

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
для обучающихся по организации и проведению лабораторных работ
по дисциплине «ОБЩАЯ БИОХИМИЯ»
для студентов специальности 30.05.01 Медицинская биохимия

Введение

«Общая биохимия» является одной из основных дисциплин в биологическом образовании и изучает химическое строение и функцию соединений, входящих в состав живых организмов, и те превращения, которым они подвергаются в процессе жизнедеятельности.

Все процессы, происходящие в живом организме, тесно взаимосвязаны и зависят не только от внутренних, но и от внешних условий. Поэтому их следует рассматривать в единении с окружающей средой.

Целью дисциплины является раскрытие биохимических и биофизических основ организации живого организма, выяснение взаимосвязи между структурой и функциями биомолекул, участвующих в реакциях клеточного метаболизма и передачи наследственной информации.

Задачей курса «Общая биохимия» является изучение основных химических превращений, лежащих в основе жизнедеятельности, с участием биокатализаторов (ферментов), осуществляющих быстро, специфично и организованно во времени и пространстве эти химические превращения.

Важнейшей задачей курса является ознакомление с логикой происходящих в живых клетках процессов, их регуляцией и ролью белков и нуклеиновых кислот в них.

Курс «Общая биохимия» призван дать понимание того, каков конкретный молекулярный механизм происходящих в организмах физиологических процессов и каким образом можно направить эти процессы в клетках микроорганизмов, растений и животных, чтобы они могли быть успешно использованы для нужд современной биотехнологии.

Наиболее сложную часть курса планируется изложить на лекциях. Для самостоятельного изучения планируется вынести некоторые разделы. В связи с этим программа курса разделена на две части: первая будет изложена на лекциях, вторая планируется для самостоятельного изучения. Самостоятельная работа студентов контролируется на лабораторных занятиях, при проверке контрольных и самостоятельных работ. Лабораторные занятия позволяют освоить методы качественного и количественного определения основных групп биологически важных соединений: аминокислот, белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, методы работы с ферментами.

Курс «Общая биохимия» призван формировать на лабораторных занятиях студентам интерес к биохимии, умение работать в коллективе и лаборатории, чувство ответственности и долга.

Семестр 5

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ. ПОРЯДОК РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ. ОБОРУДОВАНИЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с посудой, приборами, методами подготовки проб для работы в биохимической лаборатории и методами расчета экспериментальных данных.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ

Работа в химической лаборатории связана с некоторой опасностью, поскольку многие вещества в той или иной степени ядовиты, огнеопасны и взрывоопасны.

Правила работы с огнеопасными веществами

1. Опыты с легковоспламеняющимися веществами (эфир, петролейный эфир, ацетон, бензол и т.д.) необходимо проводить дальше от огня и включенных электроплиток. Нагревать легковоспламеняющиеся жидкости можно только на предварительно нагретой водяной бане, в колбе, снабженной водяным холодильником, вдали от нагревательных приборов.

2. Легковоспламеняющиеся вещества можно отгонять в приборе с водяным холодильником на водяной бане или роторных испарителях. Нельзя упаривать горючие жидкости в открытых сосудах.

3. Приборы, в которых содержатся легковоспламеняющиеся вещества, следует разбирать после того, как будут выключены газовые горелки, находящиеся поблизости.

4. Не выливать воспламеняющиеся вещества в канализацию, ведра и ящики для мусора во избежание пожара от случайно брошенной спички.

5. Нельзя проводить перегонку досуха, так как многие вещества образуют взрывоопасные перекиси при соприкосновении с воздухом.

Первая помощь при ожогах и отравлениях

1. При термических ожогах немедленно делают обильные примочки спиртовым раствором танина, этиловым спиртом или раствором перманганата калия.

2. При ожогах кислотами необходимо сразу же промыть пораженное место большим количеством воды, а затем 3%-ным раствором гидрокарбоната натрия и опять водой.

3. При ожогах едкими щелочами следует хорошо и обильно промыть пораженное место проточной водой, затем разбавленным раствором уксусной кислоты, а после этого опять большим количеством воды.

4. При попадании кислоты или щелочи в глаза следует сразу же их промыть. Для этого направляют небольшую струю воды то в один, то в другой глаз в течение 3-5 мин. Затем глаза необходимо промыть или раствором гидрокарбоната натрия (в случае кислоты), или раствором борной кислоты (в случае щелочи). После этого нужно немедленно обратиться к врачу.

5. При ожогах фенолом пораженное место обрабатывают спиртом.

6. При ожогах кожи бромом его быстро смывают спиртом. Пораженное место смазывают мазью для ожогов. При вдыхании паров брома нужно глубоко подышать над спиртом, а затем выпить молока и выйти на свежий воздух.

Тушение местного пожара и горячей одежды

1. При возникновении пожара немедленно отключить газ и электроприборы по всей лаборатории. Быстро убрать все горючие вещества подальше от огня, а пламя быстро гасить огнетушителем, песком или при помощи противопожарного одеяла.

2. Если на ком-либо загорелась одежда, нужно пострадавшего повалить на пол и быстро покрыть войлочным одеялом.

ПОРЯДОК РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

1. Работать в лаборатории разрешается только после основательной предварительной подготовки. Студент должен просмотреть по руководству к практическим занятиям описание опытов, которые он будет выполнять в практикуме, ознакомиться по учебникам со свойствами изучаемых веществ, с теоретическим материалом, относящимся к данной теме, написать уравнения реакций, проработать примеры необходимых расчетов, отметить опыты, выполнение

которых требует от экспериментатора особого внимания и осторожности.

2. Прежде чем приступить к выполнению эксперимента, студент должен тщательно продумать его в целом, составить краткий план последовательно проводимых операций. Все приборы, в которых проводится тот или иной опыт, должны быть собраны компактно и целесообразно.

3. Обязательным является выполнение всех работ студентами, начиная от приготовления некоторых реактивов, до анализа и оценки результатов исследований. Каждая работа является контрольной задачей и обсуждение полученных результатов легче связать с соответствующим теоретическим материалом, чему способствуют контрольные вопросы, всесторонне охватывающие изучаемую тему.

4. Студенту в лаборатории отводится постоянное место (рабочий стол), и он обязан поддерживать его в чистоте и порядке. На рабочем столе должны находиться только те предметы, которые нужны в данное время для работы. Все работы, за небольшим исключением, выполняются студентом индивидуально. Категорически запрещается без разрешения преподавателя выполнять опыты, не описанные в руководстве.

5. Необходимые для работы реактивы выставлены на полки, находящиеся над лабораторными столами. Исключение составляют вещества, которые хранятся в вытяжных шкафах. Сухие реактивы необходимо брать чистым шпателем или специальной ложечкой. При дозировании растворов из склянок следует держать последние таким образом, чтобы этикетка была повернута вверх (во избежание ее загрязнения). Крышки и пробки от реактивных банок и склянок следует помещать на стол поверхностью, не соприкасающуюся с реактивом.

6. Если в руководстве нет специального указания, какое количество вещества необходимо взять для проведения в пробирке того или иного опыта, предлагается брать сухое вещество в количестве, закрывающем дно пробирки, а раствор - не более 1/6 объема пробирки. Следует иметь в виду, что при работе с малыми количествами вещества большинство операций (нагревание, охлаждение, фильтрование, высушивание и др.) требует значительно меньше труда и времени. Неизрасходованные реактивы нельзя высыпать (вылить) обратно в материальные склянки, их надо сдавать лаборанту. Для приготовления водных растворов и ополаскивания вымытой стеклянной посуды следует пользоваться дистиллированной водой.

7. Важно рационально и правильно использовать рабочее время. Если определение или опыт по какой-либо причине задерживаются, следует начать другое определение или подготовку к другому опыту. Работа в лаборатории требует тишины, переговоры следует вести в полголоса.

8. Студенты должны соблюдать правила пожарной безопасности и техники безопасности при пользовании реактивами в химической лаборатории. Работать в лаборатории можно только в халате.

9. Уходя из лаборатории, надо убедиться, что все краны (газовые, водопроводные) закрыты; все электроприборы выключены; столы убраны; дверцы вытяжных шкафов опущены.

ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ

В практикуме по биохимии применяют следующую лабораторную посуду:

1. Колбы – круглодонные, плоскодонные, мерные (от 25 мл до 5,0 л),
2. Химические стаканы – различных объемов (чаще от 50 мл до 2,0 л),
3. Пробирки – цилиндрические и конические,
4. Цилиндры – от 10 мл до 2,0 л,
5. Мензурки – от 50 мл до 1,0 л.
6. Пипетки – емкостью от 0,1 мл до 100 мл – градуированные и пипетки Мора, автоматические, дозаторы.
7. Бюретки и микробюретки.
8. Промывалки.
9. Фарфоровые тигли.
10. Фарфоровые чашки.
11. Фарфоровые ступки.
12. Эксикаторы.

13. Воронки.
 14. Посуда для взвешивания – часовые стекла, бюксы, тигли.
 15. Стеклянные палочки, лопаточки, наконечники.
- Зарисовать лабораторную посуду и записать ее назначение.

Мытье лабораторной посуды

1. Посуду после выполнения лабораторного анализа необходимо промыть в проточной водопроводной воде.
 2. Затем тщательно промыть с помощью ершей.
 3. Замочить на 1–2 часа в хромовой смеси («хромпик»). Можно использовать синтетические моющие средства, не содержащие биодобавок.
 4. Отполоскать от моющего средства с помощью проточной водопроводной воды: 10 раз при использовании хромовой смеси и 15 раз – при использовании синтетических моющих средств.
 5. Прополоскать в проточной дистиллированной воде 3 раза,
 6. Чистую посуду высушить в сушильном шкафу при температуре 150–180°C.
- Сухую посуду (колбы, стаканы) закрыть фильтровальной бумагой либо поставить в шкаф или на стол вверх дном. Пробирки сложить в чистые коробки или ящики столов, выложенные чистой фильтровальной бумагой. Сверху их также следует прикрыть фильтровальной бумагой от пыли и грязи.

Лабораторное оборудование

1. Спектрофотометры СФ–4, СФ–16, СФ–26, СФ–46.
2. Фотоэлектроколориметры (различных марок).
3. Центрифуги – различных марок и назначения.
4. рН-метры.
5. Ионометры с ионоселективными электродами.
6. Весы: аналитические, торсионные, технические.
7. Термостат.
8. Хроматографические камеры.
9. Автоматические анализаторы.

Калибровка мерной посуды

Номинальная емкость мерной посуды не всегда соответствует ее истинной емкости. Для повышения точности объемного анализа мерную посуду, используемую в лаборатории, необходимо калибровать. За единицу объема в метрической системе мер принимают «истинный литр», т.е. объем, занимаемый массой воды в 1 кг при температуре ее наибольшей плотности (т.е. при 3,98°C), взвешенной в безвоздушном пространстве.

В качестве стандартной температуры при калибровании мерной посуды в настоящее время принята температура +20 °C. «Нормальный литр» равен объему такого количества вещества, которое занимает при +20°C объем истинного литра.

Мерную посуду калибруют или проверяют, определяя вес чистой воды, содержащейся в ней, или вес воды, вылитой из нее, при определенной температуре; по весу воды рассчитывают емкость посуды.

Калибровка мерных колб. Емкость мерной колбы проверяют путем взвешивания на технических весах воды, вмещаемой колбой. Для предотвращения ошибки, связанной с неравноплечностью технических весов, рекомендуется следующий порядок взвешивания.

Чистую сухую мерную колбу помещают на левую чашку весов. На эту же чашку ставят разновес, соответствующий весу воды в объеме калибруемой колбы. Затем уравнивают весы и заполняют колбу дистиллированной водой, имеющей температуру окружающего воздуха. Следят за тем, чтобы при заполнении колбы капли воды не остались на стенке горла колбы выше метки (капли воды снимают фильтровальной бумагой). Колбу с водой взвешивают, уравнивая весы снятием разновеса с левой чашки. Вес воды в колбе равен весу разновесов, снятых с левой чашки весов. (Если вес воды в колбе больше веса снятого разновеса, то для уравнивания разновесы добавляют на правую чашку весов). Определение повторяют еще два-три раза.

