким образом можно разделить альбумины и глобулины сыворотки крови?
10. Назовите мероприятия при отравлении человека солями тяжелых металлов, основанные на необратимых реакциях осаждения белка.

3.3. Гидролиз белков

Гидролиз – распад сложного вещества на более простые составные части, связанный с присоединением воды в месте разрыва связей. В зависимости от применяющегося катализатора, различают кислотный, щелочной и ферментативный гидролиз. При гидролизе простого белка конечными продуктами являются аминокислоты. В организме гидролиз белка постоянно протекает в процессе как пищеварения, так и в ходе жизнедеятельности клеток под действием протеолитических ферментов. При кислотном гидролизе белка разрушаются некоторые аминокислоты (триптофан подвергается полному разрушению, серин, треонин, цистин, тирозин, фенилаланин – частичному). При щелочном гидролизе отмечается значительно более сильное разрушение аминокислот. При кислотном гидролизе белки распадаются сначала на высокомолекулярные пептиды, а затем – на низкомолекулярные пептиды, дипептиды и аминокислоты. Сложные белки состоят из аминокислот и небелкового компонента (простетической группы). К сложным белкам относятся нуклеопротеиды, хромопротеиды, фосфопротеиды, гликопротеиды, сложные белки-ферменты, металлопротеиды.

Работа 25. Кислотный гидролиз простого белка

Исследуемый материал: раствор яичного белка.

Реактивы: концентрированная HCl , 10-процентный раствор $NaOH$, 1-процентный раствор $CuSO_4$.

Оборудование: круглодонная колба с воздушным холодильником, пробирки, капельницы.

Ход работы. 1. *Кислотный гидролиз простого белка.* Для гидролиза в круглодонную колбу отмеривают 20 мл раствора яичного белка и 5 мл концентрированной соляной кислоты. Колбочку закрывают пробкой с длинной стеклянной трубкой и закрепляют на штативе с асбестовой сеткой. Содержимое колбы кипятят под тягой в течение 45 минут.

2. *Открытие промежуточных продуктов распада белка в гидролизате при помощи биуретовой реакции.* В процессе гидролиза проделывают биуретовую реакцию (см. работу 1) с несколькими каплями предварительно нейтрализованного гидролизата. Промежуточные продукты распада белка – пептоны – при проведении биуретовой реакции дают розовое или красное окрашивание, а белки – сине-фиолетовое.

Работа 26. Хромопротеиды

Хромопротеиды являются сложными белками, простетическая группа которых представлена каким-либо окрашенным соединением небелкового характера (пигментом). Окрашенная простетическая группа различных хромопротеидов может принадлежать к разным классам органических соедине-

ний (порфиринам, каротиноидам, производным витаминов и др.). Важнейшую группу хромопротеидов составляют белки, содержащие окрашенное соединение порфириновой природы; к ним относятся гемоглобин крови, миоглобин мышц, некоторые ферменты (каталаза, пероксидаза, цитохромы и др.).

Гемоглобин состоит из белка глобина и пигментной части – гема. По химической природе гем представляет собой соединение протопорфирина с двухвалентным железом, которое в особых условиях может переходить в трехвалентное.

Геминная проба Тейхмана. При нагревании высушенной крови с ледяной уксусной кислотой кровяной пигмент распадается на глобин и гематин. Гематин под действием хлористого водорода, возникающего при взаимодействии хлористого натрия (имеющегося в крови или добавленного) и уксусной кислоты, переходит в хлорпроизводное – гемин, который выкристаллизовывается при остывании.

Пробой Тейхмана пользуются в судебно-медицинской экспертизе для доказательства наличия кровяных пятен. Гемин отличается от гема наличием трехвалентного железа, соединенного с атомом хлора.

Исследуемый материал: кровь.

Реактивы: ледяная CH_3COOH , насыщенный раствор NaCl .

Оборудование: стекла предметные и покровные, стеклянная палочка, микроскоп.

Ход работы. Каплю свежей крови помещают на предметное стекло и дают ей высохнуть, держа стекло высоко над пламенем горелки во избежание нагревания выше $60\text{ }^\circ\text{C}$ (не кипятить, контролировать нагрев прикосновением стекла к тыльной поверхности кисти руки). К подсушенной крови добавляют 1–2 капли концентрированной уксусной кислоты, смесь тщательно перемешивают стеклянной палочкой, накрывают покровным стеклом и осторожно нагревают до начала кипения кислоты. При этом предметное стекло следует держать высоко над пламенем горелки, чтобы избежать выкипания жидкости. Затем препарат охлаждают и рассматривают под микроскопом образовавшиеся при разрушении гемоглобина кристаллы солянокислого гемина, имеющие форму ромбоидальных палочек. Если обнаружить кристаллы не удастся, то приподнимают покровное стекло, добавляют 2–3 капли концентрированной уксусной кислоты, нагревают смесь и после охлаждения вновь исследуют под микроскопом.

При исследовании старых пятен геминную пробу производят с соскобом пятна или же кусочек ткани с пятном режут на мелкие части. Перед обработкой ледяной уксусной кислотой добавляют один маленький кристаллик хлористого натрия.

Работа 27. Фосфопротеиды

Фосфопротеиды представляют собой сложные белки, состоящие из простого белка и небелковой части – фосфорной кислоты. Фосфорная кисло-

та связана с белком через гидроксильную группу оксиаминокислот – серина и треонина. К этой группе белков относятся казеиноген молока, вителлин яичного желтка, ихтулин икры и некоторые другие. Фосфопротеиды служат одним из питательных материалов для развития эмбрионов.

Исследуемый материал: молоко.

Реактивы: CH_3COOH , 1-процентный раствор CuSO_4 , 10-процентный раствор NaOH , 10-процентный раствор HNO_3 , фенолфталеин, молибденовый реактив.

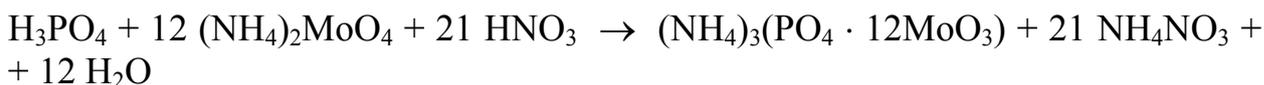
Оборудование: воронки, фильтры, пробирки, стеклянная палочка, пипетки, спиртовка.

Ход работы. Выделение казеина из молока описано в работе 24.

1. *Гидролиз казеина.* В пробирку помещают выделенный из молока казеин и приливают 2 мл 10-процентного раствора едкого натра. Кипятят 10–15 мин на асбестовой сетке с обратным холодильником, затем охлаждают пробирку и проводят реакцию на продукты гидролиза.

2. *Обнаружение белка.* Белок обнаруживают биуретовой реакцией. В пробирку к трем каплям гидролизата добавляют одну каплю 1-процентного раствора сернокислой меди. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

3. *Обнаружение фосфата.* Оставшийся гидролизат подкисляют несколькими каплями 10-процентного раствора азотной кислоты в присутствии 1–2 капель фенолфталеина (до обесцвечивания) и отфильтровывают в сухую пробирку. К 5 каплям фильтрата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят несколько минут. Жидкость окрашивается в желтый цвет, а затем при охлаждении выпадает желтый осадок фосфорно-молибденового аммония, указывающий на присутствие фосфата в гидролизате:



Фосфорно-молибденовый
аммоний

Работа 28. Гликопротеиды. Открытие углеводного компонента в яичном белке

Гликопротеиды – сложные белки, в простетические группы которых входят углеводы и их производные. Гликопротеиды содержатся почти во всех тканях и жидкостях организма, носят общее название муцинов и мукоидов и выполняют опорную и защитную функции.

Исследуемый материал: яичный белок.

Реактивы: концентрированная H_2SO_4 , 1-процентный раствор тимола, концентрированная CH_3COOH .

Оборудование: пробирки, капельницы.

Ход работы. При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образует-

ся фурфурол, а из гексоз – оксиметилфурфурол. Они дают с тимолом или α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты продукты конденсации красного цвета. К 10 каплям профильтрованного гидролизата добавляют 2–3 капли 1-процентного раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно наслаивают 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфурола с тимолом.

Оформление работы. Результаты работ по сложным белкам оформить в табл. 7.

Таблица 7

Наименование сложного белка	Химическая структура простетической группы	Употребляемые реактивы	Продукты реакции	Чем обусловлена реакция?

Контрольные вопросы

1. Что такое гидролиз белка, и какие виды гидролиза вы знаете?
2. В чем заключается отличие сложных белков от простых?
3. Напишите классификацию сложных белков. К какой группе сложных белков относится гемоглобин, и из каких компонентов он состоит?
4. Что такое гликопротеиды, и какие существуют качественные реакции на их углеводную группу?
5. Что такое фосфопротеиды, и с помощью какой реакции можно открыть их фосфорную кислоту? Как связана фосфорная кислота с белковой частью в фосфопротеидах?

РАЗДЕЛ 4. НУКЛЕОТИДЫ

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные соединения, построенные из большого количества моонуклеотидов, соединенных друг с другом фосфодиэфирной связью. Моонуклеотиды состоят из пуринового или пиримидинового основания, углеводного компонента (рибозы или дезоксирибозы) и фосфорной кислоты. Нуклеиновые кислоты обладают кислотными свойствами вследствие диссоциации имеющих у них остатков фосфорной кислоты. Различные нуклеиновые кислоты характеризуются входящими в их состав пуриновыми и пиримидиновыми основаниями и пентозами. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) представляет собой полимер, состоящий из мономеров – дезоксирибонуклеозидмонофосфатов. Рибонуклеиновая кислота является полимером, состоящим из рибонуклеозидмонофосфатов.

Работа 29. Исследование состава нуклеиновых кислот

Для изучения состава нуклеиновых кислот проводят кислотный гидролиз дрожжей в присутствии серной кислоты. При продолжительном гидролизе нуклеиновые кислоты распадаются на моонуклеотиды, которые в свою очередь гидролизуются на пуриновые или пиримидиновые основания, пентозу и фосфорную кислоту.

Исследуемый материал: дрожжи.

Реактивы: 10-процентный раствор H_2SO_4 , концентрированный NH_3 , 1-процентный раствор $AgNO_3$, молибденовый реактив, концентрированная H_2SO_4 , тимол.

Оборудование: круглодонная колба с воздушным холодильником, воронка с фильтром, мерный цилиндр, пробирки.

Ход работы. 1. *Кислотный гидролиз нуклеиновых кислот.* 1 г пекарских дрожжей помещают в круглодонную колбу на 100 мл, добавляют 20 мл 10-процентного раствора серной кислоты и 20 мл дистиллированной воды. Колбу закрывают пробкой с длинной стеклянной трубкой и содержимое кипятят под тягой в течение часа (на асбестовой сетке и при слабом нагревании). Через час после начала кипения нагревание жидкости прекращают, дают ей остыть, переносят в цилиндр, доводят водой до первоначального объема и фильтруют. С фильтратом проводят качественные реакции на составные части нуклеиновых кислот.

2. *Качественные реакции на составные части нуклеиновых кислот*

2.1. *Серебряная проба на пуриновые основания*

Нейтрализуют 10 капель гидролизата 1 каплей концентрированного аммиака и добавляют 5 капель 1-процентного раствора азотнокислого серебра. Через 3–5 мин выпадает небольшой бурый осадок серебряных производных пуриновых оснований.

2.2. *Качественная реакция Молиша на пентозную группировку*

При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз – оксиметилфурфурол. Они дают с тимолом или α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты продукты конденсации красного цвета. К 10 каплям профильтрованного гидролизата добавляют 2–3 капли 1-процентного раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно наслаивают 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфурола с тимолом.

2.3. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

К 3–5 каплям гидролизата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят смесь несколько минут. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении образуется желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорно-молибденовокислого аммония.

Контрольные вопросы

1. Что такое нуклеиновая кислота, и как она построена?
2. Что такое ДНК и РНК? Виды РНК.
3. Каков принцип выделения из ткани ДНК и ее обнаружения?
4. Качественные реакции на составные части нуклеиновых кислот.
5. Что собой представляют мононуклеотиды? Каковы продукты их гидролиза? Написать реакцию гидролиза мононуклеотида (формулами).
6. Как соединяются между собой мононуклеотиды в молекуле нуклеиновых кислот? Напишите формулу динуклеотида.

РАЗДЕЛ 5. ВИТАМИНЫ

Витамины – низкомолекулярные органические вещества, имеющие разнообразную химическую природу. Они условно объединены в одну группу по признаку жизненной необходимости для организма. Поскольку в организме человека и животных витамины не синтезируются, за исключением некоторых из них, образующихся симбиотической микрофлорой пищеварительного тракта, они относятся к незаменимым факторам питания. Поступая в организм в небольших количествах с пищей, витамины обеспечивают нормальное протекание биохимических процессов и таким образом участвуют в регуляции многих метаболических функций организма.

Биологическая роль большинства витаминов заключается в том, что многие из них входят в состав простетических групп ферментов. Недостаточное поступление витаминов с пищей, а также нарушение их всасывания в организме приводит к развитию тяжелых нарушений обмена веществ: авитаминозам и гиповитаминозам.

Заболевание, возникающее в результате отсутствия того или иного витамина, называют авитаминозом. При относительной недостаточности какого-либо витамина наблюдается гиповитаминоз. Поскольку функции витаминов тесно связаны между собой, то обычно наблюдаются полиавитаминозы или полигиповитаминозы. Авитаминозы встречаются достаточно редко; чаще встречаются гиповитаминозы, как результат нерационального питания, нарушения обмена веществ или перенесенных заболеваний и лекарственной терапии (антибиотиков и сульфамидов). Избыточный прием ряда витаминов приводит к нарушениям метаболических функций – гипервитаминозу.

Простейшая классификация витаминов основана на их физико-химических свойствах, в частности на растворимости. По этому признаку витамины делят на две группы: а) витамины, растворимые в воде; б) витамины, растворимые в жирах и органических растворителях. К водорастворимым витаминам относятся витамины группы В (V_1 , V_2 , V_6 , V_9 , V_{12}), витамин РР, витамин Н, витамин С, витамин Р, пантотеновая кислота и витаминоподобные вещества холин, инозит, пангамовая, липоевая, парааминобензойная кислоты, витамин U, коэнзим Q. К жирорастворимым витаминам относятся витамины группы А, витамины группы D, витамины группы E, витамины группы К, непредельные жирные кислоты, имеющие две и более двойных связей. Антивитамины – вещества, уменьшающие биологическую активность ферментов, – являются или структурными аналогами витаминов и конкурентно препятствуют образованию активных форм ферментов, или ферментами, разрушающими витамины.

Для открытия и обнаружения витаминов в пищевых продуктах или других биологических объектах обычно пользуются качественными реакциями, основанными на образовании характерной цветной реакции какого-либо витамина с соответствующим химическим реактивом.

Работа 30. Количественное определение аскорбиновой кислоты

Биологическая роль аскорбиновой кислоты в организме разнообразна. Она принимает участие в окислительно-восстановительных процессах и связана с системой глутатиона. Аскорбиновая кислота участвует в синтезе стероидных гормонов в коре надпочечников и необходима для процесса гидроксилирования, как фактор для проявления действия ферментов гидроксилаз. Она участвует в образовании тетрагидрофолиевой кислоты из фолиевой кислоты, в гидроксилировании лизина в оксипролин, пролина в оксипролин, необходимых для образования коллагеновых волокон; ускоряет всасывание железа, активирует фермент желудочного сока пепсиноген, что особенно важно при недостатке соляной кислоты в желудочном соке.

Принцип метода. Количественный метод определения аскорбиновой кислоты основан на способности витамина С восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в кислой среде имеет красную окраску, в щелочной – синюю, а при восстановлении обесцвечивается.

Для предохранения витамина С от разрушения исследуемый раствор титруют в кислой среде щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания.

Исследуемый материал: хвоя, капуста, морковь, картофель, моча.

Реактивы: 0,001 н раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, 10-процентный раствор HCl.

Оборудование: весы аптечные; мерные цилиндры; пипетки на 1, 2, 5 мл; фарфоровые ступки с пестиками; бюретка; колбочки для титрования; ножницы; скальпель; стеклянный песок.

Ход работы. 1. *Определение содержания витамина С в капусте.* Отвешивают 1 г капусты, растирают в ступке с 2 мл 10-процентного раствора HCl и стеклянным песком, приливают 8 мл воды и фильтруют. Отбирают для титрования 2 мл фильтрата, добавляют 10 капель 10-процентного раствора HCl и титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом до розовой окраски. Вычисляют содержание аскорбиновой кислоты в 100 г капусты.

Для расчета содержания аскорбиновой кислоты используют формулу:

$$x = \frac{0,088 \cdot A \cdot \Gamma \cdot 100}{B \cdot B},$$

где x – содержание аскорбиновой кислоты в миллиграммах на 100 г продукта; 0,088 – содержание аскорбиновой кислоты, мг; А – количество титранта, мл; Б – объем экстракта, взятый для титрования, мл; В – количество продукта, взятое для анализа, г; Г – общее количество экстракта; 100 – пересчет на 100 г продукта.

В 100 г капусты содержится 25–100 мг аскорбиновой кислоты, в 100 г шиповника – 500–1500 мг, в 100 г хвои – 200–400 мг.