Калибровка пипеток. Чтобы проверить емкость пипетки, надо взвесить на аналитических весах бюкс с крышкой.

Набрать в пипетку дистиллированную воду до черты (по нижнему мениску), перенести ее во взвешенный бюкс. После опорожнения пипетки выжидают еще 15 с и только после этого отнимают кончик пипетки от стенки сосуда. В кончике пипетки всегда остается небольшое количество жидкости. На это не обращают внимания, т.к. пипетка градуируется на вытекание, и та капля, которая остается в пипетке, не входит в ее объем. Поэтому эту каплю из пипетки не следует ни выдувать, ни выжимать.

Бюкс, в который перенесли воду, закрыть крышкой и снова взвесить. Вес воды в объеме пипетки находят по разности двух взвешиваний. Процедуру определения емкости пипетки проводят трижды, используя для этого три отдельные сухие емкости, и берут среднее арифметическое из 3-х взвешиваний.

При калибровке микропипеток взвешиваемый объем должен превышать погрешность взвешивания в 100 раз, так при калибровке микропипеток вместимостью 10 мкл необходимо поместить во взвешенный бюкс не менее 5 ее объемов.

Калибровка бюреток. Процедура проверки емкости бюретки такая же, как для пипеток, только проделывать ее надо для каждого объема последовательно, т.е. если бюретка вместимостью 50 мл, то взвешивают три раза 5 мл воды (спуская воду от нулевого деления до 5) и находят поправку, затем 10 мл и т.д. до 50 мл. При использовании автоматических микропипеток лучше пользоваться одним дозатором для отбора проб и калибратора, меняя только наконечники.

Применение международной системы единиц (СИ) в лабораторной практике

Масса – величина, характеризующая инерционные и гравитационные свойства тела. Массу тела в состоянии покоя определяют взвешиванием на весах. Результат взвешивания тела на весах следует называть массой, а не весом и выражать в единицах массы – килограммах (кг), граммах (г), дольных от грамма – миллиграммах (мг), микрограммах (мкг), нанограммах (нг).

Количество вещества – величина, определяемая числом структурных элементов (атомов, молекул, ионов, электронов и других частиц) в рассматриваемом веществе. За единицу количества вещества принят моль (моль – это количество вещества, содержащее столько структурных единиц, сколько содержится атомов в 0,012 кг изотопа углерода ^{12}C . Число частиц в моле любого вещества одно и то же. Оно равно $6,02 \cdot 10^{23}$ и называется «постоянной Авогадро»). Кратные и дольные единицы от моль – киломоль (кмоль), миллимоль (ммоль), микромоль (мкмоль) и др.

Молярная масса – это масса вещества, взятого в количестве 1 моль. Ее выражают в кг/моль или г/моль. В общем случае молярная масса вещества, выраженная в граммах, численно равна его относительной молекулярной (атомной) массе, выраженной в атомных единицах массы.

Массовая концентрация компонента – отношение массы компонента к объему смеси. Единицы в СИ – кг/м³, в биохимических исследованиях – г/л.

Молярная концентрация компонента (молярность компонента) – отношение количества вещества к объему смеси. Единицы в СИ – моль/м³, в биохимических исследованиях – моль/л (для выражения концентрации веществ с известной относительной молярной массой).

Нормальная концентрация, или нормальность, выражается числом эквивалентов вещества, содержащегося в 1 л раствора. Раствор, в 1 л которого содержится один эквивалент растворимого вещества, называется нормальным (0,1 экв. вещества – децинормальным, 0,01 экв. – сантинормальным, 0,001 экв. – миллинормальным).

Понятие «*активность фермента*» применяют для количественной характеристики биологических катализаторов – ферментов. В качестве единицы СИ принимается моль/с (моль в секунду) – активность фермента, катализирующего превращение 1 моля субстрата (имеется в виду убыль субстрата или образование продукта реакции) в 1 секунду при определенных условиях.

Скорость ферментативной реакции определяется по убыли субстрата или образованию продукта реакции за определенное время в определенном объеме исследуемого материала. В качестве единицы СИ принимается моль в секунду на кубический метр – моль/(с·м³). Однако для выражения результатов биохимических исследований пользуются единицами моль в секунду на литр – моль/(с·л) или чаще миллимоль в час на литр – ммоль/(ч·л).

Показатели экскреции исследуемого компонента с суточным объемом мочи принято обозначать количеством выводимого вещества, отнесенного к единице измерения «сутки» (например, ммоль/сут, мкмоль/сут, нмоль/сут).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какую лабораторную посуду применяют в биохимии?
2. Правила мытья лабораторной посуды.
3. Какое лабораторное оборудование используют в биохимии? Какие анализы на этом оборудовании можно провести.
4. Калибровка мерной посуды.
5. Какие международные системы единиц (СИ) используются в лабораторной практике?
6. Методы расчета экспериментальных данных.
7. Какие ошибки возможны при расчетах?
8. Приведите примеры приготовления растительных образцов.
9. Приведите примеры приготовления образцов из тканей животных.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. АМИНОКИСЛОТЫ, СВОЙСТВА, КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с цветными реакциями на белки и аминокислоты.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Для аминокислот и белков характерны определенные цветные реакции. Часть этих реакций обусловлена присутствием тех или иных атомных группировок, общих для молекул различных белков, и поэтому такие реакции являются общими цветными реакциями на белки. Другие реакции связаны с наличием в молекуле белка остатка, какой либо аминокислоты и, следовательно, характерны для белков, в молекулу которых входит данная аминокислота.

2.1. БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ (РЕАКЦИЯ ПИОТРОВСКОГО)

В сильно щелочном растворе при добавлении соли меди такие вещества, как биурет ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), оксамид ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$), полипептиды и белки образуют сине-фиолетовые и красновато-фиолетовые комплексные соли.

Белки дают сине-фиолетовое окрашивание; продукты их гидролиза – красную или розовую окраску. Биуретовая реакция обусловлена присутствием в молекуле или двух $-\text{CO}-\text{NH}-$ групп или одной $-\text{CO}-\text{NH}-$ группы или $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ групп, связанных непосредственно между собой или посредством атома углерода или азота. Биуретовую реакцию дают пептиды, содержащие минимум три остатка аминокислот.

2.1.1. ОБНАРУЖЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Ход работы

А. Берут пять пробирок и вносят по 1 мл : в первую воды, во вторую – раствора казеина, в третью – раствора яичного белка, в четвертую – раствора желатины, в пятую – раствора α -аминокислоты. В каждую пробирку добавляют по 2 мл раствора гидроксида натрия 10 % и по 3-4 капель раствора с массовой долей сульфата меди 1 %. Содержимое каждой пробирки перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 10 минут для развития окраски. При малом содержании белка чувствительность реакции можно повысить путем наложения на раствор белка в щелочи 1 мл раствора с массовой долей сульфата меди 1 %.

Б. При малом содержании белка и недостаточной яркости и отчетливости получаемой окраски снова смешивают в чистой пробирке растворы белка и щелочи, наклоняют пробирку и осторожно приливают по ее стенке из пипетки 0,5-1 мл раствора сернокислой меди так, чтобы он образовал в пробирке верхний слой, не смешиваясь с остальной жидкостью. В этом случае на границе слоев появляется очень отчетливое фиолетовое прозрачное кольцо.

Результаты всех реакций вносят в табл.

Таблица Биуретовая реакция на белки и аминокислоты

Исследуемый материал	Окраска продукта	Реагирующая группа
Вода		

Казеин		
Яичный белок		
Желатин		
Аминокислота		

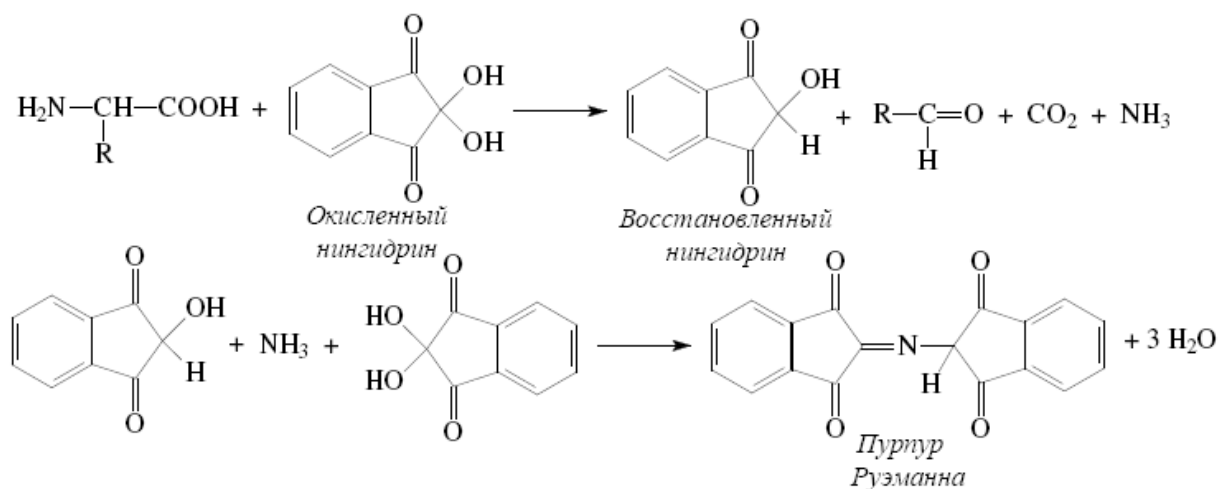
2.1.2. ОБНАРУЖЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ В МОЛЕКУЛЕ ГРАМИЦИДИНА

Ход работы

Содержимое одной таблетки с грамицидином растирают и вносят в пробирку, прибавляют тройной объем 30%-ного раствора гидроксида натрия и хорошо перемешивают. Затем из капельницы добавляют несколько капель 1%-ного раствора сульфата меди и снова хорошо перемешивают. Развивается интенсивное сине-фиолетовое окрашивание, свидетельствующее о наличии пептидных связей в молекуле грамицидина.

2.2. НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (РЕАКЦИЯ РУЭМАННА)

При нагревании растворов белков и полипептидов с нингидрином образуется синее окрашивание.



Эта реакция обусловлена присутствием α -аминокислот со свободной α -аминогруппой, которые реагируют с нингидрином, причем образуются альдегид, аммиак, CO_2 и восстановленный нингидрин. Восстановленная форма нингидрина реагирует с избытком нингидрина и с аммиаком. При этом образуется продукт конденсации синего цвета.

Окраска чувствительна к $[\text{H}^+]$, поэтому нингидриновую реакцию ведут в нейтральном растворе. Кроме того, следует иметь в виду, что аммиак и β -аланин также дают положительную нингидриновую реакцию. Чувствительность нингидриновой реакции может быть повышена добавлением аскорбиновой кислоты.

Ход работы

В пробирку наливают 10 капель раствора белка, добавляют 5—6 капель 0,2% раствора нингидрина и кипятят. Через 1—3 минуты наблюдают появление розового, красного, а затем сине-фиолетового окрашивания. Через некоторое время раствор становится синим.

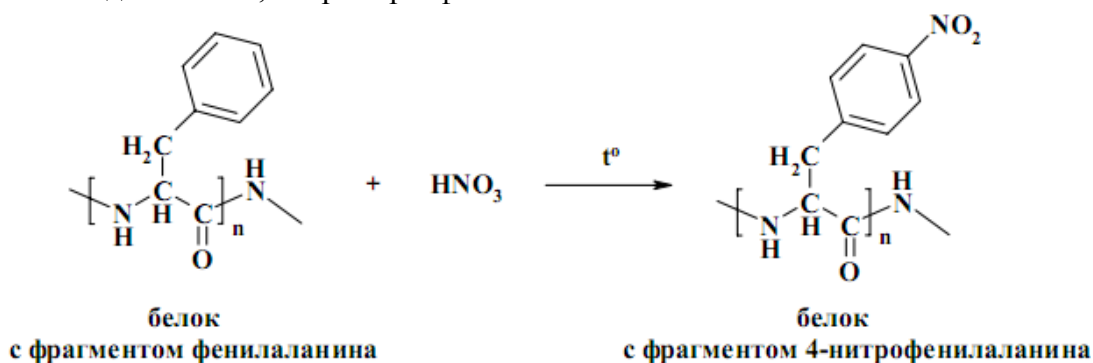
2.3. КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (МУЛЬДЕРА) (на тирозин, триптофан, фенилаланин)

Если смешать раствор белка с концентрированной азотной кислотой, то выпадает осадок белка, который при нагревании смеси частью растворяется с образованием желто окрашенного раствора (греческое «Ксантос» – желтый). При этом происходит образование нитросоединений триптофана и тирозина. Если далее к полученному раствору осторожно добавить едкой щелочи или аммиака, то появляется красновато-оранжевое окрашивание. Это окрашивание обусловлено образованием солей таутомерных ациформ нитросоединений – нитроновых кислот.



Триптофан дает более ярко-красную окраску, чем тирозин. Фенилаланин не нитруется при действии одной азотной кислоты, но при добавлении концентрированных серной и азотной кислот нитрование идет. Ксантопротеиновая реакция получается лучше с сухими препаратами белка.

Ксантопротеиновую реакцию (желтое окрашивание) можно наблюдать на коже, ногтях, шерсти и т. п. при попадании на них концентрированной азотной кислоты. Белки, не содержащие тирозина и триптофана, не дают этой реакции (желатина, сальмин и др.). В отличие от тирозина и триптофана, фенилаланин подвергается нитрованию с большим трудом и, по-видимому, не обуславливает ксантопротеиновой реакции. Поскольку ксантопротеиновая реакция обусловлена нитрованием ароматического кольца, она может быть положительной с более простыми ароматическими соединениями, например с фенолом.

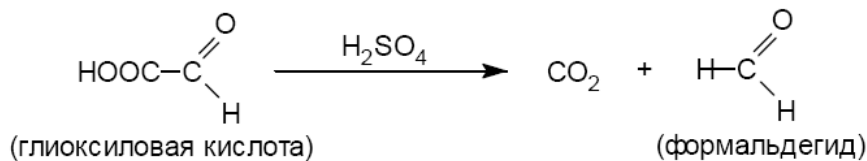


Ход работы

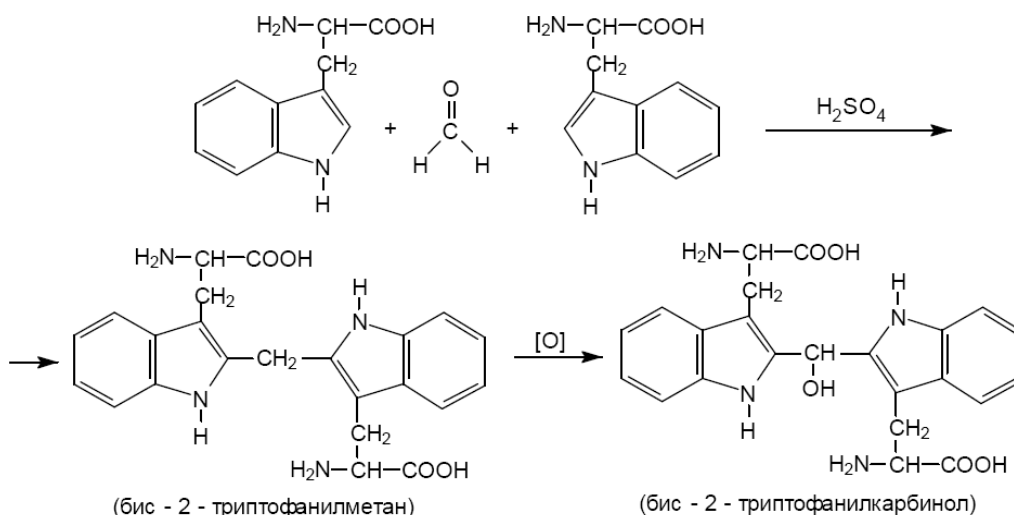
К 1 мл раствора белка добавляют 0,2-0,3 мл концентрированной азотной кислоты, появляется белый осадок или раствор мутнеет. Затем нагревают смесь на горелке до кипения и поддерживают его в течение 1-2 мин. При этом раствор и осадок окрашиваются в ярко-желтый цвет. При кипячении выделившийся осадок может полностью или частично раствориться в результате гидролиза, но характерная желтая окраска раствора сохраняется. Охладив смесь, осторожно по каплям добавляют к кислой жидкости избыток (1-2 мл) концентрированного раствора щелочи или аммиака. Выпадает осадок кислотного альбумината, образующий с избытком щелочи ярко-оранжевый раствор.

2.4. РЕАКЦИЯ АДАМКЕВИЧА

При прибавлении к раствору большинства белков несколько капель концентрированной серной кислотой получается красно-фиолетовое окрашивание. Эта реакция связана с присутствием в молекуле белка триптофана.



Две молекулы триптофана, реагируя с глиоксильной кислотой, образуют соединение красно-фиолетового цвета:



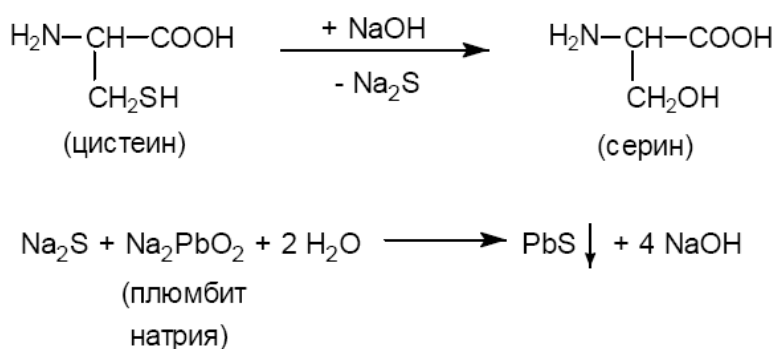
Ход работы

В пробирку наливают несколько капель белка, прибавляют около 1 мл уксусной кислоты и, сильно наклонив пробирку, очень осторожно, по стенке, подслаивают около 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы обе жидкости не смешивались. При стоянии через 10 мин на границе двух жидкостей получается красно-фиолетовое кольцо.

2.5. РЕАКЦИЯ НА ЦИСТЕИН (РЕАКЦИЯ ФОЛЯ)

Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислот цистина и цистеина, содержащих слабосвязанную серу.

Эти аминокислоты под влиянием щелочи при нагревании разрушаются с образованием сероводорода. Последний в щелочной среде дает сернистый натрий, который, реагируя с плюмбитом натрия, образует черный осадок сернистого свинца. Для выявления сульфида натрия используют ацетат свинца, который при взаимодействии с гидроксидом натрия превращается в плюмбит. В результате взаимодействия ионов серы и свинца образуется сульфид свинца черного или бурого цвета. При нагревании со щелочью часть белка подвергается гидролизу. Кроме того происходит отщепление части аминокислот (реакция дезаминирования) в виде аммиака, который можно обнаружить по запаху и посредством смоченной водой красной лакмусовой бумажки, поднесенной к отверстию пробирки (не касаться стенок!).



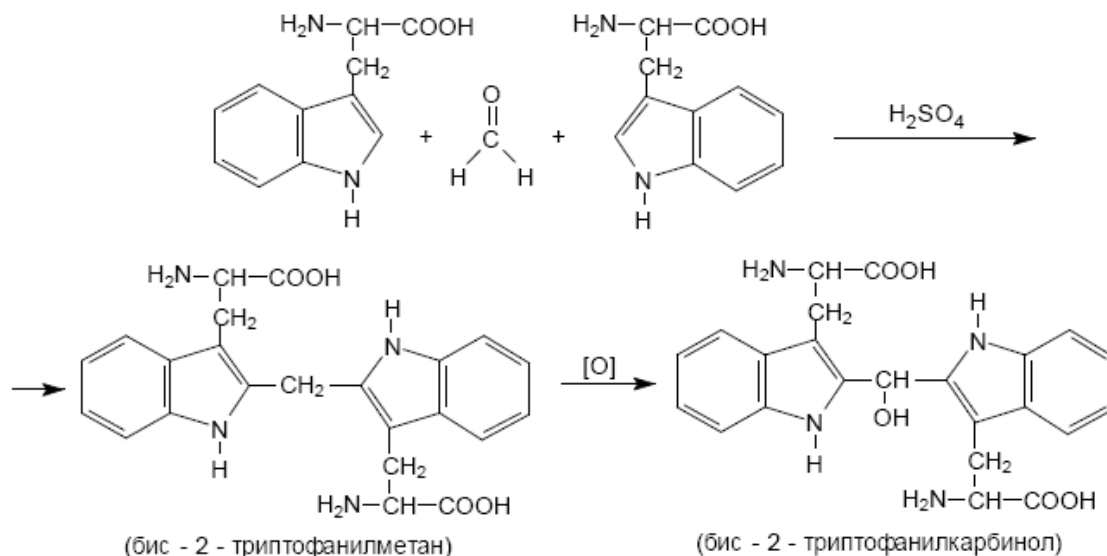
Ход работы

В одну пробирку наливают 5 капель раствора яичного белка, в другую - 5 капель 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 30 % раствора гидроксида натрия и по 1 капле 5% раствора ацетата свинца. При интенсивном кипячении жидкость в пробирках с яичным белком темнеет, образуется черный осадок сульфида свинца. В пробирки с желатином черного осадка не образуется, объясните почему?

2.6. РЕАКЦИЯ ВАУЗЕНЕ (НА ТРИПТОФАН)

Белки, содержащие триптофан, дают в кислой среде в присутствии нитрита натрия и формальдегида сине-фиолетовое окрашивание. В этой реакции триптофан взаимодействует с

формальдегидом с образованием продукта конденсации (бис-2-триптофанилметана), который окисляется нитритом натрия до бис-2-триптофанилкарбинола. Последний в присутствии минеральных кислот образует соли сине-фиолетового цвета.



Ход работы

К 1 мл 1% раствора яичного белка добавляют 1 каплю 2,5% раствора формальдегида. К полученной смеси, тщательно перемешивая, добавляют осторожно по каплям 3 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку в ванночке со льдом. Через 10 минут добавляют, перемешивая, 5 капель 0,5% раствора нитрита натрия. Появляется сине-фиолетовая окраска.

2.7. РЕАКЦИЯ С ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

При взаимодействии α-аминокислот с формальдегидом образуются относительно устойчивые карбиноламины – N-метилольные производные, содержащие свободную карбоксильную группу, которую затем титруют щелочью. Эта реакция лежит в основе количественного определения α-аминокислот методом формального титрования (метод Сёренсена).

Ход работы

В пробирку наливают 5 капель 1%-го раствора глицина и прибавляют 1 каплю индикатора метилового красного. Раствор окрашивается в желтый цвет (нейтральная среда). К полученной смеси добавляют равный объем 40%-го раствора формальдегида (формалин). Появляется красное окрашивание.

2.8. РЕАКЦИЯ ШУЛЬЦЕ-РАСПАЙЛЯ

Данная реакция обусловлена наличием в белке остатка триптофана. Триптофан, взаимодействуя с оксиметилфурфуролом, даёт продукты конденсации, окрашенные в вишнево-красный цвет. Оксиметилфурфурол в этой реакции образуется из гексоз (быстрее из фруктозы), получающихся при гидролизе сахарозы под влиянием концентрированной серной кислоты.