2. *Определение содержания витамина С в картофеле.* Отвешивают 5 г картофеля, растирают в ступке со стеклянным песком и 20 каплями 10-процентного раствора HCl (чтобы картофель не темнел). Постепенно приливают 15 мл дистиллированной воды. Полученную массу сливают в стаканчик, ополаскивают ступку двумя миллилитрами воды, сливают воду в колбочку и титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом до розовой окраски. Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты. В 100 г картофеля содержится 1–5 мг витамина С.

3. *Определение содержания витамина С в моче.* Определение содержания витамина С в моче дает представление о запасах этого витамина в организме, так как наблюдается соответствие между концентрацией витамина С в крови и количеством этого витамина, выделяемым с мочой. Однако при гиповитаминозе С содержание аскорбиновой кислоты в моче не всегда понижено. Часто оно бывает нормальным, несмотря на большой недостаток этого витамина в тканях.

У здоровых людей введение per os 100 мг витамина С быстро приводит к повышению его концентрации в крови и моче. При гиповитаминозе С ткани, испытывающие недостаток в витамине, задерживают принятый витамин, и его концентрация в моче не повышается. Моча здорового человека содержит 20-30 мг витамина С, или 113,55-170,33 мкмоль/сут. У детей уровень этого витамина понижается при цинге, а также острых и хронических инфекционных заболеваниях.

В стаканчик или колбочку отмеривают 10 мл мочи и 10 мл дистиллированной воды, перемешивают, подкисляют 20 каплями 10-процентного раствора HCl и титруют 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Расчет содержания аскорбиновой кислоты в моче производят по формуле

$$x = \frac{0,088AB}{B},$$

где x – содержание аскорбиновой кислоты, мг/сут; 0,088 – коэффициент, мг; А – количество титранта, мл, В – объем мочи, взятой для титрования, мл; В – среднее суточное количество мочи (для мужчин – 1500 мл, для женщин – 1200 мл).

Работа 31. Количественное определение витамина Р в чае

Известны несколько соединений, оказывающих Р-витаминное действие (рутин и др.). В основе их лежит скелет флавона.

Витамины Р и С действуют взаимосвязанно; они участвуют в окислительно-восстановительных процессах. Терапевтическое действие витамина С более эффективно в присутствии витамина Р. При недостатке в организме витамина Р у человека повышается проницаемость капилляров.

Рутин – кристаллическое вещество желто-оранжевого цвета. Содержится в тех продуктах, что и витамин С: в чае, фруктах, ягодах (бруснике, клюкве и др.). Количественное определение витамина Р проводят в вытяжке из чая.

Принцип метода. Рутин способен окисляться перманганатом калия; в качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом калия после того, как окислится весь рутин. Экспериментально установлено, что 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия окисляет 6,4 мкг рутина.

Исследуемый материал: чай.

Реактивы: перманганат калия 0,05 н раствор, индигокармин.

Оборудование: стаканчики или колбочки, бюретка, пипетки.

Ход работы. К 100 мг чая приливают 50 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию в течение 5 минут 10 мл экстракта чая отмеривают в стаканчик или колбочку, добавляют 10 мл дистиллированной воды и 5 капель индигокармина (появляется синее окрашивание). Титруют из бюретки 0,05 н раствором $KMnO_4$ до появления устойчивой желтой окраски.

Определяют процентное содержание рутина в чае. Расчет проводят по следующей формуле

$$x = \frac{3,2AV_1100}{V_2P1000},$$

где x – содержание витамина Р в препарате, %; 3,2 – стандартный пересчетный коэффициент; A – количество титранта, мл, V_1 – объем, в котором растворена взятая для анализа навеска, мл, 100 – общее количество вещества для расчета процентного содержания, г; V_2 – объем раствора, взятого для титрования, мл, P – навеска, мг; 1000 – перевод мкг в мг.

Контрольные вопросы

1. Что такое витамины?
2. Каковы химическое строение и биологическая роль витаминов B_1 , B_2 , B_6 , B_{12} , РР, Н, С, Р, пантотеновой кислоты?
3. Коферментом каких ферментов является витамин B_1 ? B_2 ? B_6 ? B_{12} ? РР? Н? С?

РАЗДЕЛ 6. ФЕРМЕНТЫ

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы. Они присутствуют во всех тканях, клетках, внутриклеточных органеллах и биологических жидкостях. Благодаря ферментам обмен веществ в живых организмах протекает с большой скоростью при температуре тела и без участия сильнодействующих химических реагентов.

Ферменты, как катализаторы: 1) не вызывают каких-либо реакций, невозможных по термодинамическим законам; 2) увеличивают скорость как прямой, так и обратной реакции обратимого химического процесса; 3) остаются химически неизменными; 4) в очень малых количествах способны превращать несоизмеримо большие массы субстратов.

Согласно современным представлениям ферменты увеличивают скорость химической реакции, снижая энергетический барьер данной реакции. Ведущую роль в механизме ферментативного катализа играют промежуточные фермент-субстратные комплексы, образование которых определяется тонкой структурой активного центра и уникальной структурой всей молекулы фермента.

Ферменты делят на простые и сложные. У простых функции контактных и каталитических групп активного центра определяются только радикалами аминокислотных остатков, у сложных ферментов активный центр включает также коферменты и ионы металлов.

6.1. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции

Скорость ферментативных реакций, как и неферментативных, увеличивается при повышении температуры. Но в связи с белковой природой ферментов повышение температуры может привести к их денатурации и снижению скорости реакции. Денатурация тем значительнее, чем выше температура и чем больше время инкубации.

Работа 32. Влияние температуры на активность амилазы слюны

Исследуемый материал: слюна.

Реактивы: 1-процентный раствор крахмала, реактив Люголя, дистиллированная вода.

Оборудование: пипетки, пробирки, термостат, спиртовка, ледяная баня, предметные стекла.

Ход работы. В 4 пробирки наливают по 0,5 мл крахмала. Еще в 4 пробирки наливают по 0,5 мл разбавленной (1:5) слюны. Берут первую пару

пробирок (одна с ферментом, другая – с крахмалом) и помещают в баню со льдом. Вторую пару оставляют при комнатной температуре. Третью пару пробирок помещают в термостат (37°C), а четвертую – в кипящую водяную баню. Через 5 мин содержимое каждой пары пробирок сливают вместе, тщательно перемешивают и оставляют стоять еще 10 мин при тех же условиях. Из третьей пробирки отливают 3 капли жидкости и продельывают реакцию с каплей йода на стекле. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще 10 мин и после этого повторяют реакцию с йодом на стекле. Потом добавляют по 2 капли реактива Люголя во все пробирки и наблюдают за развитием окраски.

Оформление работы. Результаты записывают в табл. 8. Делают выводы о характере влияния температуры на активность амилазы.

Таблица 8

№ пробирки	Температура инкубации, °С	Окрашивание с йодом
1.	0	
2.	20	
3.	37	
4.	100	

Работа 33. Влияние температуры на активность холинэстеразы

Холинэстераза – фермент, играющий существенную роль в процессе передачи возбуждения холинэргическими нервами на воспринимающие ткани. Холинэстераза расщепляет ацетилхолин – медиатор нервного возбуждения – на холин и уксусную кислоту:



В процессе реакции происходит закисление среды за счет накопления уксусной кислоты, что можно обнаружить с помощью индикатора. В работе используется двухцветный индикатор бромтимоловый синий. Зона смены окраски находится в области рН 7,6-6,0; в кислой среде окраска – желтая, в щелочной – синяя, промежуточная окраска – зеленая. Инкубацию фермента и субстрата проводят в различных температурных условиях. Об интенсивности ферментативного гидролиза ацетилхолина судят по окраске инкубационной смеси.

Исследуемый материал: сыворотка крови (разведение 1:50) – источник холинэстеразы.

Реактивы: 0,5-процентный раствор ацетилхолина (готовят на дистиллированной воде, освобожденной от CO_2), 0,02-процентный раствор бромтимолового синего (2,5 г сухого индикатора растирают в ступке с 4,5 мл 0,1 н раствора едкого натра; полученный раствор переносят в мерную колбу на 50 мл, добавляют 12,5 мл 0,1 н раствора борной кислоты, приготовленного на 0,1М растворе KCl ; раствор доводят водой до метки, перед опытом раствор разводят водой в 2 раза).

Оборудование: пробирки, пипетки, термостат, баня со льдом.

Ход работы. Берут 3 пробирки. Вносят в каждую по 2,5 мл сыворотки крови и по 0,5 мл бромтимолового синего. Одну из пробирок помещают в термостат (37°C), вторую оставляют при комнатной температуре, третью помещают в ледяную баню. Через 5 мин, необходимых для выравнивания температуры, во все 3 пробирки вносят по 0,5 мл раствора ацетилхолина. Содержимое пробирок перемешивают и вновь оставляют в соответствующих температурных условиях. Через 10-15 мин отмечают цвет в каждой пробирке.

Оформление работы. Результаты записывают в табл. 9. Делают выводы о зависимости скорости реакции от температуры.

Таблица 9

№ пробирки	Температура инкубации, $^\circ\text{C}$	Окрашивание с бромтимоловым синим
1.	0	
2.	20	
3.	37	
4.	100	

6.2. Влияние pH на скорость ферментативных реакций

Все ферменты проявляют максимальную активность при определенном оптимальном значении pH. Ниже и выше оптимума pH наблюдается снижение активности ферментов. Зависимость активности от pH объясняется влиянием на степень ионизации ионогенных групп фермента, а также субстрата.

Работа 34. Влияние pH на активность амилазы слюны

Оптимум pH для действия амилазы слюны можно определить при взаимодействии ее с крахмалом при различных значениях pH среды. О степени расщепления крахмала можно судить по реакции крахмала с раствором йода. При оптимальном значении pH расщепление крахмала произойдет полностью (отсутствует йод). По мере удаления от оптимума pH в кислую или щелочную зоны расщепление крахмала произойдет только частично, до стадии декстринов, или крахмал вообще не подвергнется расщеплению.

Исследуемый материал: слюна.

Реактивы: 1-процентный раствор крахмала, реактив Люголя, 1/15М растворы фосфатного буфера с разными значениями pH (5,5-8,0).

Оборудование: пробирки, пипетки, термостат.

Ход работы. Наливают в 4 пробирки по 0,5 мл крахмала, 0,5 мл разбавленной (1:5) слюны. Затем в первую пробирку добавляют 0,5 мл буфера с pH = 5,8, во вторую пробирку – 0,5 мл буфера с pH = 6,5, в третью – 0,5 мл буфера с pH = 7,0 в четвертую – 0,5 мл буфера с pH = 8,0. Помещают все пробирки на 10 мин в термостат (37 °С). После этого добавляют по 2 капли реактива Люголя во все пробирки и наблюдают за развитием окраски.

Оформление работы. Результаты записывают в табл. 10. Делают выводы о характере влияния pH на активность амилазы.

Таблица 10

№ пробирки	pH	Окрашивание с йодом
1.	5,5	
2.	6,5	
3.	7,0	
4.	8,0	

6.3. Специфичность действия ферментов

Специфичность действия выражается в способности ферментов катализировать реакции одного стереоизомера, одного определенного субстрата или группы сходных по строению субстратов, характеризующихся определенным типом химической связи или наличием определенной химической группировки. Это свойство наиболее важное среди свойств биологических катализаторов. Оно обусловлено наличием в молекуле фермента активного центра, ответственного за каталитическую активность, формирование которого происходит под влиянием субстрата в момент взаимодействия. Специфичность действия в работе изучается на примере α -амилазы слюны и сахаразы, полученной из дрожжей.

Работа 35. Специфичность действия α -амилазы слюны

α -амилаза катализирует гидролитическое расщепление крахмала с образованием мальтозы. Промежуточными продуктами в данной реакции являются различные декстрины (амино-, эритро-, хро- и мальтодекстрины). Степень гидролиза крахмала можно контролировать по цветной реакции с

йодом. Крахмал дает с йодом синее окрашивание, декстрины, в зависимости от размеров молекул, при взаимодействии с йодом окрашиваются в разные цвета (сине-фиолетовый, красно-бурый, желто-бурый), а конечные продукты с йодом окраски не дают. Второй контрольной пробой может быть реакция на наличие свободных альдегидных групп.

Исследуемый материал: слюна.

Реактивы: 1-процентный раствор крахмала, 1-процентный раствор сахарозы, 10-процентный раствор NaOH, 1-процентный раствор CuSO₄, реактив Люголя, дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки, пипетки, термостат.

Ход работы. Готовят 2 инкубационные пробы, как указано в табл. 11, используя в качестве субстратов для амилазы 2 вещества: крахмал и сахарозу.

Таблица 11

№ пробы	Амилаза слюны (мл)	Крахмал (мл)	Сахароза (мл)	Реакция Троммера (+, -)	Реакция с йодом (+, -)
1.	1	1			
2.	1		1		

Пробы выдерживают в термостате в течение 15 мин при 37 °С. Затем с первой пробой проделывают 2 реакции: Троммера и реакцию с йодом. Со второй пробой проделывают реакцию Троммера.

Оформление работы. В [табл. 11](#) вносят результаты реакций. Делают вывод о специфичности амилазы.

Работа 36. Специфичность действия сахаразы

Сахараза катализирует расщепление сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы. Действие сахаразы можно обнаружить по появлению в инкубационной среде свободной глюкозы, дающей положительную реакцию Троммера вследствие наличия в молекуле глюкозы свободного полуацетального альдегида. Сахароза не обладает восстанавливающими свойствами.

Исследуемый материал: препарат сахаразы.

Реактивы: 1-процентный раствор крахмала, 1-процентный раствор сахарозы, 10-процентный раствор NaOH, 1-процентный раствор CuSO₄, реактив Люголя, дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки, пипетки, термостат.

Ход работы. Готовят 2 инкубационные пробы, как указано в [табл. 12](#), используя в качестве субстратов для сахаразы 2 вещества: крахмал и сахарозу.

Таблица 12

№ пробы	Сахараза (мл)	Крахмал (мл)	Сахароза (мл)	Реакция Троммера (+, -)	Реакция с йодом (+,-)
1.	1	1			
2.	1		1		

Пробы выдерживают в термостате в течение 15 мин при 37 °С. Затем со второй пробой проделывают 2 реакции: Троммера и реакцию с йодом. С первой пробой проделывают реакцию Троммера.

Оформление работы. В [табл. 12](#) вносят результаты реакций. Делают вывод о специфичности сахаразы.

6.4. Открытие ферментов различных классов

Все ферменты делят на 6 классов, в зависимости от типа реакций, ими катализируемых:

- 1) *оксидоредуктазы* – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции;
- 2) *трансферазы* – ферменты, катализирующие реакции переноса различных групп;
- 3) *гидролазы* – ферменты, ускоряющие реакции гидролиза;
- 4) *лиазы* – ферменты, отщепляющие от субстрата определенные группы негидролитическим путем с образованием двойной связи или, наоборот, присоединяющие группы к двойным связям;
- 5) *изомеразы* – ферменты, ускоряющие реакции изомеризации;
- 6) *лигазы (синтетазы)* – ферменты, катализирующие реакции синтеза.

Работа 37. Идентификация оксидоредуктаз в биологическом материале

В реакциях, катализируемых оксидоредуктазами, окисляемый субстрат является донором водорода или электронов. Роль акцептора могут выполнять различные соединения: коферменты NAD (P), FMN, FAD, CoQ, O₂, органические соединения, цитохромы, ксенобиотики. Для большинства ферментов этой группы рекомендуемые названия – дегидрогеназы или редуктазы. Когда акцептором служит O₂, используется термин оксидаза; если O₂ внедряется в субстрат, фермент называется оксигеназой. Пероксидаза – фермент, который утилизирует H₂O₂ как акцептор. Каталаза – фермент, способный катализировать реакцию, в которую вовлекается донор-акцепторная пара, представленная двумя молекулами перекиси водорода.

Работа 38. Открытие пероксидазы

Ферменты, окисляющие субстраты при участии перекиси водорода, называются пероксидазами. Пероксидазы встречаются особенно широко в растительных клетках, у животных находятся в крови, мышцах, молоке. Субстратами пероксидаз служат фенолы и ароматические амины (пирогаллол, гваякол, гидрохинон, тирозин, бензидин и др.). Пероксидазы представляют собой протеиды, содержащие в качестве активной группы железопорфириновый комплекс. Вследствие этого они угнетаются HCN, H₂S, гидроксиламином, тиомочевинной. Пероксидазы угнетаются также перекисью водорода, поэтому необходимо следить за тем, чтобы избытка ее при пробах на пероксидазу не было. По сравнению с другими ферментами пероксидазы довольно стойки к инактивации нагреванием.

Исследуемый материал: экстракт хрена.

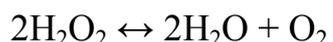
Реактивы: 0,5-процентный раствор H₂O₂, гваяковая смола.

Оборудование: пробирки, пипетки.

Ход работы. Добавить к 0,5 мл взвеси измельченного в воде хрена 0,1 мл перекиси водорода и 0,5 мл гваяковой смолы. Произойдет интенсивное окрашивание образовавшейся индофеноловой сини.

Работа 39. Открытие каталазы

Каталаза – фермент, широко распространенный в клетках как животных, так и растительных организмов. Каталаза ускоряет реакцию разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород:



Исследуемый материал: кровь, картофельный сок.