Ход работы

К 1 капле неразбавленного яичного белка или к 5—10 каплям сыворотки добавляют 1—2 капли 10% раствора сахарозы и пипеткой осторожно по стенке пробирки подслаивают около 1 мл концентрированной серной кислоты.

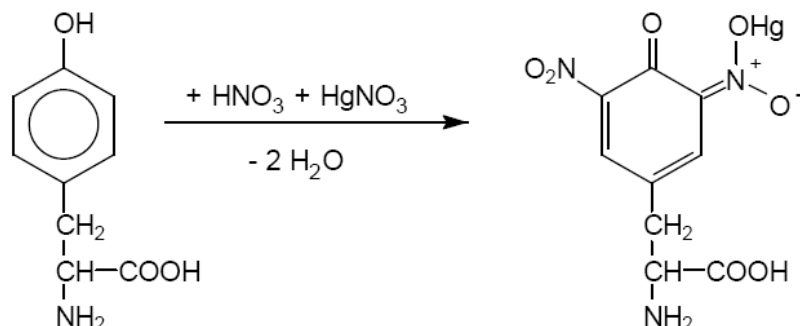
Легким встряхиванием пробирки смешивают обе жидкости. Вследствие выделения тепла при растворении H_2SO_4 в воде происходит саморазогревание жидкости на месте соприкосновения обоих слоев и появляется вишнево-красное окрашивание. Необходимо следить, чтобы жидкость не перегрелась выше $70\text{ }^{\circ}C$, так как иначе под влиянием H_2SO_4 происходит обугливание органического вещества и раствор бурет.

2.9. РЕАКЦИЯ МИЛЛОНА

Реактив Миллона состоит из азотнокислых солей окиси и закиси ртути в HNO_3 с примесью

HNO₂. Он дает окрашивание с фенолами, полифенолами.

В случае белков реакция обусловлена присутствием в них тирозинового остатка со свободной фенольной группой. При нагревании раствора белка с реактивом Миллона образуется нитросоединение тирозина, которое, присоединяя ртуть, превращается в ртутную соль нитротирозина, имеющую пурпурно-красный цвет. Белки, не содержащие тирозин (желатина, клупеин, сальмин и др.), не дают реакции Миллона.



Ход работы

В пробирку наливают 5 капель раствора белка и 3 капли реактива Миллона. Образуется белый осадок (действие соли тяжелого металла, а также концентрированной азотной кислоты). При слабом нагревании (нагревать не выше 50 °С) осадок окрашивается сначала в розовый, а затем в пурпурно-красный цвет от образования ртутной соли нитропроизводного тирозина.

Для сравнения производят аналогичным образом Миллонову реакцию с желатиной. Жидкость остается бесцветной (или слегка желтеет), так как в молекуле желатины остатки тирозина отсутствуют.

Проделяют реакцию с фенолом. В пробирку наливают 10 капель раствора фенола, 5 капель реактива Миллона и осторожно нагревают. Появляется розовое окрашивание.

2.10. РЕАКЦИЯ ПАУЛИ (НА ГИСТИДИН И ТИРОЗИН)

Реакция Паули позволяет обнаружить в белке аминокислоты гистидин и тирозин, которые образуют с диазобензолсульфоновой кислотой комплексные соединения вишнево-красного цвета. Диазобензолсульфоновая кислота образуется в реакции диазотирования при взаимодействии сульфаниловой кислоты с нитритом натрия (или калия) в кислой среде.

Ход работы

К 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты (готовится на 5% соляной кислоте) прибавляют 2 мл 0,5% раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают, добавляют 2 мл 1% раствора яичного белка и после перемешивания 6 мл 10% раствора карбоната натрия. После перемешивания смесь окрашивается в вишнево-красный цвет. Проделяют эту реакцию с 0,1% раствором гистидина, сравнивают полученные результаты и делают вывод.

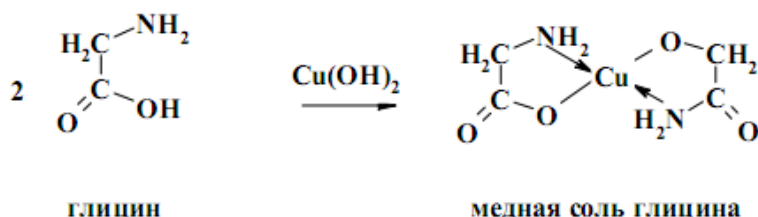
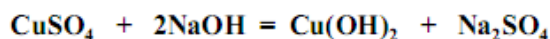
2.11. РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ С АЗОТИСТОЙ КИСЛОТОЙ (ПРОБА ГЕЛЛЕРА)

Проба Геллера основана на взаимодействии аминокислоты (аланина), нитрита натрия и кислоты.

Ход работы

К 2 мл 10 % раствора аланина приливают 2 мл 10% раствора нитрита натрия и 2 капли ледяной уксусной кислоты и встряхивают. Выделяются пузырьки газообразного азота.

2.12. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМИНОКИСЛОТ С СОЛЯМИ МЕДИ (II)



Ход работы

Поместите в пробирку 10 капель раствора глицина, туда же добавьте несколько кристаллов карбоната меди. Содержимое пробирки перемешайте и выдержите на кипящей водяной бане 3-5 минут. С осадка слейте раствор в другую пробирку, охладите. Какие видимые изменения произошли в пробирке?

2.13. ДИАЗОРЕКЦИЯ

Белки дают оранжево-красное окрашивание с диазореактивом (сульфаниловая кислота, растворенная в концентрированной хлоридной кислоты). Окрашивание зависит от образования азосоединений с остатками аминокислот - тирозина, триптофана, гистидина, которые входят в состав белковой молекулы.

Ход работы

В пробирку наливают 0,5 мл 1% раствора белка, 8 капель 10% раствора натрия карбоната и 16 капель диазосмеси (сульфаниловая кислота, растворенная в концентрированной хлоридной кислоты). Через 10 минут образуется оранжево-красное окрашивание.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

№	Название	Реактивы и условия	Окраска	Аминокислоты

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Общая характеристика пептидов, полипептидов, белков и их строения.
2. Как соединяются аминокислоты в молекуле белка и за счет каких групп? Соедините Ала, Цис, Сер.
3. Перечислите цветные реакции на белки и аминокислоты.
4. Какая реакция открывает пептидные связи? Её химизм.
5. Что характеризуют цвет и интенсивность окраски при положительной биуретовой реакции?
6. Что открывает нингидриновая реакция? Её химизм.
7. Назовите аминокислоты имеющие в радикале бензольное кольцо. Какой реакцией можно обнаружить ароматические аминокислоты? Её химизм.
8. Назовите аминокислоты содержащие серу. Какую из них обнаруживает реакция Фоля? Химизм реакции.
9. Какую цветную реакцию используют для количественного определения белков в растворе и почему?
10. Какую цветную реакцию используют для количественного определения α-аминокислот и почему?
11. Классификация аминокислот (примеры).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3. ПЕПТИДЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с реакциями осаждения .

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Реакции осаждения весьма разнообразны, однако их можно разделить на две группы:

- 1) практически необратимые реакции осаждения, при которых белки претерпевают глубокие

изменения и не могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе: в этом случае имеет место денатурация белка; к необратимым реакциям относятся осаждение белка солями тяжелых металлов, алкалоидными реактивами, минеральными, органическими кислотами и осаждение при нагревании;

2) обратимые реакции осаждения, при которых осаждаемые белки не подвергаются глубоким изменениям и поэтому могут быть растворены в первоначальном растворителе; молекулы белка при этом сохраняют свои первоначальные, включая биологические, свойства и не подвергаются денатурации. К обратимым реакциям осаждения следует отнести реакции осаждения белков органическими растворителями (спиртом или ацетоном) и реакции высаливания белков (осаждение под влиянием концентрированных растворов нейтральных солей щелочных и щелочноземельных металлов).

1. ОСАЖДЕНИЕ ПРИ НАГРЕВАНИИ

Почти все белки денатурируют при нагревании до температуры от 50 °С до 55 °С и выше. Механизм тепловой денатурации связан с перестройкой структуры белковой молекулы, в результате которой белок теряет свои нативные свойства и растворимость. Присутствие солей и концентрация водородных ионов играют важную роль в выпадении в осадок денатурированного при нагревании белка. Наиболее полное осаждение происходит в изоэлектрической точке белка, т.е. при такой величине pH, когда коллоидные частицы белка наименее устойчивы.

Ход работы

В пять пронумерованных пробирок наливают по 10 капель 1% раствора яичного белка. Содержимое первой пробирки нагревают на газовой горелке. Жидкость мутнеет, и, так как частицы денатурированного белка несут заряд, они удерживаются во взвешенном состоянии (яичный альбумин является кислым белком и в нейтральной среде заряжается отрицательно).

Во вторую пробирку добавляют 2-3 капли 1% уксусной кислоты и нагревают. Выпадает осадок белка вследствие того, что белок теряет заряд и находится в состоянии, близком к изоэлектрической точке.

В третью пробирку добавляют 2-3 капли 10% раствора уксусной кислоты, и содержимое нагревают. Осадка белка не образуется даже при кипячении, т.к. в кислой среде частицы белка перезаряжаются, приобретая положительный заряд.

В четвертую пробирку добавляют 2-3 капли 10% раствора уксусной кислоты и 1 каплю насыщенного раствора хлористого натрия. Образуется осадок белка вследствие адсорбции ионов хлористого натрия (образование двойного изоэлектрического слоя) и нейтрализации положительного заряда на частицах белка.

В пятую пробирку добавляют 2-3 капли 10% раствора едкого натра и нагревают. Осадка белка не образуется даже при кипячении, т.к. в щелочной среде отрицательный заряд на частице белка усиливается. Результаты опыта внести в таблицу.

Таблица Осаждение белка при нагревании

№	Среда	Реактивы	Наблюдаемые изменения	Выводы
1	Нейтральная			
2	Слабокислая			
3	Кислая			
4	Кислая и электролит			
5	Щелочная			

2. ОСАЖДЕНИЕ КОНЦЕНТРИРОВАННЫМИ МИНЕРАЛЬНЫМИ КИСЛОТАМИ

Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами объясняется как явлениями дегидратации белковых частиц и нейтрализации их зарядов, так и рядом других причин (денатурацией, образованием солей).

В избытке серной или соляной кислот, а также при их длительном воздействии, выпавший осадок денатурированного белка растворяется за счет перезарядки белка и частичного гидролиза. В избытке азотной кислоты этого растворения не происходит (сопутствующий нитрат-ион мешает перезарядке белковой молекулы).

Ход работы

В 1-ю пробирку наливают 10 капель концентрированной соляной, во 2-ю 10 капель концентрированной азотной, в третью 10 капель концентрированной серной кислот. Затем, наклонив пробирки под углом 45°, осторожно по стенке пробирки (чтобы жидкости не смешались) наливают 10 капель раствора белка. На границе двух слоев жидкости появляется осадок белка в виде тонкой пленки. Осторожно встряхнуть пробирки, что наблюдается?

3. ОСАЖДЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИМИ КИСЛОТАМИ

Механизм осаждения белков органическими кислотами объясняется дегидратацией белковой и снятием заряда.

Реакции с трихлоруксусной (CCl_3COOH) и сульфосалициловой кислотами являются весьма специфическими и чувствительными (сульфосалициловая кислота открывает белок в разведении 1: 50000). Они получили широкое практическое применение в клинических лабораториях при обнаружении белка в моче и других биологических жидкостях.