Реактивы: 3-процентный раствор H₂O₂.

Оборудование: пробирки, пипетки.

Ход работы. К нескольким каплям крови прилить 1–2 мл 3-процентного раствора перекиси водорода. Происходит обильное выделение кислорода. Ту же реакцию проделать с картофельным соком.

Работа 40. Открытие действия ферментов гидролаз

Ферменты класса гидролаз катализируют реакции распада химических соединений. Причем эти реакции идут с присоединением элементов воды. Действие гидролитических ферментов обратимо. Все ферменты пищеварительного тракта, ускоряющие переваривание белков, жиров и углеводов, относятся к классу гидролаз.

Пепсин – протеолитический фермент, относящийся к классу гидролаз, подклассу пептидгидролаз. Особенностью действия пепсина является то, что оптимум действия фермента находится при pH 1,5-2,5 т. е. он максимально активен в сильноокислой среде. Протеолитическую активность фермента можно пронаблюдать, добавив к подкисленному раствору небольшое количество белка фибрина. Фибрин, нерастворимый в воде, под действием пепсина растворяется (происходит ферментативный гидролиз фибрина до растворимых в воде пептидов).

Исследуемый материал: фибрин.

Реактивы: раствор пепсина.

Оборудование: пробирки, пипетки, термостат.

Ход работы. В пробирку наливают 0,5 мл раствора пепсина и опускают небольшой комочек фибрина. Обе пробирки помещают в термостат (37 °С) на 1 час. Наблюдают растворение фибрина.

Работа 41. Открытие действия фермента липазы

Липаза – один из ферментов подкласса 1 класса гидролаз. Ферменты, входящие в состав этого подкласса, в присутствии воды действуют на сложноэфирные связи. Липаза катализирует гидролиз нейтрального жира.

Липазу можно открыть, добавив ее раствор к молоку, содержащему эмульгированный жир. Полученную смесь подщелачивают раствором карбоната натрия до бледно-розовой окраски (на фенолфталеин). В присутствии липазы происходит гидролитическое расщепление жира на глицерин и жирные кислоты, реакция среды при этом сдвигается в кислую сторону, розовая окраска исчезает.

Исследуемый материал: молоко.

Реактивы: раствор панкреатина, дистиллированная вода, фенолфталеин, 1-процентный раствор карбоната натрия.

Оборудование: пробирки, пипетки, термостат.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 10 капель молока. В первую пробирку добавляют 5 капель панкреатина, содержащего липазу. Во вторую пробирку добавляют такое же количество воды. В обе пробирки добавляют по капле 1-процентного раствора фенолфталеина и по капле раствора карбоната натрия до появления бледно-розового окрашивания (нельзя добавлять избыток карбоната натрия). Пробирки помещают в термостат на 30 минут. Наблюдают изменение окраски.

Оформление работы. Описать химизм действия ферментов оксидоредуктаз и гидролаз. Сделать вывод.

Контрольные вопросы

1. Что такое скорость химической реакции: а) для гомогенной реакции; б) для гетерогенной реакции?
2. Какие факторы влияют на скорость химической реакции?
3. Что такое энергия активации?
4. Что такое константа химического равновесия?
5. Какой принцип положен в основу классификации ферментов? Назовите основные классы ферментов.
6. Каковы основные свойства ферментов?

ЧАСТЬ 2

РАЗДЕЛ 1. РЕАКЦИЯ СРЕДЫ. ВОДОРОДНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ. БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ. БУФЕРНАЯ ЕМКОСТЬ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ pH РАСТВОРА

Работа 42. Буферные растворы

Расчет и построение фосфатной буферной кривой

Рассчитать объемы растворов соли и кислоты, которые требуются для приготовления 10 мл фосфатной буферной смеси со следующими водородными показателями: 5,8; 6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8; 7,0; 7,2; 7,6; 7,8; 8,0. Концентрации исходных растворов NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 равны; pH для H_2PO_4^- равен 6,8.

Построить кривую по данным расчета. Для графика использовать миллиметровую бумагу.

Приготовление буферных растворов, определение pH и буферной емкости

Используя полученный график, приготовить 20 мл буферного раствора заданного pH и проверить водородный показатель раствора на иономере.

Определить величину буферной емкости по щелочи и кислоте. Развести раствор в 2 раза. Определить pH и буферную емкость по щелочи и кислоте разведенного раствора.

Проверить зависимость pH от изменения температуры различных буферных растворов (трис-НСI-буфер, фосфатный буфер, бикарбонатный буфер).

Сделать выводы о влиянии разведения на pH и буферную емкость. Сделать вывод о влиянии температуры на pH различных буферных систем.

При работе использовать [табл. 13](#).

Буферные растворы

Ацетатный буфер (0,2 М), pH 3,6-5,8

Ацетат натрия *3H₂O, масса 136,09

Таблица 13

pH (18°C)	CH ₃ COONa (0,2M), мл	CH ₃ COOH (0,2M), мл	pH (18°C)	CH ₃ COONa (0,2M), мл	CH ₃ COOH (0,2M), мл
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Фосфатный буфер (0,1М), рН 5,8-8,0

Двузамещенный фосфат натрия, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, мол.масса = 178,05

Двузамещенный фосфат натрия, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, мол.масса = 358,22

Однозамещенный фосфат натрия, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, мол.масса = 138,0

Однозамещенный фосфат натрия, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, мол.масса = 156,03

При работе использовать табл. 14.

Таблица 14

рН	Na_2HPO_4 (0,2 М), мл	$\text{NaH}_2\text{PO}_4^*$ (0,2 М), мл	Вода, мл	рН	Na_2HPO_4 (0,2 М), мл	$\text{NaH}_2\text{PO}_4^*$ (0,2 М), мл	Вода, мл
5,8	8,0	92,0	До 200	7,0	61,0	39,0	До 200
6,0	12,3	87,7	» 200	7,2	72,0	28,0	» 200
6,2	18,5	81,5	» 200	7,4	81,0	19,0	» 200
6,4	26,5	73,5	» 200	7,6	87,0	13,0	» 200
6,6	37,5	62,5	» 200	7,8	91,5	8,5	» 200
6,8	49,0	51,0	» 00	8,0	94,7	5,3	» 200

Бикарбонатный буфер (0,1 М), рН 9,2-10,8

Этот буфер не может быть использован, если в среде присутствуют ионы кальция или магния.

Карбонат натрия ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), мол.масса = 286,2

Бикарбонат натрия NaHCO_3 , мол.масса = 84,0

При работе использовать табл. 15.

Таблица 15

рН при		Na_2CO_3 (0,1 М), мл	NaHCO_3 , (0,1 М), мл	рН при		Na_2CO_3 (0,1 М), мл	NaHCO_3 , (0,1 М), мл
20 °С	37 °С			20 °С	37 °С		
9,16	8,77	1	9	10,14	9,90	6	4
9,40	9,12	2	8	10,28	10,08	7	3
9,51	9,40	3	7	10,53	10,28	8	2
9,78	9,50	4	6	10,83	10,57	9	1
9,90	9,72	5	5				

Трис-буфер (0,05 М), рН 7,2-9,1

Трис, мол.масса = 121,14

При работе использовать данные табл. 16.

Таблица 16

рН		Трис (0,2 М), мл	HCl (0,1 М), мл	Вода, мл
23 °С	37 °С			
9,10	8,95	25	5,0	До 100
8,92	8,78	25	7,5	» 100
8,74	8,60	25	10,0	» 100
8,62	8,48	25	12,5	» 100
8,50	8,37	25	15,0	» 100
8,40	8,27	25	17,5	» 100
8,32	8,18	25	20,0	» 100
8,23	8,10	25	22,5	» 100
8,14	8,00	25	25,0	» 100
8,05	7,90	25	27,5	» 100
7,96	7,82	25	30,0	» 100
7,87	7,73	25	32,5	» 100
7,77	7,63	25	35,0	» 100
7,66	7,52	25	37,5	» 100
7,54	7,40	25	40,0	» 100
7,36	7,22	25	42,5	» 100
7,20	7,05	25	45	» 100

Контрольные вопросы

1. Что такое буферная емкость?
2. Почему разведение буфера практически не влияет на величину рН?
3. Влияет ли изменение температуры на величину рН?
4. Почему буферная емкость в плазме крови выше по кислоте, чем по щелочи?

РАЗДЕЛ 2. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Углеводы в организме человека играют важную роль и выполняют разнообразные функции. Наиболее важная из них – энергетическая, поскольку 60–70 % всей энергии, которая используется организмом для нормальной жизнедеятельности, приходится на углеводы. Основным источником энергии является окисление гликогена и глюкозы в тканях. Большую роль в энергетическом снабжении клетки играют коферменты (NAD^+ , FAD^+ и др.), в состав которых входит рибоза.

Работа 43. Количественное определение углеводов

Для количественного определения глюкозы используются следующие методы:

1) *редуктометрические* основаны на свойстве сахаров восстанавливать соли тяжелых металлов в щелочной среде (титрометрический метод Хагедорна-Йенсена). Недостаток этих методов состоит в том, что они не специфичны, так как присутствующие в крови редуцирующие вещества, не являющиеся углеводами, также обладают восстанавливающими свойствами и полученные результаты включают всю сумму восстанавливающих соединений в крови.

В связи с этим количество сахара в крови получается значительно выше истинного количества глюкозы. Однако этот метод сохраняет клиническое значение, поскольку разность между «кажущимся» уровнем сахара крови и «истинным» уровнем глюкозы у одного и того же лица остается постоянной;

2) *колориметрические* основаны на определении степени интенсивности окраски соединений, образующихся при взаимодействии глюкозы с определенным веществом (ортотолуидиновый метод). Метод специфичен и точен;

3) *энзиматические* основаны на действии фермента глюкозооксидазы, окисляющего глюкозу кислородом воздуха до глюконовой кислоты (глюкозооксидазный метод). Этот метод специфичен и широко применяется в клинико-диагностических лабораториях.

Определение содержания глюкозы энзиматическим методом в сыворотке крови

Принцип метода. Метод основан на специфическом окислении глюкозы под влиянием глюкозооксидазы (КФ 1.1.3.4), обладающей высокой субстратной специфичностью по отношению к глюкозе. Этот метод позволяет определить содержание глюкозы в крови в присутствии других восстанавливающих веществ.

Глюкозооксидаза – флавопротеин, простетической группой которого является FAD^+ . Окисление глюкозы глюкозооксидазой происходит у первого углеродного атома до глюконовой кислоты (через промежуточный продукт

δ-глюконолактон). Перенос двух атомов водорода на FAD^+ приводит к его восстановлению, а затем $FADH_2$ передает их на кислород с образованием перекиси водорода в эквимольных количествах. Образовавшийся пероксид водорода определяется по реакции окислительной конденсации хлорпроизводного фенола с 4-аминофеназоном, катализируемой пероксидазой. Интенсивность возникшей окраски прямо пропорциональна концентрации глюкозы и определяется на ФЭКе (длина волны 500 нм, кювета с длиной светового пути 5 мм).

Исследуемый материал: кровь.

Реактивы: эталонный раствор глюкозы (10 ммоль/л), дистиллированная вода, рабочий реактив (содержит глюкозооксидазу, пероксидазу, 4-хлор-3-метилфенол, 4-аминофеназон).

Оборудование: пробирки центрифужные, пробирки химические, микропипетки, стеклянные пипетки, кюветы с длиной оптического пути 5 мм, ФЭК, центрифуга, термостат.

Ход работы. Из ушной вены кролика собирается 2 мл крови. Для образования сгустка цельную кровь выдерживают при комнатной температуре в течение 5 минут. После этого кровь центрифугируется на центрифуге в течение 10 минут при скорости вращения ротора 3000 об/мин (для получения сыворотки). В полученной сыворотке крови определяют содержание глюкозы. Для этого готовят пробы согласно приведенной табл. 17.

Таблица 17

Раствор	Исследуемая проба (А)	Эталон (Э)	Контроль
Сыворотка крови (мл)	0,02		
Глюкоза (мл)		0,02	
Дистиллированная вода (мл)			0,02
Рабочий реактив	3	3	3

Содержимое каждой пробирки перемешивают, после чего пробирки помещают в термостат на 15 мин при температуре 37 °С.

Измеряют оптическую плотность опытных проб (А) и эталона (Э) против контрольного раствора на ФЭКе (длина волны 500 нм).

Расчет производят по формуле

$$\text{Глюкоза (ммоль/л)} = 10 \cdot A / Э.$$

Содержание глюкозы в сыворотке крови у человека в норме колеблется от 3,6 ммоль/л до 6,7 ммоль/л.

Клинико-диагностическое значение. Увеличение содержания глюкозы в крови (гипергликемия) наблюдается при сахарном диабете, остром панкреатите, панкреатических некрозах, эмоциональных стрессах, после эфирного наркоза, обильного приема углеводов с пищей, а также при повышении

гормональной активности ряда желез (щитовидной, гипофиза, коркового и мозгового вещества надпочечников). Снижение уровня глюкозы в крови (гипогликемия) встречается при поражении паренхимы печени, нарушении ферментативной активности при распаде гликогена, недостаточной функции щитовидной железы, надпочечников, гипофиза, передозировке инсулина при лечении сахарного диабета, нарушении всасывания углеводов, отравлениях фосфором, бензолом, хлороформом, при недостатке приема с пищей углеводов, а также после больших потерь крови.

Работа 44. Влияние инсулина на содержание глюкозы в крови

Уровень глюкозы в крови находится под контролем нервной системы и эндокринных желез, поэтому в здоровом организме возможны лишь кратковременные его колебания. Это происходит при стрессовых реакциях, болевых приступах, эмоциональных возбуждениях и связано с выбросом в кровь значительного количества адреналина и АКТГ. Стойкая гипер- и гипогликемия наблюдается при нарушении функции поджелудочной железы и надпочечников.

Инсулин при введении в организм вызывает снижение уровня глюкозы в крови и применяется при лечении сахарного диабета. Особенно чувствительна к снижению уровня глюкозы в крови центральная нервная система, так как глюкоза является для нее основным источником энергии. Поэтому, вводя инсулин с лечебной целью при сахарном диабете, необходимо следить за уровнем глюкозы (гипогликемия может вызвать судороги и привести к летальному исходу). В таких случаях нужно срочно ввести глюкозу или адреналин. Понижение уровня глюкозы в крови под влиянием инсулина обусловлено тем, что он стимулирует синтез гликогена из глюкозы в печени и мышцах и тормозит распад гликогена в печени. Инсулин помогает превращению всосавшихся углеводов в жиры, увеличивает проницаемость клеточных мембран в мышечной и жировой тканях для глюкозы, способствуя переходу глюкозы из крови в ткани и ее окислению. Инсулин устраняет тормозящее действие глюкокортикоидов на гексокиназу (увеличивает ее активность), стимулирует цикл трикарбоновых кислот, угнетает активность глюкозо-6-фосфатазы и аденилатциклазы, активирует гликогенсинтазу.

Исследуемый раствор: кровь.

Реактивы: препарат инсулина, гепарин, стерильный физиологический раствор (0,9-процентный раствор NaCl), этиловый спирт, стерильный 40-процентный раствор глюкозы, реактивы для количественного определения концентрации глюкозы (см. работу 43).

Оборудование: пипетки, химические пробирки, центрифужные пробирки, лезвие, вата, шприц, химические стаканы, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 5 мм.

Ход работы. Из ушной вены кролика до введения инсулина берут кровь и определяют в ней содержание глюкозы. Для предотвращения свертывания крови пробирку для взятия крови обрабатывают гепарином. Инсу-

лин вводят кролику из расчета 1,5 МЕ на 1 кг массы. Препарат инсулина содержит обычно от 20 до 40 МЕ в 1 мл. Его разводят физиологическим раствором так, чтобы взятое количество единиц инсулина содержалось в 3-х мл раствора. Из шприца вытесняют пузырьки воздуха, оставляя в нем 2 мл раствора инсулина, которые вводят кролику подкожно. Через 1 ч после введения инсулина у кролика повторно берут кровь и определяют в ней содержание глюкозы. По окончании опыта кролику обязательно подкожно вводят 40-процентный раствор глюкозы.

Работа 45. Влияние адреналина на содержание глюкозы в крови

В высоких концентрациях адреналин – сильный яд. Его физиологическое действие проявляется в ничтожно малых количествах: 0,0001 мг на 1 кг массы. Он быстро разрушается в желудочно-кишечном тракте; поэтому вводят адреналин подкожно и внутримышечно. При подкожном введении адреналина содержание глюкозы в крови увеличивается, наступает гипергликемия, и, если уровень ее достигает 8,88 ммоль/л, начинается выделение глюкозы с мочой (глюкозурия). Адреналин оказывает влияние на углеводный обмен, усиливая распад гликогена в печени до глюкозы. Адреналин через аденилатциклазу и 3'-5'-сАМР вызывает превращение неактивной фосфоорилазы «b» в активную фосфоорилазу «a», катализирующую распад гликогена в печени. Адреналин в крови инактивируется моноаминооксидазой. В крови в тканях наряду со свободным адреналином обнаружен комплекс адреналина с белком, который способствует сохранению адреналина в организме. Вводя адреналин в организм кролика и определяя содержание глюкозы до и после введения, можно установить его влияние на углеводный обмен.

Исследуемый материал: кровь.

Реактивы: препарат адреналина, гепарин, стерильный физиологический раствор (0,9-процентный раствор NaCl), этиловый спирт, стерильный 40-процентный раствор глюкозы, реактивы для количественного определения концентрации глюкозы (см. работу 43).

Оборудование: пипетки, химические пробирки, центрифужные пробирки, лезвие, вата, шприц, химические стаканы, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 5 мм.

Ход работы. У кролика берут кровь из ушной вены до введения адреналина и определяют в ней содержание глюкозы глюкозооксидазным методом. После этого кролику подкожно вводят 0,1-процентный раствор адреналина из расчета 0,3 мл на кг массы тела. Через 30 мин после введения адреналина у кролика снова берут кровь и определяют в ней содержание глюкозы.

Работа 46. Определение гликолитической активности эритроцитов

Гликолиз – анаэробный процесс расщепления углеводов до лактата – является основным источником энергии зрелых эритроцитов. В отличие от

большинства тканей, эритроциты гликолизируют в присутствии кислорода. Данный метод определения гликолитической активности основан на измерении убыли глюкозы гликолизирующей пробой после одночасовой инкубации при 37 °С. Глюкозу определяют глюкозооксидазным методом (см. работу 43).

Исследуемый материал: упакованные эритроциты.

Реактивы: раствор Кребс-Рингера (готовят смешиванием 2 мл 0,6 М NaCl, 1 мл 56 мМ MgCl₂, 1 мл 20 мМ CaCl₂, 1 мл 10 мМ Na₂HPO₄, 4 мл 60 мМ трисHCl-буфера, рН 7,4), 5-процентный раствор ТХУ, реактивы для определения концентрации глюкозы глюкозооксидазным методом (см. работу 43), глюкоза.

Оборудование: пробирки, пипетки, центрифуги, аналитические весы, спирт, лезвия, вата, гематокритный капилляр, линейка, ледяная баня, термостат, ФЭК, кюветы с длиной светового пути 5 мм.

Ход работы. Гепаринизированную кровь кролика центрифугируют для получения упакованных эритроцитов. После центрифугирования убирают слой плазмы и тонкую белую лейкоцитарную пленку. Оставшуюся эритроцитарную массу осторожно взбалтывают и определяют ее гематокрит, используя для этого гематокритные капилляры и гематокритную центрифугу. Величину гематокрита определяют по отношению длины эритроцитарного столба к длине всего капилляра и выражают ее в процентах. После этого готовят инкубационную пробу. Инкубационная проба содержит 1 мл упакованных эритроцитов с известной концентрацией, 2 мл раствора Кребс-Рингера и глюкозу в конечной концентрации 10 мМ. Сразу же после приготовления инкубационной пробы ее делят на 2 равные части (по 1,5 мл). Одну пробирку (контрольную) немедленно помещают в ледяную баню и в дальнейшем используют для определения начальной концентрации глюкозы. Вторую пробирку (опытную) инкубируют в термостате в течение 1 часа при температуре 37 °С, а затем используют для определения конечной концентрации глюкозы.

Через один час в каждую пробу добавляют 1,5 мл 5-процентный ТХУ (для осаждения белков и прекращения реакции). Через 5 мин пробы центрифугируют в течение 10 мин при скорости 3000 об/мин.

В супернатанте определяют концентрацию глюкозы глюкозооксидазным методом (см. работу 42).

Гликолитическую активность рассчитывают по формуле

$$A = \frac{100K(a - b)}{Ht},$$

где А – гликолитическая активность эритроцитов, (мкмоль) глюкозы, утилизированной 1 мл упакованных эритроцитов за 1 ч инкубации; а – концентрация глюкозы в контрольной пробе (мкмоль/мл); b – концентрация глюкозы в опытной пробе (мкмоль/мл); К – коэффициент разведения (6); Ht – гематокрит (%); 100 – коэффициент пересчета гематокрита (%).

Работа 47. Количественное определение содержания гликогена
в печени и скелетных мышцах крысы

Гликоген представляет собой белый порошок, хорошо растворяющийся в воде (с образованием коллоидного раствора). Подобно белкам, гликоген обладает резко выраженными гидрофильными свойствами, поэтому его можно легко выделить из растворов при высаливании солями щелочных, щелочноземельных, тяжелых металлов и спиртом. В печени человека при нормальном питании создается депо из 80–120 г гликогена. При голодании в течение суток почти весь запас гликогена расходуется, и его не удается обнаружить при помощи обычных качественных реакций.

Метод выделения гликогена основан на том, что он хорошо растворяется в воде и достаточно устойчив в слабокислой среде. Поэтому выделение гликогена сводится к механическому разрушению ткани и экстракции гликогена 5-процентным раствором ТХУ. Основная масса белков при этом денатурирует и легко удаляется центрифугированием.

Для количественного определения гликогена наиболее часто используют химические методы определения с помощью антронового реактива или с применением фенола и серной кислоты. Оба метода позволяют определять гликоген без предварительного его гидролиза, что значительно экономит время.

Принцип метода. Гексозы в присутствии концентрированной серной кислоты дегидратируются и конденсируются с антроном, давая соединение, окрашивающее раствор в синий цвет.

Исследуемый материал: печень и скелетные мышцы сытой и голодной крысы.

Реактивы: 66-процентный раствор серной кислоты (к 34 мл воды осторожно приливают 66 мл концентрированной серной кислоты и охлаждают). Антроновый реактив (к 100 мл 66-процентной серной кислоты добавляют 1 г тиомочевины и 50 г антрона, смесь помещают в водяную баню и нагревают при перемешивании до 80–90 °С). Стандартные растворы глюкозы (50, 100, 200 мг растворяют в 500 мл насыщенного раствора бензойной кислоты). Физиологический раствор (0,9-процентный раствор NaCl). 5-процентный раствор ТХУ.

Оборудование: баня водяная, ФЭК, пробирки центрифужные, стеклянные пипетки, пробирки с обратным холодильником, кюветы с длиной оптического пути 5 мм.

Ход работы. В опыте используют печень и скелетную мускулатуру сытого и голодавшего животных. Печень и скелетные мышцы быстро извлекают, нарезают на тонкие пласты и немедленно опускают в стаканы с кипящим изотоническим раствором хлорида натрия для инактивации фермента фосфоорилазы гликогена, очень активно разрушающего гликоген. Через 10

мин печень и мышцы извлекают из раствора. Дальнейшее исследование печени и мышц сытого и голодавшего животных проводят параллельно.

Отвешивают на весах 0,5 г печени и мышц, помещают в ступки, заливают 3 мл 5-процентной ТХУ и растирают пестиком в течение 10 минут. Затем к экстракту добавляют 3 мл дистиллированной воды, суспензию перемешивают и центрифугируют в течение 5 мин при скорости 3000 об /мин. В надосадочной жидкости определяют содержание гликогена.

Для этого в пробирки наливают по 0,5 мл супернатанта, содержащего 20–200 мкг гликогена и 50, 100 и 200 мкг глюкозы (для построения стандартной кривой). Для контроля в 2 пробирки наливают по 0,5 мл воды. Во все пробирки приливают по 5 мл антронового реактива. Добавление реактива следует проводить быстро, так, чтобы струя попадала в центр проб. Смесь немедленно перемешивают и выдерживают 10–15 мин при комнатной температуре, а затем переносят в кипящую водяную баню на 15 минут. При нагревании следят, чтобы в пробирки не попала вода, которая мешает колориметрированию (раствор мутнеет). По окончании нагревания пробирки быстро охлаждают в проточной воде и оставляют в темном месте на 30 минут. Окрашенные растворы колориметрируют при 620 нм в кювете с длиной оптического пути 5 мм. Количество глюкозы в испытуемых пробах с гликогеном рассчитывают по стандартной кривой, которую строят для каждой серии определений. Для пересчета на содержание гликогена полученное количество глюкозы умножают на 0,9. (Молекулярная масса остатка глюкозы в гликогене равна 162,1, глюкозы – 180,1. $162,1 : 180,1 = 0,8999$, или 0,9)

Контрольные вопросы

1. Какими свойствами гликогена можно объяснить реакции осаждения?
2. Какой принцип положен в основу метода определения уровня глюкозы в крови?
3. Два пациента сдали кровь для определения в ней уровня глюкозы. Один пациент пришел строго натощак, другой – спустя 1,5 ч после приема пищи. У кого из пациентов получены достоверные результаты?
4. У новорожденного обнаружили гипогликемию, повышенное содержание пирувата и лактата в крови. В интервалах между кормлениями у ребенка возникали судороги, однако на короткое время состояние больного резко улучшалось. Эти данные позволили предположить у ребенка наличие наследственного нарушения обмена гликогена. Используя имеющуюся информацию, назовите фермент, дефект которого вызывает такую клиническую картину болезни.

РАЗДЕЛ 3. БИОЭНЕРГЕТИКА

Обмен энергии в организме тесно связан с обменом веществ. Аэробные организмы, к которым относятся млекопитающие, получают большую часть энергии за счет биологического окисления, при котором во время катаболизма электроны переносятся от органических молекул на молекулу кислорода. Этот перенос осуществляется дыхательной цепью (электрон-транспортной цепью ЭТЦ), состоящей из белковых комплексов, находящихся во внутренней мембране митохондрий и содержащих реакционные центры. Более половины свободной энергии электронов расходуется на синтез АТФ. АТФ служит источником энергии для протекания большого количества химических реакций. Основными субстратами (донорами электронов) для митохондриальной дыхательной цепи являются компоненты общего пути катаболизма (пируват, изоцитрат, малат, сукцинат, α -кетоглутарат). В этот путь включаются все метаболиты белкового, углеводного и липидного обмена.

Работа 48. Сравнительное изучение активности сукцинатдегидрогеназы в различных тканях крыс и ее конкурентное торможение

Сукцинатдегидрогеназа является железофлавопротеином и прочно связана с клеточной структурой.

Принцип метода. Для определения активности фермента в качестве окисляемого субстрата берут янтарную кислоту, а в качестве акцептора водорода – краситель 2,6-дихлорфенолиндофенол (синего цвета), который, восстанавливаясь, превращается в бесцветную лейкоформу. Источником фермента служат гомогенаты мышц, мозга, печени, почек крысы. Сукцинатдегидрогеназная активность тормозится в присутствии малоновой кислоты ($\text{HOOC-CH}_2\text{-COOH}$), являющейся структурным аналогом янтарной кислоты.

Исследуемый материал: скелетные мышцы, мозг, печень, почки, сердце крысы.

Реактивы: 1-процентный раствор янтарной кислоты, 1-процентный раствор малоновой кислоты, 10-процентный раствор NaOH, 0,1-процентный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола, дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки, пипетки, воронки, стеклянные палочки, ступки, марлевые фильтры, пинцет, кипящая водяная баня, ножницы.

Ход работы. Для получения ферментативного препарата 1 г свежей ткани, измельченной ножницами, растирают в ступке с небольшим количеством воды. Затем кашицу переносят на двойной слой марли, помещенной на воронку, и промывают 50-ью мл дистиллированной воды. Промытую кашицу отжимают, переносят в пробирку и суспендируют стеклянной палочкой в 4 мл воды. Полученную суспензию равномерно разливают в 4 пробирки.

Содержимое 1-й пробирки кипятят в течение 1-2 мин для инактивации фермента. Затем в пробирки наливают реактивы по схеме, приведенной в [табл. 18](#).

Таблица 18

№ пробы	Сукцинат, мл	H ₂ O, мл	Малонат, мл	Краситель, мл	Окраска	Вывод
1.	1	0,5	–	2 капли		
2.	1	0,5	–	2 капли		
3.	–	1,5	–	2 капли		
4.	1	–	0,5	2 капли		

Через 15 мин наблюдают окраску раствора в пробирках. Делают вывод.

Работа 49. Количественное определение макроэргических соединений в мышцах (АТФ и креатинфосфат)

В мышечной ткани содержится два макроэргических соединения: АТФ и креатинфосфат. Они обеспечивают мышцу по мере надобности большим количеством энергии.

Основной путь образования АТФ в тканях – окислительное фосфорилирование в процессе тканевого дыхания. Креатинфосфат образуется при участии АТФ в состоянии покоя и служит резервом высокоэргического фосфата для синтеза АТФ из АДФ при активной мышечной работе.

Принцип метода. Метод определения макроэргических соединений в мышцах основан на том, что два последних остатка фосфорной кислоты в АТФ, богатые энергией, как и фосфатный остаток в креатинфосфате, легко отщепляются при непродолжительном гидролизе в кислой среде (так называемый лабильно связанный фосфор). Сравнение содержания неорганического фосфора в пробах до и после гидролиза дает представление о количестве лабильно связанного фосфора, которое приходится на долю макроэргических соединений мышечной ткани. Количество фосфора определяют по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты.

Исследуемый материал: скелетные мышцы крысы.

Реактивы: 2,5-процентный раствор ТХУ, 1 М раствор HCl, 1 М раствор NaOH, 1-процентный раствор молибдата аммония, 1-процентный раствор аскорбиновой кислоты.

Оборудование: пробирки, пипетки, воронки, фильтры, мерная пробирка или цилиндр объемом 10 мл, ледяная и кипящая водяная бани, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 10 мм.

Ход работы. Мышечную кашицу в количестве 0,5 г помещают в пробирку, стоящую на ледяной бане, и добавляют в нее 5 мл охлажденного раствора ТХУ. Содержимое пробирки перемешивают стеклянной палочкой для экстрагирования АТФ и креатинфосфата в течение 5 мин. Экстракт фильтруют в мерную пробирку, стоящую на ледяной бане.

Остаток мышечной кашицы в пробирке заливают 5-ью мл дистиллированной воды и продолжают экстракцию на холоде в течение 5 минут. Полу-

ченный экстракт фильтруют в ту же мерную пробирку и доводят общий объем до 10 мл дистиллированной водой.

В 2 пробирки – контрольную и опытную – наливают по 0,5 мл безбелкового фильтрата. В опытную пробирку добавляют 1 мл 1 моль/л HCl, закрывают фольгой и помещают на кипящую водяную баню на 10 мин для гидролиза фосфорных связей. Затем раствор охлаждают и добавляют 1 мл 1 моль/л NaOH.

В контрольную пробирку (без предварительного кипячения) добавляют 1 мл 1 моль/л раствора HCl и 1 мл 1 моль/л NaOH. Затем в обе пробирки добавляют по 7,5 мл дистиллированной воды (до получения объема 10 мл).

Дальнейшие процедуры проводят обязательно одновременно. Из обеих пробирок отливают по 5 мл жидкости, переносят в 2 другие пробирки и добавляют в каждую из них по 0,5 мл молибдата аммония, 0,5 мл аскорбиновой кислоты и 2 мл дистиллированной воды. Смесь в каждой пробирке быстро перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре строго в течение 10 минут.

Контрольную и опытную пробы колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром (длина волны 670 нм) в кюветах с толщиной слоя 1,0 см против воды. В опытной пробе (после гидролиза) определяемый неорганический фосфат представляет собой сумму лабильно связанного фосфора и солей фосфата, присутствующих в тканях. В контрольной пробе определяются только фосфатные соли.

Из оптической плотности, найденной для опытной пробы, вычитают оптическую плотность, полученную для контрольной пробы. Концентрацию лабильно связанного неорганического фосфата в пробе находят по калибровочному графику. Для его построения используют концентрации неорганического фосфата от 200 мкг до 20 мкг в пробе.

Рассчитывают количество лабильно связанного фосфора в миллиграммах на 100 г сырой массы, учитывая разведение:

$$x = 100A (3,3 \cdot 400),$$

где x – содержание макроэргических соединений в пересчете на 1 мг АТФ в 100 г сырой ткани, мг/100 г; A – содержание АТФ в пробе, мг; $(3,3 \cdot 400)$ – коэффициент пересчета на 1 г ткани с учетом разведения растворов.

Принцип метода и полученные результаты записывают в тетрадь.

Контрольные вопросы

1. На чем основан принцип обнаружения активности сукцинатдегидрогеназы?
2. Какие вещества служат источниками энергии в работающей мышце?
3. Напишите реакцию окисления сукцината, укажите фермент и дальнейший путь водорода до кислорода. Определите Р/О данной реакции. Как

изменится этот коэффициент, если указанную реакцию проводить в присутствии: а) малоната, б) избытка ADP, в) 2,4-динитрофенола? Объясните механизм этих изменений.

4. В опыте *in vitro* изучали клеточное дыхание на препаратах изолированных митохондрий, наблюдая за тем, как изменяется поглощение кислорода этими препаратами в зависимости от условий. Если к суспензии митохондрий, использующих в качестве единственного источника «топлива» цитрат, добавить 0,01 М раствор малоната натрия, то дыхание внезапно прекращается и накапливается один из промежуточных продуктов метаболизма. А. Какова структура накапливающегося промежуточного продукта? Б. Почему он накапливается? В. Почему прекращается потребление кислорода? Г. Каким способом (кроме простого удаления малоната) можно снять вызванное малонатом ингибирование? Ответ поясните.

5. Два препарата свежих митохондрий поместили в среду с достаточным содержанием кислорода и субстрата. В каком из препаратов будет наблюдаться более интенсивное дыхание: а) концентрация ADP в среде 10 ммоль; б) концентрация ADP в среде 100 ммоль? Объясните ответ.

6. Цианистый калий (KCN) – очень сильный для человека яд. Концентрация 0,1 мг/л является смертельной дозой. Как можно объяснить токсическое действие этого соединения? Ответ обоснуйте схемой.