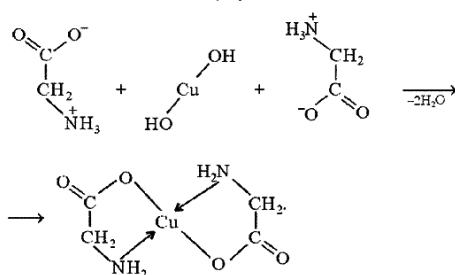
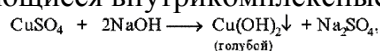
Ход работы

В две пробирки наливают по 5 капель 1% раствора белка и добавить в одну пробирку 2 капли 10% раствора сульфосалициловой и в другую 2 капли 10% трихлоруксусной кислот. В обеих пробирках образуются осадки белка.

4. ОСАЖДЕНИЕ СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

При действии солей тяжелых металлов на растворы белка происходит денатурация белковой молекулы. Осаждение дегидратированного белка обусловлено адсорбцией тяжелого металла на поверхности белковой молекулы и образованием нерастворимых комплексов.

Со свежеприготовленным гидроксидом меди (II) все α -аминокислоты в мягких условиях дают хорошо кристаллизующиеся внутрикомплексные (хелатные) соли меди (II) синего цвета:



глицинат меди (II)

В таких солях ион меди координационными связями соединен с аминогруппами. Избыток некоторых солей ведет к растворению (пептизации) осадка белков.

Ход работы

В три пробирки наливают по 5 капель 1% раствора яичного белка и по 2-3 капли: в первую - 7% раствора сернокислой меди, во вторую - 5% раствора уксуснокислого свинца, в третью - 5% раствора азотнокислого серебра. Наблюдается образование осадка во всех трех пробирках.

В первую пробирку добавляют еще 5-10 капель раствора сернокислой меди, во вторую - 5-10 капель уксуснокислого свинца, в третью - 5-10 капель азотнокислого серебра. Пронаблюдать, что происходит. Результаты опыта внести в таблицу 2.

5. ОСАЖДЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

При добавлении к раствору белка органических растворителей, например спирта, выпадает осадок белка. В зависимости от природы белка для его осаждения требуются различные концентрации спирта. Осаждение наступает только из нейтральных или слабокислых растворов (в слабокислой среде заряд на коллоидных частицах белка является наименьшим) и более полно в присутствии электролитов, например хлористого натрия, что связано с ослаблением внутримолекулярных ионных связей ввиду конкуренции добавленных анионов и катионов. Если осаждение производить при низкой температуре (от 0 до 15 °С) и полученный осадок быстро отделить от спирта, то белок сохраняет свои природные свойства и может быть вновь растворен в воде. Длительное воздействие спирта приводит к необратимой денатурации белка.

Однако некоторые белки, например проламины растений, растворимы в горячем 70—80%

спирте, гормон поджелудочной железы — инсулин растворяется в подкисленном 60% спирте. Это зависит от особенностей их первичной структуры.

Ход работы

1. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка, а затем при взбалтывании—этиловый спирт до появления осадка. При добавлении 1—2 капель 1% раствора уксусной кислоты образование осадка усиливается. Еще большее осаждение наблюдается при добавлении нескольких капель (1—2) насыщенного раствора поваренной соли.

2. Проделывают ту же реакцию, взяв вместо этилового спирта ацетон.

3. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка и добавляют равный объем хлороформа. После встряхивания пробирки и последующего разделения слоев воды и хлороформа в верхнем слое жидкости появляется осадок белка. Денатурация белка хлороформом получила распространение при выделении нуклеиновых кислот и их очистке.

4. В пробирку наливают 10 капель раствора белка и добавляют при взбалтывании фенол до появления муты или осадка. Осадок увеличивается при стоянии.

6. ОСАЖДЕНИЕ РЕАКТИВАМИ НА АЛКАЛОИДЫ

Алкалоидные реактивы осаждают как белки, так и азотистые основания растений. Объясняется это наличием в белке азотистых гетероциклических группировок, аналогичных тем, которые находятся в молекулах алкалоидов (пиррольные, индольные, юшдазольные). Осаждение белков алкалоидными реактивами протекает в кислой среде и обусловлено образованием нерастворимых солеобразных соединений с основными азотистыми группами белков. При этом происходит адсорбция аниона осадителя, например $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, на белковой молекуле, являющейся вследствие подкисления катионом. Белки, обладающие основным характером (протамины, гистоны), осаждаются алкалоидными реактивами в нейтральной среде.

Ход работы

1. К 5 каплям раствора белка прибавляют 1 - 2 капли насыщенного раствора танина и 1 - 2 капли 1% раствора уксусной кислоты. Выпадает осадок белка.

2. Добавить к раствору белка, подкисленного уксусной кислотой, 4-5 капель насыщенного раствора пикриновой кислоты. Образуется желтоватый осадок.

3. К подкисленному уксусной кислотой раствору белка добавить по каплям 5% раствор $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Выпадает осадок.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите основные факторы, обуславливающие стабильность молекул белка в растворе.
2. Причины осаждения белков нагреванием при pH около 7,0?
3. Характеристика обратимых и необратимых реакций осаждения белков.
4. Почему в растворе при $\text{pH} < 7,0$ белки при нагревании не выпадают в осадок?
5. Почему в растворе при $\text{pH} > 7,0$ белки при нагревании не выпадают в осадок?
6. Почему в растворе при $\text{pH} < 7,0$ с добавлением хлорида натрия белки при нагревании выпадают в осадок?
7. Механизм действия минеральных кислот на белки в растворе.
8. Механизм осаждения белков органическими кислотами.
9. Механизм осаждения белков солями тяжелых металлов.
10. Механизм осаждения белков органическими растворителями.
11. Ренатурация белков, всегда ли она возможна?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. БЕЛКИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить свойства простых белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Высаливанием белков называется выделение белков из водных растворов нейтральными растворами концентрированных солей щелочных и щелочноземельных металлов. При добавлении достаточно больших концентраций этих солей к раствору белка происходит дегидратация белковых частиц и снятие заряда, при этом белок выпадает в осадок. Разные белки осаждаются

при различных концентрациях солей, что зависит от ионной силы осадителя и размера частиц белковой молекулы. Например, глобулин, имеющий большой молекулярный вес, по сравнению с альбумином, легче выпадает в осадок, чем альбумин.

1.1. ВЫСАЛИВАНИЕ БЕЛКОВ СЕРНОКИСЛЫМ АММОНИЕМ

В пробирку наливают 20 капель неразведенного яичного белка, добавляют равный объем насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и перемешивают. Получается полунасыщенный раствор, при котором выпадает осадок глобулинов. Через 5 мин осадок отфильтровывают. В фильтрате остается другой белок – альбумин. К фильтрату добавляют измельченный порошок $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до полного насыщения. Выпавший осадок отфильтровывают. Фильтрат проверяют на полноту осаждения, проделав биуретовую реакцию.

1.2. ВЫСАЛИВАНИЕ БЕЛКОВ ХЛОРИСТЫМ НАТРИЕМ И СЕРНОКИСЛЫМ МАГНИЕМ

В две пробирки наливают по 2-3 мл раствора белка. Прибавляют при перемешивании до полного насыщения раствора, т.е. до момента, когда часть кристаллов солей перестают растворяться, в одну пробирку тонко измельченного NaCl , а в другую – MgSO_4 , через несколько минут в обеих пробирках появляется осадок. Объясните, какой белок переходит в нерастворимое состояние в этих опытах?

Содержимое пробирок отфильтровывают и прибавляют к фильтрату несколько капель разбавленной CH_3COOH до слабокислой реакции. Что при этом происходит? Результаты опыта занести в таблицу 1.

Таблица 1

Высаливание белков			
Белок	Используемая соль	Степень насыщения	Образование осадка
Глобулин			
Альбумин			

2. ДИАЛИЗ БЕЛКОВ

Метод диализа основан на неспособности коллоидных частиц проникать через полупроницаемые мембраны, в то время как частицы кристаллоидов легко проходят через них. Обладая большим диаметром, частицы белка не способны к проникновению через мембраны. Диализ широко используется для очистки белков от низкомолекулярных примесей.

Ход работы

К 1 мл яичного белка добавляют 3-4 мл 5% раствора NaCl , этот раствор наливают во влажный диализный мешочек. Закрепляют верхний край мешочка двумя стеклянными палочками, скрепляют их концы резиновыми кольцами и помещают в стакан с дистиллированной водой на 30 мин, меняя воду каждые 10 мин. Через некоторое время содержимое мешочка мутнеет, а затем выпадает в осадок глобулин.

По окончании диализа с небольшими порциями диализата (наружная жидкость) и диализируемой жидкости проделывают реакции на хлориды, белок и убеждаются в том, что минеральные соли диффундировали во внешний сосуд, а белок остался в мешочке.

Для этого к 10 каплям диализата прибавляют 10 капель 10% раствора HNO_3 и 1-2 капли 1% раствора AgNO_3 . Выпадает осадок AgCl .

К 10 каплям диализата прибавляют 5 капель 10% раствора NaOH и 1-2 капли раствора CuSO_4 . Синее окрашивание свидетельствует об отсутствии белка в диализате.

Провести аналогичные реакции с 10 каплями диализируемой жидкости. Образующееся фиолетовое окрашивание свидетельствует о наличии белка, а вот осадка AgCl не выпадает, что свидетельствует об отсутствии хлоридов в диализируемой жидкости.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ ПРИРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

1. ВЫДЕЛЕНИЕ ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА

Яичный белок представляет собой смесь нескольких белков. Примерно 70% яичного белка составляет альбумин, который легко отделяется от глобулинов. При десятикратном разведении яичного белка дистиллированной водой глобулины выпадают в осадок, а альбумин остается в

растворе.

Ход работы

Чтобы отделить белок от желтка, осторожно проделывают отверстия в скорлупе яйца с двух концов и выливают белок в стакан емкостью 500 мл, затем в стакан добавляют 250 мл дистиллированной воды и содержимое тщательно перемешивают стеклянной палочкой с резиновым наконечником. Раствор переносят в мерный цилиндр, и объем доводят дистиллированной водой до 300 мл. Раствор оставляют на несколько минут при комнатной температуре для образования хлопьевидного осадка глобулинов.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ СЕМЯН ЗЛАКОВЫХ И БОБОВЫХ

2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ АЛЬБУМИНОВ

Альбумины – белки, которые растворяются в воде. К этим белкам относятся белки зародыша семян злаковых растений, белки семян двудольных растений и другие. Из водных растворов эти белки хорошо высаливаются, а при кипячении – денатурируют. Название белков обычно связано с ботаническим названием растения, в котором они локализованы. Альбумины у пшеницы и риса называются лейкозинами, гороха – легумелинами, а у клеверины – рицинами.

Ход работы

В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл воды, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38°C на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6-10 мин. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор альбуминов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании альбуминов в исследуемых объектах.

Если к 1 мл раствора альбуминов пшеничной или гороховой муки добавить по 4 мл насыщенного раствора NaCl то белки выпадут в осадок, вначале в виде мути медленно оседающей на дно пробирки. Результаты записать в журнал.

2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛОБУЛИНОВ

Глобулины (от лат. globulus – шарик), группа животных и растительных белков, наиболее широко распространенных в природе. Встречаются вместе с альбуминами. Относятся к глобулярным белкам; растворимы в слабых растворах нейтральных солей, разбавленных кислотах и щелочах; нерастворимы в воде (за исключением, например, миозина). Большинство глобулинов – простые белки. Глобулины кукурузы получили название маизин, фасоли – фазеолин, гороха – леугеин, арахиса – арахин, тыквы – кукурбитин. Глобулины составляют большую часть белков семян масличных культур.

Ход работы

В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл 10% раствора NaCl, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38°C на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6-10 мин. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор глобулинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании глобулинов в исследуемых объектах.

Если к 1 мл раствора глобулинов пшеничной или гороховой муки добавить по 1 мл насыщенного раствора NaCl то белки выпадут в осадок, вначале в виде мути медленно оседающей на дно пробирки. Результаты записать в журнал.

2.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОЛАМИНОВ

Проламины – белки, которые растворяются в 60-80% растворе этилового спирта. Простые запасные белки, содержащиеся лишь в семенах злаков: глиадин – в пшенице, ржи, зеин – в кукурузе, гордеин – в ячмене, авенин – в овсе, оризин – в рисе, кафирин – в сорго. В зерне глиадин и глутенин образуют клейковину, от содержания которой зависят качества пшеницы.

Ход работы

В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл 70% раствора этанола, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38°C на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6-10 мин. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор проламинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании проламинов в исследуемых объектах. Если к 2 мл раствора проламинов пшеничной или гороховой муки добавить по 2 мл воды, то белки выпадут в осадок, раствор мутнеет. Результаты записать в таблицу 17.

Таблица 17

Содержание простых белков в пшенице и горохе

Объекты исследования	Простые белки		
	Альбумины	Глобулины	Проламины
Мука пшеничная			
Горох			

3. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЯСА

С помощью высаливания мышечные белки могут быть разделены на следующие фракции, отличающиеся друг от друга по растворимости:

- а) миогенная (альбуминовая) водорастворимая, из которой находится ряд ферментных систем, выпадает в осадок при полунасыщении раствора серноокислым аммонием;
- б) глобулиновая, представляющая собой тоже смесь белков-ферментов, выпадает в осадок при полном насыщении раствора серноокислым аммонием;
- в) миозин, основной сократительный белок мышечных волокон глобулиновой природы, осаждается при насыщении раствора хлористым натрием;
- г) актин, белок мышечных фибрилл;
- д) коллаген, белок соединительной ткани мышц;
- е) строма, белки клеточных структур.

3.1. ЭКСТРАКЦИЯ АЛЬБУМИНОВ

Ход работы

2 г мышечной кашицы помещают в стаканчик или большую широкую пробирку, заливают 10 мл дистиллированной воды и в течение 15 мин постоянно перемешивают; при этом в раствор переходят альбумины.

Жидкость отделяют от мышечной кашицы через два слоя марли, положенной на воронку; оставшуюся на марле кашицу отжимают руками, помещают ее в стаканчик и заливают 10 мл 10% раствора NH_4Cl для извлечения глобулинов. Фильтрат делят на две части и проводят реакции, доказывающие, что в водном экстракте находится альбуминовая фракция белков мышечной ткани. В одной части фильтрата исследуют с помощью универсальной индикаторной бумажки реакцию среды. Если фильтрат имеет кислую реакцию, то его нагревают в пробирке до кипения и наблюдают образование осадка белка.

Если же фильтрат имеет нейтральную или слабощелочную реакцию, то его предварительно слабо подкисляют 1% CH_3COOH , прибавляя ее по каплям, перемешивая после каждой капли и проверяя, каждый раз реакцию по универсальной индикаторной бумаге, и лишь затем нагревают до кипения. К оставшейся половине фильтрата добавляют порошок $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения, при этом выпадает осадок альбуминов.

3.2. ЭКСТРАКЦИЯ ГЛОБУЛИНОВ

Экстракцию глобулинов NH_4Cl производят в течение 15 мин при постоянном перемешивании. Солевую пробу центрифугируют. В осадке остаются белки стромы и соединительной ткани.

Центрифугат (жидкая часть) делят на 4 части и проводят реакции, доказывающие присутствие глобулинов в солевом экстракте.

Нагревают одну часть фильтрата, образуется осадок в результате денатурации глобулинов.

К другой части фильтрата добавляют равный объем насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (полунасыщение), выпадает осадок глобулинов.

К третьей части фильтрата приливают 10 мл дистиллированной воды, образуется хлопьевидный осадок глобулинов; содержимое пробирки центрифугируют; осадок делят на 2 части и каждую взбалтывают в 2 мл воды.

К одной части жидкости с осадком прибавляют 1% раствор HCl до растворения осадка, затем нейтрализуют 1% раствором NaOH , добавляя его по каплям до выпадения осадка глобулинов.

К другой части жидкости с осадком добавляют 1% раствор NaOH до растворения осадка, затем нейтрализуют 1% раствором HCl до выпадения осадка глобулинов.

3.3. ОСАЖДЕНИЕ МИОЗИНА ИЗ ГЛОБУЛИНОВОЙ ФРАКЦИИ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ

К оставшейся четвертой части фильтрата, содержащей глобулины, добавляют порошок NaCl до полного насыщения; при этом выпадает осадок миозина.

4. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ СОЕОВОГО МЯСА

Из соевого мяса можно выделить растительный альбумин.

Ход работы

1,5 г сухого соевого мяса растирают в ступке, переносят в стакан, смешивают с 5 мл воды и оставляют смесь на 15-20 мин при частом встряхивании, после чего переносят ее в воронку на большой складчатый фильтр. Довольно быстро получают раствор, содержащего растительный альбумин.

5. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МОЛОКА

Молоко и молочные продукты являются важнейшими продуктами питания, которые рекомендуется употреблять ежедневно, особенно детям дошкольного возраста, школьникам и подросткам. Молоко и молочные продукты хорошо сбалансированы и легко усваиваются организмом, богаты высококачественным полноценным белком, содержат необходимые для жизнедеятельности жирные кислоты, иммуноглобулины, витамины и микроэлементы.

Ход работы

К 50 мл натурального молока добавляют равный объем воды и затем по каплям при помешивании 0,2-0,5 мл конц. CH_3COOH до образования хлопьев. Через 5-10 мин смесь фильтруют через полотно. Фильтрация идет быстро.

Остаток на фильтре, имеющий консистенцию жидкой сметаны, состоит главным образом из казеина. Для получения раствора казеина к этому остатку (или к 5-6 г творога, растертого в ступке с 10-15 мл воды) добавляют 1 мл 30% раствора NaOH . Щелочную смесь слегка растирают в ступке, приливая воду до общего объема 25-30 мл, и фильтруют через складчатый бумажный фильтр, предварительно хорошо смоченный водой.

6. ВЫДЕЛЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА ИЗ ПЛАЗМЫ

Содержание фибриногена в плазме 2-4 г/л, его молекулярная масса около 330000. Молекулы фибриногена имеют вытянутую форму с соотношением осей 20:1, такая форма молекул обуславливает высокую вязкость растворов фибриногена. В процессе свертывания крови фибриноген превращается в фибрин. В отличие от фибриногена фибрин не растворяется в воде и имеет значительно большую молекулярную массу.

При добавлении к плазме крови хлорида натрия до концентрации 10% в осадок выпадает практически только фибриноген, а все другие белки плазмы остаются в растворе.

Ход работы

В центрифужную пробирку наливают 2 мл плазмы крови. Взвешивают 200 мг сухого NaCl , высыпают в пробирку с плазмой и перемешивают до полного растворения. Наблюдают образование осадка. Центрифужную пробирку с раствором уравнивают с центрифужной пробиркой, в которую наливают дистиллированную воду. Пробирку центрифугируют 15 мин при 3500 об/мин. Супернатант сливают в стакан. Осадок представляет собой плотную массу с хорошо выраженной волокнистой структурой.

7. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ КЕРАТИНОВ

Склеропротеины, альбуминоиды, протеиноиды – простые белки животного происхождения; нерастворимы в воде и разбавленных растворах солей, кислот и щелочей. Наиболее важные склеропротеины – коллаген, кератин и фиброин шёлка. Все они имеют фибриллярную структуру. Находясь в организмах в твёрдом или пластическом состоянии, склеропротеины обеспечивают механическую прочность органов, защищают от воздействий внешней среды, а также образуют опорные сетчатые структуры внутри клеток и мембран, влияя на проницаемость последних. В природном состоянии склеропротеины (за исключением эластина) не подвергаются гидролизу протеолитическими ферментами и поэтому не имеют питательной ценности.

1. ДЕЙСТВИЕ ВОДЫ И РАЗБАВЛЕННЫХ КИСЛОТ

В две пробирки помещают по 0,2 г роговых стружек или волос. В первую пробирку наливают 5-7 мл холодной воды, во вторую – столько же 2% раствора H_2SO_4 . Наблюдают, что растворится. Содержимое пробирок кипятят; растворение не происходит. Наблюдается некоторое размягчение роговых стружек в горячей воде, которое при охлаждении и высушивании исчезает.

2. ДЕЙСТВИЕ ЩЕЛОЧИ

В пробирку помещают 0,2 г роговых стружек или волоса, заливают 10% раствором NaOH. При нагревании происходит частичный гидролиз кератина, в результате чего стружки растворяются и в растворе можно обнаружить аминокислоты.

3. ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА АМИНОКИСЛОТЫ В СОСТАВЕ КЕРАТИНА

А. 2 мл щелочного раствора кератина помещают в пробирку, добавляют 0,5 мл раствора $(CH_3COO)_2Pb$, нагревают. Появляется резко положительная реакция, свидетельствующая о том, что в кератине много аминокислот, содержащих серу;

Б. При нагревании роговых стружек с конц. HNO_3 появляется желтое окрашивание; это указывает на наличие в кератине аминокислот с бензольным ядром;

В. При нагревании с реактивом Миллона роговые стружки приобретают красноватое окрашивание, что указывает на содержание в кератине тирозина.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

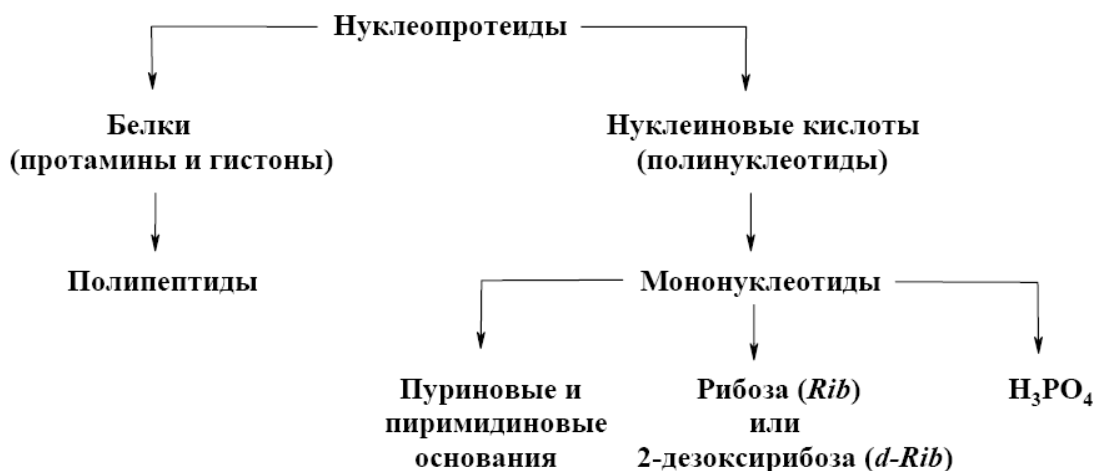
1. Общая характеристика метода хроматографии, и ее роль в биохимии.
2. Назовите основные виды хроматографии.
3. Общая характеристика принципа хроматографии.
4. Назовите разновидности метода хроматографии на бумаге, и чем они отличаются.
5. Как рассчитывается коэффициент подвижности (R_f) и что он характеризует?
6. Что такое «идентификация аминокислот» и как её проводят.
7. Способы гомогенизации биологического материала.
8. Методы определения гомогенности белковых препаратов.
9. Методы гидролиза белков.
10. Как осуществляется экстракция белков?
11. Методы фракционирования белков.
12. Методы очистки белков.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить знания о строении и биологической роли нуклеиновых кислот.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Дезоксирибонуклеопротеиды являются главной составной частью клеточных ядер. Лучше всего получать нуклеопротеиды из тканей, богатых клеточными ядрами (лейкоциты, спермии, лимфатические узлы, селезенка, печень и др.). Специфическими реакциями последовательно открывают: во-первых, белковую часть - полипептиды и, во-вторых, простетическую группу - нуклеиновые кислоты, состоящие из пуриновых и пиримидиновых оснований, пентоз и фосфорной кислоты.



1. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

Дрожжи богаты нуклеопротеидами рибозного типа. Нуклеопротеид можно извлечь из разрушенных клеток дрожжей при щелочной реакции раствора и осадить подкислением.

Ход работы

1 г дрожжей помещают в ступку, добавляют 2-3 капли эфира и 2-3 капли воды. Вносят щепотку песка и тщательно растирают. К гомогенату приливают 6 мл 0,4% едкого натрия и продолжают растирать в течение 15 мин. Содержимое ступки переносят в центрифужный стакан, центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Центрифугат сливают в стакан и постоянно помешивая приливают 2 мл 10% раствор уксусной кислоты до осаждения нуклеопротеида. Осадок нуклеопротеида собирают путем повторного центрифугирования и используют для качественной реакции.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ

К составным частям нуклеопротеидов относят полипептиды, углеводный компонент, гетероциклические основания и фосфорную кислоту.

Ход работы

2.1. ПОЛИПЕПТИДЫ ОТКРЫВАЮТ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИЕЙ

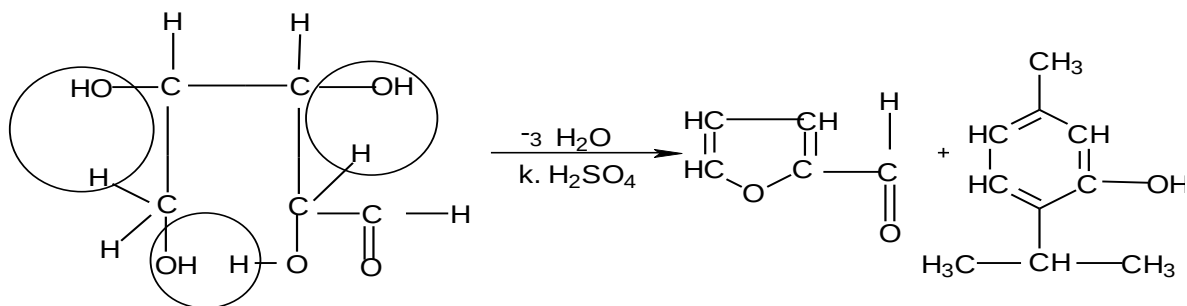
К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 10 капель гидроксид натрия и 2 капли раствора сульфата меди. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

2.2. УГЛЕВОДЫ (РИБОЗУ И ДЕЗОКСИРИБОЗУ) ОПРЕДЕЛЯЮТ ФЕЛИНГОВОЙ ПРОБОЙ

К 5 каплям гидролизата добавляют по 5 капель Фелинга I и Фелинга II, тщательно перемешивают и нагревают пробирку до кипения. Отмечают образование осадка и его цвет.

2.3. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ МОЛИША НА ПЕНТОЗУ

При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз – оксиметилфурфурол, которые дают с тимолом продукт конденсации красного цвета:



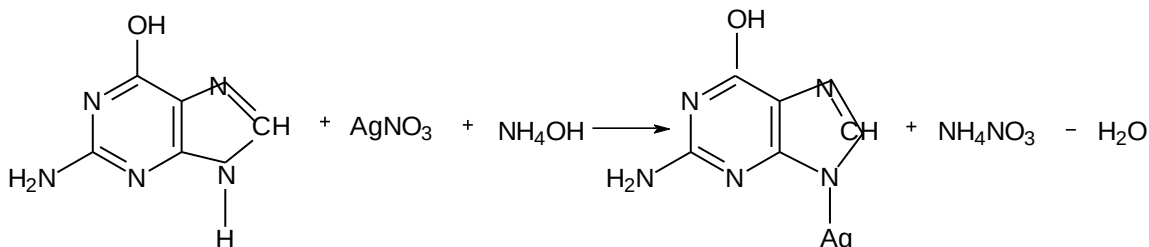
К 10 каплям гидролизата дрожжей прибавляют 3 капли раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно!) - 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки появляется красное окрашивание.

2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель молибденового реактива, кипятят на пламени горелки. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. Пробирку охлаждают под струей воды и наблюдают выпадение осадка фосфорномолибденовокислого аммония.

2.5. ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ ОСНОВАНИЯ ОБНАРУЖИВАЮТ ПО ИХ РЕАКЦИИ С АММИАЧНЫМ РАСТВОРОМ ОКСИДА СЕРЕБРА

К 2 мл гидролизата приливают по каплям концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции по лакмусу и добавляют равный объем аммиачного раствора оксида серебра. Выпадает осадок.



3. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ

Для выделения растительного ДНК можно взять зелёный горошек или лук.

Ход работы

Положите в гомогенизатор около 100 мл этого продукта, добавьте 1/8 чайной ложки соли и 200 мл холодной воды. Гомогенизировать в течение 15 секунд. Профильтровать смесь через кусок капрона. В полученную мякоть добавьте 1/6 от её количества жидкого моющего средства и хорошо размешайте. Оставьте на 5-10 минут. Разлейте жидкость по пробиркам, чтобы в каждой было заполнено не больше трети объёма.

Добавьте в каждую пробирку несколько капель сока, выжатого из ананаса, либо раствора для контактных линз и осторожно встряхните, переворачивая и наклоняя пробирку (во избежание разлома ДНК).

Наклоните пробирку и медленно влейте в неё немного этилового спирта, чтобы он образовал слой поверх гороховой смеси. Лейте, пока спирта и смеси не окажется поровну. ДНК всплывёт наверх в виде хлопьев.

Деревянной палочкой выловите их и рассмотрите под микроскопом.

4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Метод определения суммарного количества нуклеиновых кислот основан на определении разностей оптической плотности (метод Δ), применяемый для уменьшения влияния различных примесей в исследуемых экстрактах.

При использовании этого метода в основу расчетов берут не абсолютные величины оптических плотностей, а разность между оптической плотностью при 270 мкм и оптической плотностью при 290 мкм ($D_{270} - D_{290} = \Delta D_{270}$). Предварительно на гидролизатах стандартных препаратов дрожжевой РНК и тимусовой ДНК было найдено, что ΔD_{270} равна 0,19.

Метод состоит из следующих операций: экстракция нуклеиновых кислот хлорной кислотой, центрифугирование экстракта, измерение на спектрофотометре в ультрафиолете.

Ход работы

Навеску ткани (5–500 мг) заливают точно отмеренным количеством (5–10 мл) 0,5 н. хлорной кислоты (HClO_4) и нагревают в кипящей водяной бане 20 мин. После охлаждения и центрифугирования надосадочную жидкость используют для измерения поглощения в ультрафиолете на спектрофотометре СФ-4 непосредственно (в случае малых количеств определяемого вещества) или после соответствующего разведения в 0,5 н. хлорной кислоты.

Измерение на спектрофотометре производят при 270 мкм и 290 мкм в отношении контрольного раствора (чистая 0,5 н. хлорная кислота). Если измерение производили в односантиметровых кварцевых кюветах, то расчет производят следующим образом: разность между оптической плотностью при 270 мкм и оптической плотностью при 290 мкм делят на 0,19 и получают количество микрограммов нуклеинового фосфора в 1 мл испытуемого раствора.

Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество нуклеиновой кислоты пользуются средним пересчетным коэффициентом 10,3.

Метод дает возможность определять содержание нуклеиновой кислоты также в том случае, когда в изучаемом материале содержится только РНК или только ДНК.

Для пересчета с содержания фосфора на содержание РНК пользуются коэффициентом 10,5, а на содержание ДНК—10,1, исходя из теоретического содержания фосфора – 9,5 в РНК и 9,9 в ДНК.

Рекомендуется производить дополнительное контрольное измерение при 260 мкм. Оптическая плотность при 260 мкм должна быть приблизительно равна оптической плотности при 270 мкм (в пределах $\pm 15\%$). Отклонение от последней больше чем на $\pm 15\%$ указывает на наличие большого количества мешающих примесей нуклеиновой природы. В этом случае иногда помогает предварительная отмывка навески материала на холоду 0,2 н. раствора хлорной кислоты.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое нуклеопротейды, из каких компонентов они состоят?
2. АТФ, УДФ, ТМФ, ГТФ, ЦДФ строение и функции.
3. ДНК, биологическая роль, локализация в клетке. Биологическое значение двуспирального строения ДНК. Принцип комплиментарности ДНК и РНК и его биологическая роль.
4. Пуриновые и пиримидиновые основания.
5. РНК, ее виды, биологическая роль, локализация в клетке.
6. Углеводные компоненты нуклеиновых кислот.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. ВИТАМИНЫ

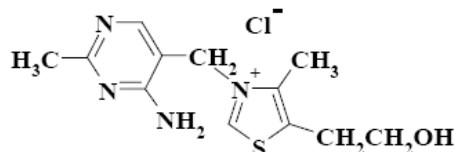
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить знания о строении и биологической роли водорастворимых витаминов. Научиться определять присутствие витаминов в биологических материалах при помощи качественных цветных реакций.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Витамины - незаменимые для жизни органические вещества разнообразной структуры, являющиеся биологическими катализаторами химических реакций или реагентами фотохимических процессов, протекающих в клетке и участвующие в обмене веществ, как правило, в соединении с белками в составе ферментных систем.

7.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИАМИНА (ВИТАМИН В₁)

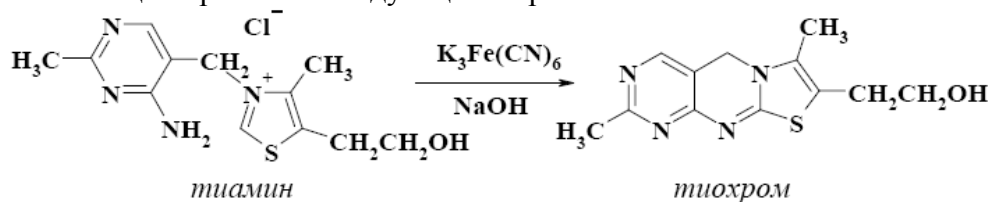
Тиамин (витамин В₁) - водорастворимый витамин. Наряду с аминогруппой витамин В₁ содержит атом серы, и поэтому он получил название тиамин. В химической структуре его содержится два кольца: пиримидиновое и тиазоловое, соединенные метиленовой (-CH₂) группой.



При недостаточности тиамина развивается тяжелое заболевание - бери-бери. Это заболевание представляет собой комбинированный авитаминоз, при котором организм испытывает потребность и в других витаминах - рибофлавине, пиридоксине, витаминах РР, С и др. Тиамин содержится в пшеничном хлебе, сое, горохе, а также в продуктах животного происхождения - печени, почках, мозге. Суточная потребность от 1,3 до 1,9 мг.

7.1.1. РЕАКЦИЯ ОКИСЛЕНИЯ

Под действием железосинеродистого калия тиамин окисляется с образованием желтого пигмента тioxрома. Реакция протекает следующим образом:



Ход работы

К 1-2 мг порошка тиамин добавляют 1-2 капли 5% раствора железосинеродистого калия, 10 капель едкого натра (10% раствор) и перемешивают. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет, вследствие превращения тиамин в тиохром. При освещении ультрафиолетовыми лучами тиохрома видна голубая флуоресценция.

7.1.2. ДИАЗОРЕАКЦИЯ

В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

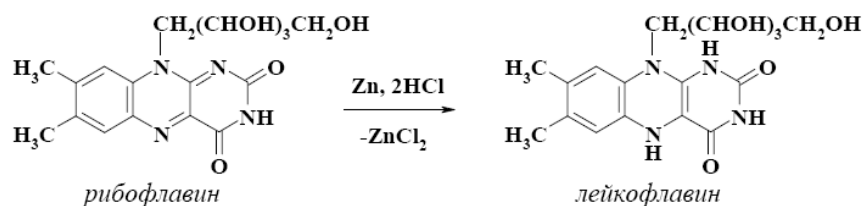
Ход работы

Диазореактив готовят, сливая в пробирку по 5 капель 1 %-го раствора сульфаниловой кислоты и 5 %-го раствора нитрита натрия. В эту же пробирку добавляют на кончике скальпеля порошок тиамин и затем по стенке наклоненной пробирки осторожно приливают 5–7 капель 10 %-го раствора карбоната натрия. На границе жидкостей появляется кольцо оранжево-красного цвета.