7. Мышечную кашицу как источник митохондриальных ферментов поместили в 2 пробирки и в одну из них добавили ротенон. Затем в обе пробирки в качестве субстратов добавили сукцинат и дихлофенолиндофенол и провели инкубацию в течение 15 минут. Сравните окраску в пробирках и объясните полученные результаты.

РАЗДЕЛ 4. ОБМЕН ЛИПИДОВ

Работа 50. Исследование действия липазы поджелудочной железы

Жиры, или триацилглицерины, практически не всасываются в пищеварительном тракте. В тонкой кишке происходит их гидролиз, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой. Существует несколько типов панкреатических липаз. Одни из них специфичны в отношении эфирных связей в α -положении триацилглицерина, а другие гидролизуют связи в β -положении. Полный гидролиз триацилглицеринов происходит постадийно: сначала гидролизуются α -связи, а затем более медленно гидролизуются β -моноацилглицерины. Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, моно- и диацилглицерины) всасываются в стенках кишечника.

В процессе переваривания и всасывания липидов важную роль играют желчные кислоты. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов переваривания.

Исследуемый материал: молоко, разведенное в соотношении 1:10.

Реактивы: спиртовой раствор фенолфталеина; 0,01-процентный раствор NaOH; панкреатин, содержащий липазу.

Оборудование: колбы на 25 мл, мерные цилиндры на 10 мл, пипетки, термостат, кипящая водяная баня, бюретка.

Ход работы. Готовят 3 колбы для опытных и контрольной проб. Для контрольной пробы липазу, содержащуюся в панкреатине, предварительно кипятят в течение 10 мин на кипящей бане. В каждую колбу наливают молоко, препарат липазы и желчь, как указано в табл.19.

Таблица 19

Компоненты инкубационной смеси	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Контроль, мл
Молоко (разведенное в соотношении 1:10)	10	10	10
Препарат липазы	1	1	1 (прокипяченная)
Препарат желчи	–	1	–

Приготовленные инкубационные смеси тщательно перемешивают. Затем из каждой колбы отбирают по 2 мл смеси в заранее приготовленные стаканчики для титрования. В каждый стаканчик добавляют по 2 капли раствора фенолфталеина и титруют раствором NaOH до слабо-розового окрашивания. При первом титровании нейтрализуются органические кислоты – молочная и другие, – которые присутствуют в молоке до начала действия липазы.

Оставшуюся в колбах смесь помещают в термостат (температура 38–40 °С), через определенные интервалы (10, 20, 30, 40 мин) из каждой пробы отбирают, не вынимая из термостата, по 2 мл смеси и титруют 0,01 моль/л

раствором NaOH. Время титрования и объем гидроксида натрия фиксируют в табл. 20.

Таблица 20

Время инкубации, мин	Объем NaOH, пошедшего на титрование, мл		
	Опыт 1	Опыт 2	Контроль
0			
10			
20			
30			

Результаты первого титрования, полученного до начала действия липазы, вычитают из результатов последующих титрований.

На основании полученных данных строят график, где по оси абсцисс откладывают время (в минутах), а по оси ординат – активность липазы, выраженную объемом раствора NaOH (мл), потраченного на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени. Делают выводы об условиях работы липазы.

Работа 51. Определение общих липидов в сыворотке крови

Общие липиды в крови представлены нейтральными жирами, свободными жирными кислотами, фосфолипидами, холестерином, липопротеинами различной плотности и являются показателями липидного обмена. Существуют различные методы количественного определения общих липидов: колориметрические, нефелометрические.

Принцип метода. Продукты гидролиза ненасыщенных липидов образуют с фосфованилиновым реактивом соединение красного цвета, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна содержанию общих липидов.

Исследуемый материал: плазма и эритроциты кролика.

Реактивы: стандартный раствор липидов (8 г/л), концентрированная серная кислота, фосфованилиновый реактив.

Оборудование: пробирки, пипетки, водяная баня, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 5 мм.

Ход работы. Производят гидролиз липидов. Для этого в сухие пробирки приливают реактивы по схеме, указанной в табл. 21.

Таблица 21

Реактивы (мл)	Опытная проба	Стандартная проба	Контроль
Сыворотка	0,02	–	–
Стандартный раствор	–	0,02	–

1	2	3	4
Серная кислота	1,50	1,50	1,50
Пробы перемешать и нагревать 15 мин в кипящей водяной бане. Затем охладить и гидролизат использовать для приготовления других проб			
Гидролизат (для каждой пробы свой)	0,10	0,10	0,10
Фосфованилиновый реактив	1,50	1,50	1,50

Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 40 минут. Колориметрируют опытные и стандартную пробы против контроля при зеленом светофилтре в кювете толщиной 0,3 см. Расчет содержания общих липидов проводят по формуле

$$A = 8 E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}} \text{ (г/л)}.$$

Нормальное содержание липидов – 4-8 г/л.

Клинико-диагностическое значение. Как физиологическое явление увеличение содержания липидов в крови (гиперлипемия) наступает через 1–4 ч после приема пищи. Концентрация липидов в крови увеличивается при диабете (до 10-20 г/л), липоидном нефрозе, циррозе печени, ожирении, атеросклерозе, ишемической болезни сердца, гипотиреозе, панкреатите.

Работа 52. Количественное определение липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в сыворотке крови

Большинство липидов находится в крови не в свободном состоянии, а в составе белково-липидных комплексов: хиломикронов, α -липопротеинов, β -липопротеинов. Липопротеины можно разделить различными методами: центрифугированием в солевых растворах различной плотности, электрофорезом, тонкослойной хроматографией. При ультрацентрифугировании выделяются хиломикроны и липопротеины разной плотности: высокой (ЛПВП – α -липопротеины), низкой (ЛПНП – β -липопротеины), очень низкой (ЛПОНП – пре- β -липопротеины) и др.

Фракции липопротеинов отличаются по количеству белка, относительной молекулярной массе липопротеинов и процентному содержанию отдельных липидных компонентов. Так, α -липопротеины, содержащие большое количество белка (50–60 %), имеют более высокую относительную плотность (1,063–1,21), тогда как β -липопротеины и пре- β -липопротеины, содержащие меньше белка и значительное количество липидов – до 95 % от всей относительной молекулярной массы, – имеют низкую относительную плотность (1,01–1,063).

Принцип метода. При взаимодействии ЛПНП сыворотки крови с гепариновым реактивом появляется мутность, интенсивность которой определяется фотометрически. Гепариновый реактив представляет собой смесь гепарина с хлоридом кальция.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы: 0,27-процентный раствор CaCl_2 , 1-процентный раствор гепарина.

Оборудование: микропипетка, ФЭК, кювета с длиной оптического пути 5 мм, пробирки.

Ход работы. В пробирку вносят 2 мл 0,27-процентного раствора CaCl_2 и 0,2 мл сыворотки крови, перемешивают. Определяют оптическую плотность раствора (E_1) против 0,27-процентного раствора CaCl_2 в кюветах при красном светофильтре (630 нм). Раствор из кюветы переливают в пробирку, добавляют микропипеткой 0,04 мл 1-процентного раствора гепарина, перемешивают и точно через 4 мин снова определяют оптическую плотность раствора (E_2) в тех же условиях.

Вычисляют разность оптической плотности и умножают ее на 1000 – коэффициент эмпирический, предложенный Ледвиной. Построение калибровочной кривой сопряжено с рядом трудностей. Ответ выражают в г/л.

$$x(\text{г/л}) = 1000 (E_2 - E_1).$$

Клинико-диагностическое значение. Содержание ЛПНП (β -липопротеинов) в крови колеблется в зависимости от возраста, пола и составляет в норме 3,0-4,5 г/л. Увеличение концентрации ЛПНП наблюдается при атеросклерозе, механической желтухе, острых гепатитах, хронических заболеваниях печени, диабете, гликогенозах, ксантоматозе и ожирении, снижение – при β -плазмоцитоме. Среднее содержание холестерина в ЛПНП – около 47 %.

Работа 53. Определение общего холестерина в сыворотке крови, основанное на реакции Либермана-Бурхарда (метод Илька)

Экзогенный холестерин в количестве 0,3–0,5 г поступает с пищевыми продуктами, а эндогенный синтезируется в организме в количестве 0,8–2 г в сутки. Особенно много синтезируется холестерина в печени, почках, надпочечниках, артериальной стенке. Холестерин синтезируется из 18-ти молекул ацетил-СоА, 14-ти молекул NADPH, 18-ти молекул АТФ.

При добавлении к сыворотке крови уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты жидкость окрашивается последовательно в красный, синий и наконец зеленый цвет. Реакция обусловлена образованием сульфокислоты холестерилена зеленого цвета.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы: реактив Либермана-Бурхарда (смесь ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты в соотношении 1:5:1), стандартный (1,8 г/л) раствор холестерина.

Оборудование: сухие пробирки, сухие пипетки, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 5 мм, термостат.

Ход работы. Все пробирки, пипетки, кюветы должны быть сухими. Работать с реактивом Либермана-Бурхарда нужно очень осторожно. В сухую пробирку помещают 2,1 мл реактива Либермана-Бурхарда, очень медленно по стенке пробирки добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки крови, энергично встряхивают пробирку, а затем термостатируют в течение 20 мин при 37 °С. Развивается изумрудно-зеленая окраска, которую колориметрируют на ФЭКе при красном светофильтре (630–690 нм) против реактива Либермана-Бурхарда. Полученную на ФЭКе оптическую плотность используют для определения концентрации холестерина по калибровочному графику. Найденную концентрацию холестерина умножают на 1000, так как сыворотки в опыт берется 0,1 мл. Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л) равен 0,0258. Нормальное содержание общего холестерина, свободного и эстерифицированного в сыворотке крови 2,97–8,79 ммоль/л (115–340 мг %).

Построение калибровочного графика. Из стандартного раствора холестерина, где в 1 мл содержится 1,8 мг холестерина, берут по 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 мл и доводят до объема 2,2 мл реактивом Либермана-Бурхарда (соответственно 2,15; 2,1; 2,05; 2,0; 1,95 мл). Количество холестерина при этом в пробе составляет 0,09; 0,18; 0,27; 0,36; 0,45 мг. Полученные стандартные растворы холестерина, как и опытные пробирки, энергично встряхивают и помещают в термостат на 20 мин, после чего фотометрируют. Калибровочный график строят по величинам экстинкций, полученных в результате фотометрирования стандартных растворов.

Клинико-диагностическое значение. При нарушении жирового обмена холестерин может накапливаться в крови. Увеличение содержания холестерина в крови (гиперхолестеринемия) наблюдается при атеросклерозе, сахарном диабете, механической желтухе, нефрите, нефрозе (особенно липоидных нефрозах), гипотиреозе. Понижение холестерина в крови (гипохолестеринемия) наблюдается при анемиях, голодании, туберкулезе, гипертиреозе, раковой кахексии, паренхиматозной желтухе, поражении ЦНС, лихорадочных состояниях, при введении инсулина.

Работа 54. Определение общих фосфолипидов в плазме крови

Фосфолипиды – группа липидов, содержащих фосфор. В зависимости от входящего в их состав спирта, фосфолипиды можно разделить на 2 группы: глицерофосфолипиды, сфингофосфолипиды. Нормальное содержание фосфолипидов (общих) в сыворотке крови 1,52–3,62 г/л (152–362 мг %), а лецитина – 0,75–1,2 г/л (75–120 мг %). Общую концентрацию фосфолипидов определяют по содержанию липидного фосфора, на долю которого прихо-

дится 4 % относительной молекулярной массы липидов. Умножая найденное количество липидного фосфора на 25, рассчитывают содержание общих фосфолипидов. Липидный фосфор определяют либо в липидном экстракте, либо после осаждения белков сыворотки крови ТХУ.

Принцип метода. Фосфолипиды осаждаются ТХУ вместе с белками крови. В полученном осадке фотометрически определяют содержание фосфора.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы: 10-процентный раствор ТХУ, 42-процентный раствор HClO_4 , 4-процентный раствор молибдата аммония, стандартный раствор однозамещенного фосфата калия (1 мг в 1 мл), рабочий раствор однозамещенного фосфата калия (стандартный раствор разводят в 100 раз, 1 мл рабочего раствора содержит 10 мкг фосфора), 1-процентный раствор аскорбиновой кислоты в 0,1 н HCl (хранят в холодильнике).

Оборудование: пробирки, пипетки, центрифуга, воронка, фильтровальная бумага, водяная баня, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 5 мм.

Ход работы. В пробирку наливают 3 мл воды и вносят 0,2 мл сыворотки или плазмы крови. Добавляют 3 мл 10-процентной ТХУ: первые 1,5 мл добавляют по каплям, встряхивая пробирку, остальные – быстрее. Смесь оставляют стоять в течение 2 мин, затем центрифугируют при скорости 3000 об/мин в течение 5 мин, до образования осадка. Надосадочную жидкость сливают и переворачивают пробирку до тех пор, пока не стечет вся жидкость, высушивая края фильтровальной бумагой. К осадку прибавляют 1 мл

42-процентной HClO_4 .

Пробирку нагревают 20 мин на кипящей водяной бане до тех пор, пока смесь не станет бесцветной. Рекомендуется наблюдать за процессом, пока не пройдет образование пены (5 мин). Сразу же после охлаждения в пробирку приливают 5 мл воды.

Готовят контроль на реактивы и 3 стандарта. В 4 пробирки наливают по 0,8 мл 42-процентного раствора HClO_4 ; в три пробирки приливают по 2 мл рабочего раствора фосфатного стандарта. Контроль и стандартные пробы доливают водой до объема 6 мл.

Пробы располагаются в следующем порядке: контрольная, две стандартные, опытная, стандартная. В каждую пробирку прибавляют по 1 мл 2,5-процентного раствора молибдата аммония, 0,5 мл 1-процентного раствора аскорбиновой кислоты; водой доводят объем до 10 мл, перемешивают и оставляют смесь при комнатной температуре для развития окраски на 5 минут. Далее пробы фотометрируют против контроля на красном светофильтре в кюветах на 1,0 см.

Расчет производят по формуле

$$\text{Липидный фосфат плазмы или сыворотки} = 10 \cdot E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}$$

Для выражения результатов в ммоль/л полученные данные умножают на коэффициент 0,3229.

У здоровых взрослых людей содержание липидного фосфата составляет 1,97–4,68 ммоль/л (6,1–15,5 мг %). Полученное количество липидного фосфата умножают на 25 и получают количество фосфолипидов.

Клинико-диагностическое значение. Повышение уровня фосфолипидов в сыворотке крови наблюдается при тяжелой форме сахарного диабета, нефрозах, хронических нефритах, эссенциальной гиперлипемии, а также при застойной желтухе, печеночной коме, постгеморрагических анемиях. Снижение уровня фосфолипидов отмечается при атеросклерозе, малокровии, острых лихорадочных состояниях, алиментарной дистрофии, истощении.

Контрольные вопросы

1. Каковы компоненты, участвующие в переваривании жиров? Расскажите о роли каждого из них.
2. Каковы основные причины нарушения всасывания жиров?
3. Каковы основные типы липопротеинов сыворотки крови? Укажите основные компоненты, входящие в их состав.
4. После приема жирной пищи сыворотка крови становится мутной, но вскоре опять возвращается к исходному состоянию. Объясните, почему сыворотка крови становится мутной и под действием какого фермента происходит ее «просветление».

РАЗДЕЛ 5. ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Структурными единицами нуклеиновых кислот являются азотистые, пуриновые и пиримидиновые, основания, пентоза (рибоза и дезоксирибоза) и фосфорная кислота. Биосинтез пуриновых и пиримидиновых оснований осуществляется клетками большинства тканей. Пуриновое кольцо синтезируется из аминокислот (глицин, глутамин, аспартат, производные тетрагидрофолата и CO_2). Пиримидиновое кольцо синтезируется из карбамоилфосфата и аспартата. Нуклеотидные коферменты FAD^+ , NAD^+ , NADP^+ , CoA, являющиеся производными адениловой кислоты, синтезируются из АТФ и соответствующих витаминов, а именно рибофлавина, никотиновой кислоты и пантотеновой кислоты. Предшественники ДНК – дезоксирибонуклеотиды – образуются путем восстановления рибонуклеозиддифосфатов.

Конечными продуктами распада пуриновых оснований в процессе их обмена в организме являются мочевая кислота, аллантоин, аллантоиновая кислота, мочевина и глиоксалева кислота., пиримидиновых оснований – карбаминовая кислота и β -аланин. Природа конечного азотсодержащего продукта, выводимого из организма, зависит от вида организма.

Работа 55. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот

Для изучения природы и свойств нуклеиновых кислот необходимо выделить их из ткани в нативном, по возможности неизменном, состоянии. Обычно этому препятствуют главным образом два обстоятельства: во-первых, крупные молекулы нуклеиновых кислот упакованы в структуры и прочно связаны с другими химическими компонентами клетки, в частности – с белками; во-вторых, в клетках всегда есть активные нуклеазы, заключенные преимущественно в лизосомах и переходящие в свободное состояние при гомогенизации тканей. Таким образом, при выделении нуклеиновых кислот особое внимание необходимо уделять инактивации нуклеаз, полноте гомогенизации и очистке препарата от сопутствующих примесей (белки, полисахариды, полифосфаты и др.).

Методы количественного определения нуклеиновых кислот, основанные на спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра, отличаются высокой чувствительностью и простотой проведения анализа. Необходимым этапом различных методов спектрофотометрического определения нуклеиновых кислот является их экстракция из биологического материала, сопряженная с гидролизом полинуклеотидов. В связи с этим нужно иметь в виду, что из исследуемого материала предварительно необходимо удалить свободные нуклеотиды.

В основе модификации спектрофотометрического метода определения суммарного содержания нуклеиновых кислот, разработанного А. С. Спири-

ным, лежит экстракция их горячей хлорной кислотой из биологического материала с последующим определением поглощения экстрактов в ультрафиолетовой области спектра при 270 и 290 нм.

Исследуемый материал: ткани печени, сердца, скелетной мускулатуры крысы.

Реактивы: HClO_4 – 0,2н и 0,5н растворы.

Оборудование: пипетки, центрифужные пробирки, пробки с воздушным холодильником, водяная баня, центрифуга, спектрофотометр, кюветы.

Ход работы. Измельченные на холоде навески ткани печени, сердца, скелетной мышцы (100–200 мг) помещают в центрифужные пробирки и доливают в каждую по 5–10 мл охлажденного 0,2 н раствора хлорной кислоты. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и осадок отделяют центрифугированием на холоде при скорости 5000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость отбрасывают и осадок повторно отмывают хлорной кислотой. Такая предварительная обработка материала необходима для удаления кислоторастворимых нуклеотидов. После удаления супернатанта к осадку добавляют 5–10 мл 0,5 н раствора хлорной кислоты и, закрыв пробирки пробками с воздушным холодильником, нагревают их в кипящей водяной бане в течение 30 минут. Эта процедура обеспечивает количественную экстракцию нуклеиновых кислот из исследуемого материала и их кислотный гидролиз до растворимых фрагментов. Гидролизаты охлаждают и центрифугируют. Гидролизаты из одинаковых тканей объединяют и определяют поглощение на спектрофотометре при 270 и 290 нм против контрольного раствора – 0,5 н раствора хлорной кислоты. При необходимости гидролизаты разводят тем же раствором.

Далее рассчитывают содержание фосфора нуклеиновых кислот в 1 мл исследуемого раствора по формуле

$$C_{\text{мкг Фн}} = \frac{(A_{270} - A_{290})}{0,19},$$

где 0,19 – значение $\Delta A = (A_{270} - A_{290})$, которое имеет гидролизат нуклеиновых кислот, содержащий 1 мкг нуклеинового фосфора в 1 мл раствора. При дальнейших расчетах учитывают общий объем гидролизата и разведения. Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество нуклеиновых кислот пользуются средним пересчетным коэффициентом 10,3:

$$C_{\text{мкг НК}} = 10,3C_{\text{мкг Фн}}.$$

Рекомендуется проводить дополнительное определение оптической плотности при 260 нм; оптическая плотность при 260 и 270 нм не должна различаться более чем на $\pm 15\%$.

Работа 56. Определение температуры «плавления» водородных связей

Соответствующие пары азотистых оснований нативной ДНК упорядоченно связаны между собой водородными связями, температура плавления которых носит характер одномоментного кооперативного процесса. Поэтому при исследовании зависимости E_p от температуры в случае нативных образцов ДНК наблюдается ярко выраженный фазовый переход, т.е. в узком температурном интервале происходит резкий прирост значения E_p . В денатурированных образцах ДНК, в которых водородные связи не упорядочены, последние разрушаются постепенно, при разных температурах. Таким образом, исследование температурных зависимостей E_p является одним из тестов на нативность ДНК. Замечено, что значение температуры «плавления» ДНК коррелирует с содержанием в ее молекуле ГЦ-пар.

Исследуемый материал: препарат ДНК.

Реактивы: стандартный солевой раствор, содержащий хлорид натрия (0,15 моль) и цитрат натрия (0,015 моль) в 1 л (рН=7,0).

Оборудование: спектрофотометр с термостатированной камерой.

Ход работы. Препарат ДНК растворяют (из расчета 10-20 мкг ДНК в 1 мл) в стандартном солевом растворе, разбавленном в 10 раз. Раствор помещают в кварцевую кювету (1 см) с герметической крышкой для предотвращения испарения. На спектрофотометре определяют экстинкцию (E_{260} нм) при разных температурах в промежутке от 25 до 95°C с интервалом не более 5 °C и выдержкой при определенной температуре в течение 5–10 минут. Если наблюдается резкое изменение экстинкции при какой-либо температуре, это указывает на то, что исследуемая ДНК нативна; если рост экстинкции происходит постепенно, то ДНК частично денатурирована (см. рисунок 1).

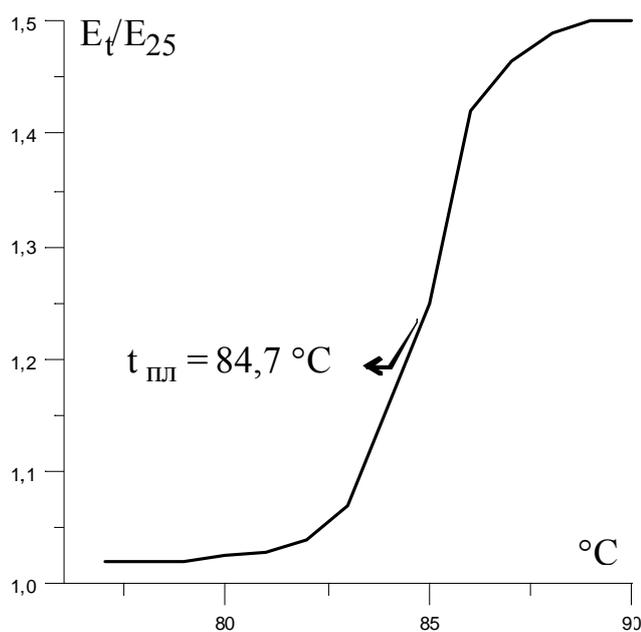


Рис 1. Кривая плавления ДНК, выделенной из микроорганизма *Proteus vulgaris*

По результатам измерений строят кривую «плавления». Для этого по оси ординат откладывают отношение оптической плотности раствора при измеряемой температуре (t) к оптической плотности при $25\text{ }^\circ\text{C}$, а по оси абсцисс – температуру. Точку «плавления» ($t_{\text{пл.}}$) ДНК находят по кривой «плавления» (см. рисунок). Она соответствует середине зоны подъема кривой относительной экстинкции.

Зависимость между точкой «плавления» и содержанием ГЦ-пар в ДНК определяют по формуле

$$c_{\text{ГЦ}} = 2,44 (t_{\text{пл.}} - 69,3),$$

где $c_{\text{ГЦ}}$ – содержание ГЦ-пар в молярных процентах; 69,3 и 2,44 – постоянные коэффициенты.

Средние данные получают из 3–4 параллельных опытов.

Работа 57. Определение содержания мочевой кислоты

В организме человека мочевая кислота – конечный продукт расщепления пуринов. Она выделяется с мочой. Исследование содержания мочевой кислоты в сыворотке крови используется в диагностических целях, поскольку увеличенное содержание мочевой кислоты в ней наблюдается при некоторых заболеваниях, в частности – подагре и синдроме Леша-Найхана.

Принцип метода определения содержания мочевой кислоты заключается в том, что мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамный реактив, а интенсивность образующейся окраски пропорциональна концентрации мочевой кислоты.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы: реактив Фолина (фосфорномолибденовый реактив), 20-процентный раствор ТХУ, насыщенный раствор Na_2CO_3 , стандартный раствор мочевой кислоты.

Приготовление стандартного раствора мочевой кислоты. 100 мг мочевой кислоты вносят в колбу на 500 мл. Затем в нее приливают 25 мл 0,5-процентного раствора углекислого лития, 25 мл дистиллированной воды и после растворения мочевой кислоты доводят объем дистиллированной водой до метки, предварительно добавив для стойкости 12,5 мл формалина. Раствор стоек около месяца. Из основного (20-процентного стандартного раствора) готовят 2-процентный рабочий раствор, разводя его в 10 раз. Рабочий раствор нестойк и может храниться лишь в течение 2–3 дней. 1 мл его содержит 0,2 мг мочевой кислоты.

Оборудование: центрифуга лабораторная, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 5 мм, центрифужные пробирки, стеклянные пробирки, пипетки градуированные, мерные колбы.

Ход работы. В центрифужную пробирку вносят 1,5 мл сыворотки, 1,5 мл дистиллированной воды и 1,5 мл 20-процентной ТХУ. Содержимое

пробирки тщательно перемешивают и через 30 мин центрифугируют при скорости 3000 об/мин в течение 10 минут. К 1,5 мл супернатанта приливают 0,7 мл насыщенного раствора Na_2CO_3 и одну каплю реактива Фолина. Параллельно с опытной пробой обрабатывают стандартную. В пробирку помещают 0,5 мл стандартного рабочего раствора мочевой кислоты, 0,5 мл 20-процентного раствора ТХУ, 0,5 мл дистиллированной воды, 0,7 мл насыщенного раствора Na_2CO_3 и 1 каплю раствора Фолина. Через 10 мин обе пробы колориметрируют на ФЭКе (зеленый светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 5 мм против дистиллированной воды.

Расчетная формула:

$$C_x = \frac{C_{\text{ст}} E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}},$$

где C_x – концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови в мг %; $C_{\text{ст}}$ – концентрация мочевой кислоты в стандартной пробе; $E_{\text{оп}}$ – экстинкция опытной пробы; $E_{\text{ст}}$ – экстинкция стандартной пробы.

Норма содержания мочевой кислоты в сыворотке крови 2–3 мг %.

Работа 58. Определение активности рибонуклеазы (КФ 2.7.7.16)

Нуклеиновые кислоты вовлекаются в деструктивный обмен при участии разнообразных нуклеаз. Существует несколько методов выявления их активности. Чаще всего пользуются измерением экстинкции при 260 нм до и после ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот, реже – измерением содержания фосфора или пентоз. Активность нуклеаз определяют также по изменению вязкости раствора ДНК в процессе гидролиза и по величине гиперхромного эффекта.

Данный метод основан на том, что под влиянием рибонуклеазы (КФ 2.7.7.16) происходит расщепление фосфодиэфирных связей в молекуле РНК с образованием свободных кислых групп, которые обнаруживаются титрованием.

Исследуемый материал: разбавленная в 10 раз моча; кровь; 5-процентные водные гомогенаты тканей в количестве 0,5 мл.

Оборудование: холодильник, бюретка, пипетки на 1, 5, 10 мл, колбы конические на 50 мл.

Реактивы: дрожжевой раствор РНК (1-процентный) в ацетате натрия (0,1 М), NaOH (0,02 н.), фенолфталеин (0,5-процентный спиртовой раствор).

Ход работы. В две конические колбы вносят по 10 мл 1-процентного раствора дрожжевой РНК в 0,1 М растворе ацетата натрия. В одну колбу добавляют 0,2 мл 0,1-процентного раствора РНКазы, в другую – 0,2 мл воды. Содержимое колб перемешивают и смесь оставляют при 5°C на 1 ч. По истечении указанного времени из содержимого каждой колбы отбирают по 0,5 мл, добавляют по 2 капли фенолфталеина и титруют 0,02 н раствором гид-

гидроксида натрия до появления розового окрашивания. Оставшуюся смесь держат

в колбах еще 1 ч при 5 °С. Затем из опытных и контрольных проб берут по 5 мл и оттитровывают их. Об активности РНКазы судят по разнице между количеством фосфатных групп в опытной и в контрольной пробах.

Если вместо раствора РНКазы используются слюна, кровь, моча или водные гомогенаты тканей, то вместо воды в контрольную пробу добавляют тот же объем биологической жидкости, что и в опыте, перемешивают, немедленно фильтруют или центрифугируют и сразу же титруют 0,02 н раствором гидроксида натрия. Опытную пробу инкубируют в течение 1–2 ч и обрабатывают затем подобным образом.

Контрольные вопросы

1. Каковы биологические функции нуклеотидов и полинуклеотидов?
2. Каково строение нуклеотидов и полинуклеотидов?
3. В чем состоит биосинтез пуриновых и пиримидиновых оснований?
4. В чем состоит катаболизм пуриновых и пиримидиновых оснований?
5. В чем заключается нарушение обмена пуриновых и пиримидиновых оснований?

РАЗДЕЛ 6. ОБМЕН БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ

Работа 59. Количественное определение белка

Для количественного определения белков используют физические, химические и биологические методы.

Из физических методов простейшим является взвешивание чистого белка. Однако белки очень гигроскопичны, и полностью удалить из их состава воду очень трудно, поэтому этот способ применяют редко.

Из физических методов количественного определения белков наибольшее распространение получили такие: рефрактометрический (по показателю преломления белковых растворов); спектрофотометрический (по поглощению в ультрафиолетовой области спектра); полярографический (по кривым, показывающим зависимость между силой тока и напряжением, приложенным к системе, содержащей белок); пикнографический метод (по плотности белковых растворов).

Химические методы количественного определения белков разнообразны. Наиболее простой из них – количественное определение общего или белкового (после осаждения белка и отделения его от растворимых азотсодержащих веществ) азота.

Самым распространенным методом количественного определения белков является колориметрический метод. Он основан на измерении интенсивности цветных реакций, развивающихся при взаимодействии белков с тем или иным специфическим реагентом. Чтобы рассчитать концентрацию белка, строят калибровочный график.

Биологические методы количественного определения белков применимы лишь к белкам, обладающим ферментативной и гормональной активностью. Измеряя степень биологической активности препарата, можно составить представление о содержании в нем белка, обладающего данной активностью. Этот метод не дает абсолютных результатов.

Биуретовый метод

Биуретовый метод основан на способности растворов белка давать фиолетовое окрашивание при взаимодействии с раствором сульфата меди в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в растворе.

Исследуемый раствор: стандартный раствор белка, содержащий 10 мг в 1 мл.

Реактивы: биуретовый реактив – 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (виннокислый натрий-калий, или сегнетова соль) – растворяют в 50 мл H_2O , при энергичном перемешивании приливают 30 мл 10-процентного раствора NaOH , свободного от Na_2CO_3 ; добавляют 0,1 г KI и доводят водой до 100 мл. Хранят в полиэтиленовой склянке.

Оборудование: пробирки, пипетки, ФЭК, кюветы с длиной светового пути 5 мм.

Ход работы. В 4 сухие пробирки вносят по 0,5 мл раствора белка. В три пробирки помещают стандартные растворы с содержанием белка 2,5; 5,0; 7,5 мг в 1 мл. Эти пробирки служат для построения калибровочной кривой. В 4-ю пробирку наливают раствор белка с неизвестной концентрацией, которую необходимо определить.

В каждую пробирку добавляют по 2 мл биуретового реактива. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 20 мин (для развития окраски). Окрашенные растворы колориметрируют на ФЭКе в кюветах с длиной оптического пути 5 мм, пользуясь зеленым светофильтром (длина волны 540 нм). В качестве контрольного раствора при измерении на ФЭКе используют биуретовый реактив.

Строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс значения концентрации стандартных растворов белка, а на оси ординат – соответствующие значения оптической плотности. Зная оптическую плотность раствора белка с неизвестной концентрацией, по калибровочной кривой определяют содержание белка в нем.

Микробиуретовый метод

Исследуемый материал: стандартный раствор белка, содержащий 1 мг в 1 мл.

Реактивы: биуретовый реактив для микроопределения (реактив Бенедикта) – 17,3 г цитрата натрия и 10 г Na_2CO_3 – растворяют при подогревании в небольшом количестве воды, в раствор добавляют 1,73 г сульфата меди, растворенного в 10 мл воды, и доводят водой до 100 мл; 6-процентный раствор NaOH .

Оборудование: пробирки, пипетки, спектрофотометр, кюветы

Ход работы. К 2 мл раствора, содержащего 0,1–2,0 мг белка, добавляют 2 мл 6-процентного раствора NaOH и 0,2 мл раствора Бенедикта. Раствор хорошо перемешивают и через 15 мин фотометрируют при 530 нм на спектрофотометре. Предварительно по стандартному раствору белка строят график.

Метод Брэдфорда

Метод основан на связывании с белками одного из кислых красителей кумасси синего. При связывании с белками спектр поглощения красителя меняется. Интенсивность окраски зависит от концентрации белка в пробе в диапазоне 1–10 мкг/мл. Зависимость линейна. Поскольку белки различаются по своей способности связывать красители, желательно строить калибровочный график с использованием того белка, концентрацию которого в дальнейшем предполагают определить.

Исследуемый материал: стандартный раствор белка, содержащий 0,05 мг/мл.

Реактивы: раствор красителя – 10 мг кумасси G-250 – гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе в 5 мл 95-процентного спирта, полученный раствор смешивают с 10 мл 95-процентной фосфорной кислоты, разводят до конечного объема (100 мл). Отфильтрованный раствор красителя хранится около 2-х недель.

Оборудование: пробирки, пипетки, спектрофотометр, кюветы.

Ход работы. 1,5 мл раствора, содержащего от 10 до 50 мкг белка, смешивают с 1,5 мл раствора красителя. Через 3-5 мин измеряют оптическую плотность при 595 нм, в качестве контроля используя пробу, не содержащую белок. В описанной модификации A_{595} линейно зависит от количества белка в интервале от 10 до 50 мкг.

Спектрофотометрический метод

Метод основан на способности ароматических аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин) поглощать ультрафиолетовый свет с максимумом при 280 нм. Измеряя величину оптической плотности при этой длине волны, находят количество белка в растворе. Поскольку белки отличаются по содержанию ароматических аминокислот, их поглощение в ультрафиолетовой области спектра может сильно различаться. Условно считают, что при концентрации «усредненного» белка в растворе, равной 1 мг/мл, величина оптической плотности при 280 нм равна 1,0 (при толщине кюветы 1,0 см).

Определению белка данным методом мешает присутствие нуклеиновых кислот и нуклеотидов, поэтому измеряют оптическую плотность раствора при 260 нм (для учета поглощения соединений нуклеотидной природы) и 280 нм.

Исследуемый материал: стандартный раствор белка, содержащий 1–5 мг/мл.

Оборудование: пробирки, пипетки, спектрофотометр, кюветы.

Содержание белка находят по формуле Калькара на основе данных определения оптической плотности при 280 и 260 нм:

$$\text{Содержание белка} = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260} \text{ (мг/мл)}$$

Определить содержание белка в сыворотке крови разными методами. Полученные результаты сравнить.

Клинико-диагностическое значение. Увеличение белка в крови (гиперпротеинемия) наблюдается сравнительно редко. Относительная гиперпротеинемия наблюдается при сгущении крови из-за значительных потерь жидкости. Гипопротеинемия наблюдается при недостаточном поступлении белка с пищей, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, понижении биосинтеза белка при хронических паренхиматозных гепатитах, интоксикациях, злокачественных новообразованиях. Гипопротеинемия может наблюдаться при по-

терях белка организмом при острых и хронических кровопотерях, увеличенной проницаемости капилляров, кровопусканиях.

Работа 60. Определение концентрации мочевины в сыворотке крови и моче

С мочой у взрослого человека выделяется за сутки 20–35 г, или 333–583 ммоль мочевины. Мочевина – диамид угольной кислоты, образующийся в печени при обезвреживании аммиака. В норме в сыворотке крови содержится 3,33–8,32 ммоль/л мочевины.

Принцип метода. В кислой среде мочевина образует с диацетилмоноксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа окрашенные соединения. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации мочевины в исследуемой моче и сыворотке крови и определяется фотометрически.

Исследуемый материал: сыворотка крови, моча.

Реактивы: стандартный раствор мочевины (16,7 ммоль/л). 5-процентный раствор хлорного железа (основной раствор: 5 г хлорного железа) доводят водой до 100 мл, после чего подкисляют 1 мл концентрированной H_2SO_4 . Рабочий раствор готовят из основного: 1 мл основного раствора доводят до 100 мл дистиллированной водой, добавляют 8 мл концентрированной H_2SO_4 и 1 мл 85-процентной ортофосфорной кислоты; раствор хранят в темной посуде. 2,5-процентный водный раствор диацетилмооксима, 0,25-процентный раствор тиосемикарбазида (хранят в темной посуде). Цветной реактив хлорида (готовят каждый раз перед употреблением): к 30 мл рабочего раствора хлорного железа добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5-процентного диацетилмооксима и 0,25 мл 0,25-процентного тиосемикарбазида.

Оборудование: пипетки, пробирки, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 5 мм.

Ход работы. Перед определением концентрации мочевины мочу развести в 10 раз. В одну пробирку внести 0,1 мл мочи, в другую – 0,1 мл сыворотки крови, в третью – стандартный раствор мочевины. Затем во все 3 пробирки добавить по 2 мл рабочего раствора, перемешать и поставить на кипящую водяную баню на 10 минут. Пробирки охладить в струе холодной воды и проколориметрировать на зеленом светофильтре в кювете с длиной оптического пути 5 мм против воды.

Расчет произвести по формуле

$$167E_{оп}/E_{ст} \text{ (для мочи).}$$

Клинико-диагностическое значение. Пониженное содержание мочевины в моче отмечается при нефрите, ацидозе, паренхиматозной желтухе, циррозе печени, уремии, повышенное – при недостатке белка в питании, злока-

чественной анемии, лихорадке, интенсивном распаде белков в организме, после приемов салицилатов, при отравлении фосфором.

Снижение содержания мочевины в сыворотке крови отмечается при паренхиматозном гепатите, циррозе (резкое снижение мочевинообразовательной функции печени), во время беременности, при эклампсии. Содержание мочевины в сыворотке может повышаться при нефритах, лихорадочных состояниях, сепсисе, туберкулезе почек.

Работа 61. Определение активности аргиназы печени

Фермент аргиназа (L-аргининуреогидролаза) катализирует реакцию расщепления аргинина с образованием орнитина и мочевины.

В печени человека и животных этой реакцией завершается синтез мочевины – главного конечного продукта обмена азота в организме.

Аргиназной активностью обладают и некоторые другие органы животных, а также ткани высших растений и некоторые бактерии. Это свидетельствует о том, что аргиназа является филогенетически древним ферментом. Роль аргиназы в других тканях и органах недостаточно изучена.

Определение активности аргиназы используется для диагностики некоторых заболеваний, например, печени. При усилении распада белков в тканях (голодание, аллоксановый диабет, авитаминоз В₁, введение кортикостероидов, тироксина и др.) повышается активность аргиназы в печени. Обнаружено также тяжелое наследственное заболевание, обусловленное недостаточностью этого фермента.

Удобным объектом для определения активности аргиназы служит гомогенат печени животных.

Активность аргиназы можно установить двумя способами:

- 1) определить количество продуктов реакции – мочевины или орнитина, образовавшихся за определенное время;
- 2) определить количество аргинина, не расщепившегося после прекращения действия фермента.

В данной работе об активности аргиназы судят по образованию продукта реакции – мочевины. Ее концентрацию определяют колориметрическим методом. В основе метода лежит способность мочевины давать с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа в кислой среде комплексное соединение, окрашенное в красный цвет. Интенсивность окраски измеряется на ФЭКе.

Исследуемый материал: печень крысы.

Реактивы: 0,9-процентный раствор NaCl, 0,007 М раствор аргинина (рН 9,5), 5-процентный раствор ТХУ, фосфатный буфер (рН 9,5), реактивы для определения концентрации мочевины (см. работу 60).

Оборудование: пипетки, пробирки, термостат, ножницы, баня со льдом и водяная баня, ступка, пестик, воронка, фильтры, центрифуга, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 5 мм, весы, разновесы.

Ход работы. *Приготовление гомогената печени.* Печень только что убитой крысы извлекают и промывают холодным 0,9-процентным раствором хлорида натрия. Навеску печени (1 г) измельчают ножницами на льду и гомогенизируют в 2 мл фосфатного буфера. Гомогенат разводят тем же буфером в соотношении 1:10 к навеске печени (например, если навеска – 1 г, то объем гомогената должен быть 10 мл). Разведенный гомогенат фильтруют через 2 слоя марли.

Инкубация фермента с субстратом. В двух пробирках, опытной и контрольной, готовят инкубационные смеси, как указано в табл. 22, соблюдая последовательность добавления реактивов.

Таблица 22

Проба	Буфер, мл	Раствор аргинина, мл	ТХУ, мл	Гомогенат
Опытная	1,4	0,2	–	0,4
Контрольная	1,4	0,2	2	0,4

Пробы тщательно перемешивают и инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 15 минут.

После окончания инкубации в опытную пробу для прекращения действия фермента добавляют 2 мл 5-процентной ТХУ и тщательно перемешивают. Обе пробы центрифугируют и в полученном фильтрате определяют концентрацию мочевины методом, описанным в предыдущей работе, а также содержание белка биуретовым методом.

Рассчитывают удельную активность фермента. Для этого нужно знать содержание ткани и концентрацию белка в пробе:

$$\text{Удельная активность фермента} = x / t \cdot m \text{ мкмоль} / (\text{мин} \cdot \text{мг}),$$

где x – содержание мочевины (мкмоль/мл); t – время инкубации пробы (мин); m – содержание белка в пробе (мг).

Работа 62. Количественное определение креатинина в моче и сыворотке крови

Креатинин является одним из конечных продуктов азотистого обмена и нормальной составной частью мочи. За сутки с мочой у мужчин выделяется 8,8–17,7 ммоль (1–2 г/сут) креатинина, а у женщин – 1,7–15,9 ммоль (0,8–1,8 г/сут). Креатинин – ангидрид креатина. Креатин содержится в мышцах (около 80 %), особенно в сердечной, где из него при участии АТФ образуется макроэргическое соединение креатинфосфат, при распаде которого образуются креатинин и фосфат. В моче взрослого здорового человека креатинин

отсутствует; его появление в моче называют креатинурией. Однако у детей и подростков моча всегда содержит креатин.

Принцип метода. Креатинин при взаимодействии с пикриновой кислотой в щелочной среде образует окрашенные соединения, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации креатинина в моче и сыворотке крови.

Исследуемый материал: моча, сыворотка крови.

Реактивы: стандартный раствор креатинина (177 мкмоль/л); 2-процентный раствор пикриновой кислоты, 10-процентный раствор NaOH, 5-процентный раствор ТХУ, дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки, пипетки, ФЭК, кюветы.

Ход работы. В трех пробирках смешивают реактивы по схеме, указанной в табл. 23.

Таблица 23

Реактивы (мл)	Опытная проба	Стандарт	Контроль
Сыворотка	0,5	–	–
Дистиллированная вода	1	1	1,5
ТХУ	0,5	0,5	0,5
Стандартный раствор	–	0,5	–

Через 5 мин опытную и стандартную пробы центрифугируют при скорости 3000 об/мин в течение 5 мин. С надосадочной жидкостью готовят следующие пробы, см. табл. 24:

Таблица 24

Реактивы (мл)	Опытная проба	Стандарт	Контроль
Надосадочная жидкость	1,0	1,0	1,0
Пикриновая кислота	0,5	0,5	0,5
NaOH	0,5	0,5	0,5

Содержимое перемешивают и через 20 мин колориметрируют опытную и стандартную пробы при зеленом светофильтре (540 нм) в кювете толщиной 0,5 см против контроля. Расчет проводят по формуле

$$C \text{ (мкмоль/л)} = 177 \cdot A_{\text{оп}} / A_{\text{ст.}}$$

Перед определением содержания креатинина мочу разводят в 100 раз. Это разведение учитывают при расчетах. В опытной пробе смешивают 0,5 мл мочи, 0,25 мл дистиллированной воды, 0,25 мл ТХУ, 0,5 мл пикриновой кислоты, 0,5 мл NaOH. Через 20 мин смесь колориметрируют на зеленом светофильтре (длина волны 540 нм) в кювете толщиной 0,5 см против контроля, приготовленного в предыдущей работе. Рассчитывают концентрацию креатинина в моче с учетом ее разведения. Формула такова:

$$C \text{ (мкмоль/л)} = 50 \cdot 177 \cdot A_{\text{оп}} / A_{\text{ст}}$$

Содержание креатинина в суточной моче рассчитывают по формуле

$$C \cdot 1,5 / 1000 = \text{ммоль/сут,}$$

где C – концентрация креатинина в моче в мкмоль/л; 1,5 – суточный диурез в л; 1000 – коэффициент перевода мкмоль в ммоль.

Норма содержания креатинина в сыворотке крови – 53-106 мкмоль/л, в суточной моче – 4,4-17,6 ммоль/сут.

Клиренс креатинина (его очищение) рассчитывают по формуле

$$1,07 \text{ C} / C,$$

где 1,07 – минутный диурез. В норме клиренс по креатинину составляет 80 – 120 мл/мин.

Клинико-диагностическое значение. Определение содержания креатинина проводят для исследования функции почек. Его содержание в сыворотке крови увеличивается при значительном ухудшении функции почек. Креатинемия наблюдается также при закупорке мочевых путей, кишечной непроходимости, тяжелом диабете, механической желтухе, гипофункции надпочечников, голодании. Увеличение креатинина в моче наблюдается при усиленной мышечной работе, лихорадочных состояниях, пневмонии, выраженной недостаточной функцией печени. Понижение креатинина в моче – при мышечной дистрофии, голодании, дегенерации почек, лейкемии. Расчет клиренса креатинина позволяет получить информацию об интенсивности основных функций фильтрации, реабсорбции, секреции и почечном кровообращении.

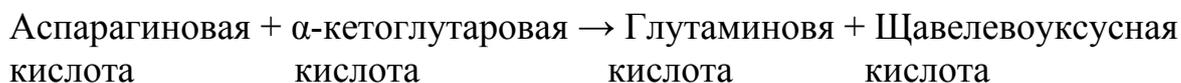
Работа 63. Определение активности аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы

Аминотрансферазы, или трансминазы, – ферменты, содержащие в качестве коферментов фосфопиридоксаль и фосфопиридоксамин, – катализируют обратимый перенос аминогрупп с аминокислот на α -кетокислоты. Определение концентрации α -кетокислот, образовавшихся в процессе трансминирования аминокислот, лежит в основе методов определения трансминазной активности. Существует 2 группы методов определения активности трансминаз в сыворотке крови: спектрофотометрические и колориметрические. В основе спектрофотометрических методов лежит использование оптического теста Варбурга; эти методы наиболее специфичные и точные. Колориметрические методы основаны на образовании окрашенного динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты, освобождающейся в результате реакции переаминирования.

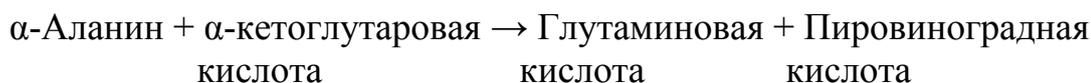
Наибольшее значение имеет определение активности аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ), поскольку эти

ферменты обладают большой каталитической активностью. Эти ферменты находятся в различных тканях и органах: печени, миокарде, почках, скелетной мускулатуре и др. Содержание данных ферментов в тканях неодинаково (в печени намного выше, чем в миокарде).

АсАТ катализирует реакцию



АлАТ катализирует реакцию



В результате переаминирования под действием АсАТ аспарагиновая кислота превращается в щавелевоуксусную, а аланин под действием АлАТ – в пировиноградную кислоту. Щавелевоуксусная кислота способна в процессе ферментативной реакции превращаться в пировиноградную кислоту. При добавлении кислого 2,4-динитрофенилгидразина ферментативный процесс останавливается и образуется динитрофенилгидразон пировиноградной кислоты.

Гидразон пировиноградной кислоты в щелочной среде дает коричнево-красное окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты, а по количеству образовавшейся пировиноградной кислоты можно судить об активности фермента.

Активность аминотрансфераз выражают в микромолях пировиноградной кислоты, образовавшейся в 1 мл сыворотки крови за 1 ч инкубации при 37 °С. В норме активность аминотрансфераз в сыворотке крови человека невелика и составляет для АсАТ от 0,1 до 0,45 мкмоль/ч·мл, а для АлАТ – 0,1–0,68 мкмоль/ч·мл пировиноградной кислоты за 1 ч инкубации.

Исследуемый материал: сыворотка крови, печень, почки, миокард, скелетная мускулатура крысы.

Реактивы: 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,4), субстратная смесь для определения АсАТ, субстратная смесь для определения АлАТ, динитрофенилгидразин, стандартный раствор пировиноградной кислоты.

Оборудование: весы, термостат, фарфоровая чашка, пестик, пробирки, пипетки, ФЭК, кюветы с длиной светового пути 5 мм.

Ход работы. *Получение сыворотки крови.* Свежую негепаринизированную кровь центрифугируют в течение 10 мин при скорости 3000 об/мин. Сыворотку осторожно отсасывают пипеткой и помещают в чистую сухую пробирку.

Приготовление гомогената. Взвешивают 500 мг ткани, тщательно гомогенизируют ее в 2 мл фосфатного буфера, после этого добавляют еще 3 мл и отфильтровывают через 2 слоя марли. Фильтрат используют для определения активности АлАТ и АсАТ.

Определение активности аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2.). Готовят инкубационные пробы согласно табл. 25.

Таблица 25

Реагенты (мл)	Опытная проба	Контрольная проба
Субстратная смесь для определения активности АлАТ	0,25	0,25
Дистиллированная вода	–	0,05
Пробы перемешать и выдержать в термостате при 37 °С в течение 1–2 мин		
Сыворотка крови	0,05	–
Пробы перемешать и выдержать при температуре 37 °С в течение 60 мин		
Динитрофенилгидразин	0,25	0,25
Пробы перемешать и выдержать при комнатной температуре в течение 20 мин		
0,4 М раствор NaOH	2,5	2,50

Пробы немедленно перемешать. Выдержать при комнатной температуре в течение 10 мин и измерить оптическую плотность опытной пробы относительно контрольной пробы при длине волны 505 нм (490–520 нм, зеленый светофильтр).

Активность аланинаминотрансферазы рассчитывают по калибровочному графику. Для его построения приготовить пробы согласно табл. 26.

Таблица 26

Реагент	№ пробы				
	1.	2.	3.	4.	5.
Дистиллированная вода (мл)	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40
Стандартный раствор пирувовой кислоты (мл)	–	0,05	0,10	0,15	0,20
Динитрофенилгидразин (мл)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Все пробы перемешать и выдержать при комнатной температуре в течение 20 мин					
0,4 М раствор NaOH (мл)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Пробы перемешать, выдержать при комнатной температуре в течение 10 мин и измерить оптическую плотность опытной пробы относительно контрольной					
Содержание пирувата, нмоль	–	50	100	150	200
Активность фермента, мкмоль/(ч·л)	–	1	2	3	4
Активность фермента, нмоль/(с·л)	–	278	556	834	1112

По результатам фотометрирования калибровочных проб построить график зависимости оптической плотности от активности фермента. По оси ординат отложить значение оптической плотности, а по оси абсцисс – активность фермента (см. [табл. 26](#)). Калибровочный график должен иметь вид прямой, выходящей из начала координат. При активности АлАТ, равной 2–3 мкмоль/(ч · л), сыворотку развести в 3 раза, равной 2,5–3 мкмоль/(ч · л) – в 5 раз, равной 3,0–3,5 мкмоль/(ч · л) – в 10 раз, равной 3,5–4,0 – в 25 раз. Провести повторное определение и учесть коэффициент разведения при расчете.

Определение активности аспаратаминотрансферазы (КФ 26.1.1.).
Готовят инкубационные пробы согласно табл. 27.

Пробы немедленно перемешать. Выдержать при комнатной температуре в течение 10 мин и измерить оптическую плотность опытной пробы относительно контрольной пробы при длине волны 505 нм (490–520 нм, зеленый светофильтр).

Активность АсАТ рассчитывают по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика пробы готовят согласно [табл. 26](#).

Таблица 27

Реагенты (мл)	Опытная проба	Контрольная проба
Субстратная смесь для определения активности АсАТ	0,25	0,25
Дистиллированная вода	–	0,05
Пробы перемешать и выдержать в термостате при 37 °С в течение 1–2 мин		
Сыворотка крови	0,05	–
Пробы перемешать и выдержать при температуре 37 °С в течение 60 мин		
Динитрофенилгидразин	0,25	0,25
Пробы перемешать и выдержать при комнатной температуре в течение 20 мин		
0,4 М раствор NaOH	2,5	2,50

Клинико-диагностическое значение. Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови имеет исключительно важное значение для диагностики болезней печени. В начальные периоды инфаркта через 4–6 ч наблюдается повышение активности АсАТ, через 24–36 ч оно четко выражено, и лишь на 3–7-й день активность фермента снижается до нормы, изменение же АлАТ при этом небольшое.

Активность обеих трансфераз, особенно АлАТ, увеличивается при инфекционном гепатите. Особенно важное значение для диагностики имеет увеличение активности АлАТ при безжелтушных формах гепатита и в инкубационный период. С увеличением сроков заболевания активность аминотрансферазы постепенно снижается. У детей наблюдается более ранняя

нормализация. В случае затяжного течения заболевания проявляется длительная гиперферментемия, при рецидивах и обострениях активность аминотрансфераз вновь повышается. При токсическом гепатите и обострении хронического гепатита часто наблюдаются высокие показатели ферментативной активности. Цирроз печени даже в активной фазе не сопровождается значительной гиперферментемией.

Работа 64. Переаминирование аминокислот

Переаминирование (трансаминирование) – перенос аминогруппы от аминокислоты на кетокислоту с образованием новой аминокислоты и новой кетокислоты. О трансаминировании можно судить по убыли субстратов реакции либо по нарастанию конечных продуктов реакции. Для разделения и последующего количественного определения глутаминовой кислоты и α -аланина можно использовать метод хроматографии. Для предотвращения перехода пирувата в лактат реакцию переаминирования следует проводить в присутствии монойодуксусной кислоты.

Исследуемый материал: печень крысы.

Реактивы: эфир, 0,1-процентный раствор KHCO_3 , 0,08 М раствор CH_3COOH , глутаминовая кислота, пируват, монойодуксусная кислота, дистиллированная вода, аланин, бутанол, ледяная уксусная кислота, 1-процентный раствор нингидрина в ацетоне.

Оборудование: ножницы, эксикатор, ледяная баня, хроматографическая камера, пробирки, пипетки, термостат, хроматографическая бумага, фильтры, фарфоровая чашка, пестик, марля, водяная баня, пробки, плита.

Ход работы. Печень крысы размельчают на холоде в фарфоровой ступке с пятикратным объемом 0,1-процентного раствора KHCO_3 . Полученный гомогенат фильтруют через 2 слоя марли.

Готовят 5 проб с реакционной средой, состав которых указан в табл. 28.

Таблица 28

№	Глутаминовая кислота, мл	Пируват, мл	Монойодуксусная кислота, мл	KHCO_3 , мл	H_2O , мл	Гомогенат, мл	Аланин, мл
1.	1	1	0,5	–	–	1	–
2.	1	1	0,5	–	–	1	–
3.	–	1	0,5	1	–	1	–
4.	1	–	–	–	4	–	–
5.	–	–	–	–	4	–	1

Последние две пробы являются свидетелями для идентификации хроматографических пятен.

Пробу № 1 после добавления гомогената нагревают до кипения в течение 10 мин на кипящей водяной бане, а затем добавляют 1,5 мл 0,08 М раствора CH_3COOH для полного осаждения тканевых белков, перемешивают и после охлаждения пропускают через бумажный фильтр. Эта проба необходима для определения исходной концентрации субстратов реакции.

Пробы №№ 2 и 3 после перемешивания закрывают пробками и подвергают инкубации в термостате при 37 °С. Инкубацию проводят в течение 60 мин при периодическом встряхивании. По окончании инкубации пробы №№ 2 и 3 обрабатывают так же, как и пробу № 1.

Пробы №№ 4, 5 сразу после приготовления наносят на хроматографическую бумагу и отмечают как свидетелей карандашом.

Метод бумажной хроматографии. Метод хроматографии на бумаге относится к распределительной хроматографии и основан на различной растворимости разделяемых веществ в двух малосмешивающихся жидкостях, одна из которых удерживается бумагой, а другая является подвижной. При бумажной хроматографии в качестве носителя применяется целлюлоза в виде особой фильтровальной бумаги. Скорость движения аминокислот определяется характерной для данного вещества в данной системе растворителей величиной коэффициента распределения.

$$a = \frac{\text{Концентрация в водной фазе}}{\text{Концентрация в подвижной фазе}}$$

Следовательно, относительное расположение анализируемых веществ на хроматограмме для данной системы растворителей постоянно и характеризуется величиной коэффициента скорости движения:

$$R_f = \frac{\text{Расстояние от анализируемого вещества до старта}}{\text{Расстояние от фронта растворителя до старта}}$$

Величина R_f для данной подвижной системы является постоянной, однако она зависит от качества бумаги, постоянства температуры, степени чистоты, растворителей, однотипности процедур и аппаратуры.

Приготовление растворителя. В мерном цилиндре смешивают 40 мл бутанола, 10 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл дистиллированной воды. Смесь встряхивают в течение 1–2 минут.

Проведение хроматографии. Берут лист хроматографической бумаги и на расстоянии 3 см от его короткого края проводят простым карандашом горизонтальную линию, которую делят на 5 отрезков. Каждое пересечение нумеруют. На линию старта наносят приготовленные пробы. Нанесение проводят в несколько приемов, следя за тем, чтобы пятно раствора при каждом

прикосновении пипетки к бумаге не растекалось более чем на 3 мм. Каждую следующую порцию раствора наносят из пипетки после полного высыхания предыдущей, которое определяют по исчезновению просвечивания бумаги в точке нанесения. В точки наносят по 50 мкл – порциями по 5 мкл полученной пробы.

Хроматограмму устанавливают в хроматографическую камеру, на дно которой наливают 50 мл разделительной смеси. Хроматографическую камеру хорошо закрывают, чтобы исключить возможность испарения компонентов подвижной фазы. Разделение ведут до тех пор, пока линия фронта растворителя не приблизится к краю бумаги (не доходя до края 2–3 см). После этого хроматограмму вынимают из камеры и, держа пинцетом, высушивают над плитой для удаления растворителя из бумаги.

Высушенную хроматограмму протягивают через 1-процентный раствор нингидрина в ацетоне для обнаружения на ней пятен аминокислот. Затем хроматограмму высушивают для удаления ацетона. Аминокислоты стандартной и опытной проб обнаруживаются в виде сине-фиолетовых пятен.

Идентификация аминокислот. Идентификацию аминокислот, содержащихся в экстракте, ведут по совпадению на хроматограмме позиций, занимаемых аминокислотами стандартной и опытной проб, и величинам коэффициента движения R_f .

Величина R_f для аланина равна 0,28, для глутаминовой кислоты – 0,17.

Работа 65. Оценка биосинтетической функции ткани по соотношению РНК и ДНК к белку

Исследуемый материал: ткани крысы.

Реактивы: 0,3 М, 0,5 М, 0,6 М растворы HClO_4 ; 0,6 М раствор KOH , биуретовый реактив (см. работу 59).

Оборудование: пробирки, пипетки, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 5 мм, спектрофотометр, кипящая водяная и ледяная бани, центрифуга, фильтровальная бумага, стеклянная палочка, пробки для пробирок с обратным холодильником.

Ход работы. Определение проводят строго на холоде в центрифужных пробирках, ставя 4–5 параллельных проб.

К 0,1 мл гомогената добавляют 1,9 мл 0,3 М раствора HClO_4 . Для полноты осаждения кислотонерастворимой фракции пробирки на 15 мин помещают в лед. Затем центрифугируют при 3000 г в течение 10–15 мин. Осадки дважды отмывают 0,2 М раствором HClO_4 . После последнего центрифугирования стенки пробирки тщательно подсушивают фильтровальной бумагой, чтобы избежать загрязнения фракции кислотонерастворимым материалом, имеющимся в надосадочной жидкости.

Осадки суспендируют, предварительно растерев стеклянной палочкой в 0,5 мл воды; затем добавляют при комнатной температуре 0,5 мл 0,6 М раствора KOH . Суспензия при этом светлеет. Если осадок суспендировать непо-

средственно в 0,3 М растворе КОН, быстро образуется желатиноподобный осадок, который не растворяется даже после гидролиза в течение 1 ч при 37 °С. Через 1 ч инкубации при 37 °С пробирки переносят на лед для остановки гидролиза.

В каждую пробирку добавляют по 2 мл 0,6 М раствора HClO₄ и оставляют на 15 мин на льду. Центрифугируют 10 мин при 3000 g. Надосадочную жидкость параллельных проб объединяют для определения содержания РНК и измеряют поглощение в ультрафиолетовом свете при 270 нм и 290 нм. Стенки пробирок тщательно подсушивают, так как в осадке в дальнейшем определяют содержание ДНК.

$$\text{Количество РНК (мкг/мл надосадочной жидкости)} = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19} \cdot 10,5.$$

Подсушенные пробирки с осадками заливают 0,5 М раствором HClO₄ по 3 мл на пробу. Гидролиз проводят с каплеуловителем (во избежание изменения объема) на кипящей водяной бане в течение 20 минут. Для расчета используют формулу

$$\text{Количество ДНК (мкг/мл надосадочной жидкости)} = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19} \cdot 10,1.$$

Белок в ткани определяют биуретовым методом (см. работу 58). Соотношение РНК/белок и ДНК/белок оценивают в мкг/г ткани. Делают вывод о биосинтетической функции различных тканей.

Контрольные вопросы

1. Чем определяется пищевая ценность белков?
2. Какие методы используются для определения содержания белка, и в чем заключается их различие?
3. Почему связывание аммиака в мочеvine приводит к снижению его токсичности?
4. Какие существуют методы активности аминотрансфераз?
5. Какой кофермент необходим для процесса переаминирования?
6. Что такое коэффициент R_f и как он рассчитывается?
7. В чем заключается клинико-диагностическое значение определения креатинина в моче и плазме?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 1998. – 704 с.
2. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 1998. – 479 с.
3. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рём. – М. : Мир, 2000. – 469 с.
4. Биохимия человека : в 2 т. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Радзуэлл. – М. : Мир, 1993.
5. Николаев, А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. – М., 1998. – 496 с.
6. Ленинджер, А. Основы биохимии : в 3 т. / А. Ленинджер. – М. : Мир, 1983.
7. Страйер, Л. Биохимия : в 3 т. / Л. Страйер. – М. : Мир, 1984.
8. Филиппович, Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филиппович. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Агар, 1999. – 512 с.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

9. Белки и пептиды : в 2 т. Т. 1. – М. : Наука, 1995. – 448 с.
10. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Элиот, У. Элиот, К. Джонс. – М. : Мир, 1991. – 544 с.
11. Мецлер, Д. Биохимия : в 3 т. / Д. Мецлер. – М. : Мир, 1980.
12. Овчинников, Ю. В. Биоорганическая химия / Ю. В. Овчинников. – М. : Наука, 1987. – 815 с.
13. Проблема белка. Т. 1 : Химическое строение белка / Е. М. Попов, П. Д. Решетов, В. М. Липкин и др. – М. : Наука, 1995. – 496 с.
14. Попов, Е. М. Проблема белка. Т. 2 : Пространственное строение белка / Е. М. Попов, В. В. Демин, Е. Д. Шибанова. – М. : Наука, 1996. – 480 с.
15. Сингер М. Гены и геномы : в 2 т. / М. Сингер, П. Берг. – М. : Мир, 1998.
16. Степанов, В. М. Молекулярная биология. Структура и функции белков : учебник для биол. спец. вузов / В. М. Степанов ; под. ред. А. С. Спирина. – М. : Высш. шк., 1996. – 335 с.
17. Elliott, W. Biochemistry and Molecular Biology / W. Elliott, D. C. Elliott. Second edition. – Oxford : University Press, 2001. – 586 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Список сокращений

АКТГ	–	адренокортикотропный гормон
КФ	–	классификационный номер фермента
ТХУ	–	трихлоруксусная кислота
ADP	–	аденозиндифосфорная кислота
ATP	–	аденозинтрифосфорная кислота
3',5'-cAMP	–	циклическая аденозинмонофосфорная кислота
CoA	–	коэнзим А
NAD	–	никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)
NADH	–	никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)
NADP	–	никотинамидадениндинуклеотидфосфат (окисленная форма)
NADPH	–	никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма)
FAD	–	флавинадениндинуклеотид (окисленная форма)
FADH ₂	–	флавинадениндинуклеотид (восстановленная форма)

Таблица 1

Множители и приставки,
применяемые для обозначения кратных и дольных единиц

Множитель	Приставка	Обозначение (русское)
10^{-18}	атто	а
10^{-15}	фемто	ф
10^{-12}	пико	п
10^{-9}	нано	н
10^{-6}	микро	мк
10^{-3}	милли	м
10^{-2}	санتي	с
10^{-1}	деци	д
10^1	дека	да
10^2	гекто	г
10^3	кило	к
10^6	мега	М
10^9	гига	Г
10^{12}	тера	Т
10^{15}	пета	П
10^{18}	экса	Э

Некоторые показатели
нормы основных клинико-биохимических исследований

Показатель	Значение (единицы СИ)
Плазма (сыворотка крови)	
Адреналин	1,91–2,46 нмоль/л
Аланинаминотрансфераза	1,91–2,46 нмоль/л
Аскорбиновая кислота	34,1–90,9 мкмоль/л
Аспаратаминотрансфераза	0,17–0,68 мккат/л
Аммиак	11–35 мкмоль/л
Аполипопротеин А1	0,81–1,84 г/л
Аполипопротеин В	0,46–1,74 г/л
Белок общий	64–83 г/л
Билирубин	5–21 мкмоль/л
Гликопротеиды общие	1,2–1,6 г/л
Глюкоза	4,1–5,9 ммоль/л
Гемоглобин (в крови):	
мужчины	2,0–2,79 ммоль/л
женщины	1,86–2,48 ммоль/л
Желчные кислоты	0,73–5,63 мкмоль/л
Жирные кислоты свободные	0,28–0,89 ммоль/л
Инсулин свободный	< 17 мЕ/л
Калий в сыворотке	3,6–5,1 ммоль/л
Калий в эритроцитах	79,4–112,6 ммоль/л
Кальций ионизированный в сыворотке	1,15–1,27 ммоль/л
Креатинин	0,044–0,088 ммоль/л
рН крови	7,35–7,45
Лактадегидрогеназа	0,8–4,0 ммоль/(ч·л)
Липиды общие	4,00–8,00 г/л
Липопротеины	3,50–7,50 г/л
Магний в сыворотке	0,66–1,07 ммоль/л
Молочная кислота в венозной крови	0,56–1,67 ммоль/л
Молочная кислота в артериальной крови	0,33–0,78 ммоль/л
Мочевина	2,50–8,33 ммоль/л
Мочевая кислота	0,12–0,24 ммоль/л
Натрий в сыворотке	136–145 ммоль/л
Натрий в эритроцитах	12,5–21,7 ммоль/л
Пировиноградная кислота	45,6–114 мкмоль/л
Сиаловые кислоты	2,0–2,36 мкмоль/л

Окончание табл. 2

Показатель	Значение (единицы СИ)
Плазма (сыворотка крови)	
Триацилглицериды	0,45–1,82 ммоль/л
Фибриноген	2,0–4,0 г/л
Фосфатаза кислая	0,05–0,13 мкмоль/(ч·л)
Фосфатаза щелочная	0,5–1,3 мкмоль/(ч·л)
Фосфолипиды общие	2,52–2,91 ммоль/л
Хлор (хлорид-ионы)	96–108 ммоль/л
Холестерин	0,78– ,63 ммоль/л