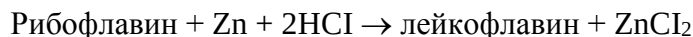
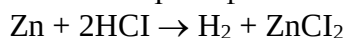
7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОФЛАВИНА (ВИТАМИН В₂)

Рибофлавин (витамин В₂) - водорастворимый витамин. В основе его строения лежит система изоаллоксазина, в боковой цепи - пятиатомный спирт рибитол. Биологическая активность рибофлавина определяется его окислительно-восстановительными свойствами. Рибофлавин, присоединяя два атома водорода, обратимо восстанавливается, переходя в бесцветное соединение - лейкофлавин. Из пищевых продуктов рибофлавином богаты: хлеб из муки грубого помола, семена злаков, яйца, молоко, мясо, свежие фрукты, овощи. Суточная потребность 2-4 мг.

При добавлении к раствору рибофлавина концентрированной соляной кислоты и металлического цинка происходит бурное выделение водорода, и в конце реакции желтая окраска жидкости меняется. Реакция обусловлена восстановлением рибофлавина сначала в лейкофлавин.



По мере насыщения раствора водородом окислительно-восстановительный потенциал смеси постепенно снижается и происходит восстановление рибофлавина и метиленового синего. Восстановление всего объема метиленового синего происходит раньше, чем восстановление значительной части внесенного в пробирку рибофлавина, поэтому цвет жидкости переходит последовательно в зеленый, желто-зеленый, желтый, бледно-желтый или розовый и, наконец, жидкость обесцвечивается за счет восстановления рибофлавина в лейкосоединение.



Розовую жидкость сливают в другую пробирку и наблюдают за изменением окраски. Водород в жидкость больше не поступает, а уже растворенный в ней уходит в воздух и переносится через рибофлавин и метиленовый синий на кислород воздуха.

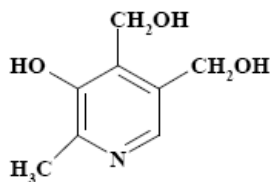
Ход работы

В пробирку вносят 4-6 капель воды, 1 каплю взвеси рибофлавина и по каплям метиленовой сини - до синего или зеленоватого окрашивания раствора. Внести в пробирку кусочек цинка и 2-3 капли концентрированной соляной кислоты (начинается выделение пузырьков водорода). Отметить окраску через 10-15 минут.

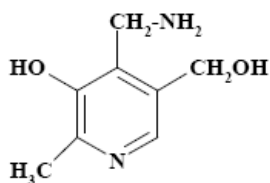
7.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРИДОКСИНА (ВИТАМИН В₆)

Пиридоксин - витамин В₆. Пиридоксаль (витамин В₆) - альдегидное производное пиридоксина. В виде фосфорного эфира - пиридоксальфосфата - входит в состав ряда ферментов, катализирующих реакции переаминирования и декарбоксилирования α-аминокислот. Термин "витамин В₆" применяется ко всем трем производным 3-оксипиридоксина, которые обладают

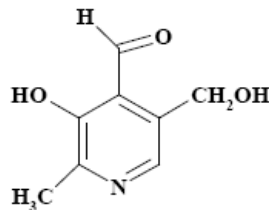
витаминной активностью: пиридоксину, пиридоксалу и пиридоксамину.



(пиридоксин)



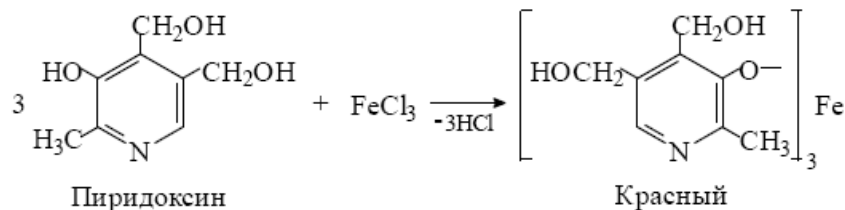
(пиридоксамин)



(пиридоксаль)

Витамин В₆ широко распространен в продуктах растительного и животного происхождения. Источником этого витамина для человека могут быть: горох, фасоль, хлеб, картофель и мясо.

При добавлении к раствору витамин В₆ раствора хлорного железа жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа.



Ход работы

К 5 каплям раствора витамин В₆ прибавляют 1 каплю 5% раствора хлорного железа. Встряхивают, жидкость приобретает красную окраску.

7.4. РЕАКЦИЯ НА ЦИАНКОБАЛАМИН (ВИТАМИН В₁₂)

При действии сильного окислителя на витамин В₁₂ происходит его разрушение. Витамин В₁₂ — это единственный витамин, в молекуле которого содержится кобальт (4,5%). Его можно обнаружить после минерализации раствора витамина и последующей обработки тиомочевинной.

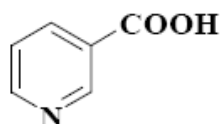
Витамин В₁₂ находится главным образом в продуктах животного происхождения. Наиболее богата им печень рогатого скота и цыплят.

Ход работы

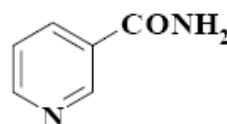
Половину содержимого витамина В₁₂ из ампулы переносят в фарфоровый тигель, выпаривают досуха и прокалывают на небольшом огне. После охлаждения доливают 1 мл концентрированной азотной кислоты и 3 мл концентрированной соляной кислоты и кипятят в вытяжном шкафу до полного испарения жидкости и охлаждают. Растворяют осадок в капле воды, прибавляют 1 каплю ацетонового раствора α-нитрозо-β-нафтола и каплями раствор гидрофосфата натрия до слабощелочной реакции (по лакмусу). При наличии ионов кобальта появляется бурое-красное окрашивание, если ионов кобальта нет, окрашивание - желто-зеленое.

7.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИН РР)

Никотиновая кислота (витамин РР) - в виде амида никотиновая кислота входит в состав коферментов дегидрогеназ - НАД и НАДФ. Содержится в продуктах растительного и животного происхождения (молоко, мясо, рыба, дрожжи). Никотиновая кислота может синтезироваться из триптофанов. Суточная потребность человека в никотиновой кислоте - 15-20 мг.



никотиновая кислота



никотинамид

При нагревании никотиновой кислоты с раствором уксуснокислой меди образуется синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

7.5.1. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ С УКСУСНОКИСЛОЙ МЕДЬЮ

Реакция основана на том, что никотиновая кислота, имея в своей молекуле карбоксильную группу, образует соли. Медная соль никотиновой кислоты является труднорастворимым веществом голубого или синего цвета. Свинцовая соль имеет белый цвет.

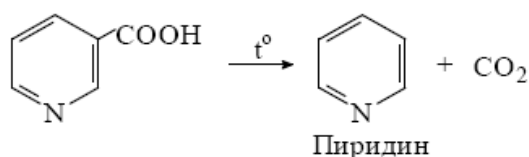
Ход работы

5—10 мг никотиновой кислоты растворяют при нагревании в 10—20 каплях 10% раствора уксусной кислоты.

К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем раствора уксуснокислой меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает осадок синего цвета медной соли никотиновой кислоты.

7.5.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ПИРИДИНОВОГО КОЛЬЦА В МОЛЕКУЛЕ ВИТАМИНА РР

Никотиновая кислота является производным пиридина. Реакция основана на разрушении никотиновой кислоты при нагревании ее с содой с образованием свободного пиридина, имеющего своеобразный запах.



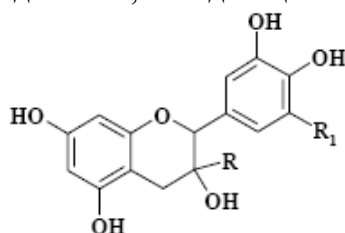
Ход работы

В пробирку помещают немного соды в порошке (на кончике стеклянной лопаточки) и добавляют равное количество никотиновой кислоты.

Нагревают смесь в пламени горелки в вытяжном шкафу при включенной тяге. Устанавливают выделение пиридина по появлению характерного запаха.

7.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА (ВИТАМИН Р)

Известно несколько соединений, обладающих Р-витаминной активностью.



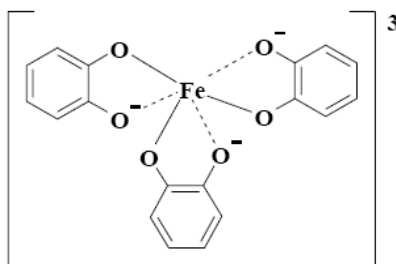
R и R₁ – H или OH

Витамин Р (цитрин)

В основе их лежит скелет флавонола. Рутин - кристаллическое вещество желто-оранжевой окраски. Содержится во всех продуктах, в которых обнаруживается витамин С. Много его в чае, фруктах, ягодах (бруснике, клюкве, сливе, винограде). Рутин участвует в окислительно-восстановительных процессах. Его присутствие усиливает окислительно-восстановительный эффект витамина С.

7.6.1. РЕАКЦИЯ С ХЛОРИДОМ ЖЕЛЕЗА

Хлорид железа образует с рутином комплексное соединение, окрашенное в изумрудно-зеленый цвет.



Ход работы

1) К 12 мл насыщенного водного раствора рутина прибавляют несколько капель 1% раствора хлорида железа. Возникает зеленое окрашивание.

2) Налейте в пробирку 1 мл чайной заварки (в ней содержится витамин Р) и добавьте к ней 5

капель водного раствора хлорного железа FeCl_3 . Осторожно встряхните пробирку и разбавьте полученный раствор, добавив 2 мл дистиллированной воды. Как изменяется окраска раствора?

7.6.2. РЕАКЦИЯ С СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

Концентрированная серная кислота образует с флавонами и флавоноидами оксониевые соли, растворы которых имеют ярко-желтую окраску.

Ход работы

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

7.6.3. РЕАКЦИЯ С РЕАКТИВОМ ФЕЛИНГА

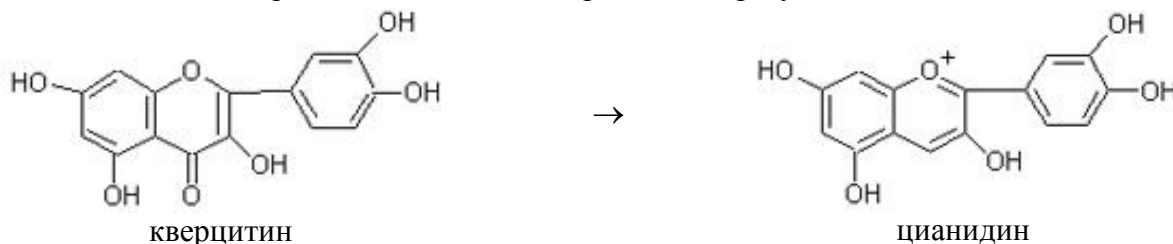
При кислотном гидролизе рутина отщепляется молекула рутинозы, которая распадается на глюкозу и рамнозу, обладающих восстанавливающими свойствами.

Ход работы

К 0,5 г рутина добавляют 5 мл 0,5 % раствора соляной кислоты. Смесь доводят до кипения, кипятят в течение 1 мин, затем отфильтровывают. К полученному фильтрату приливают 3 мл 10 % раствора едкого натра и 3 мл Фелинговой жидкости, нагревают до кипения. Выпадает красный осадок оксида меди.

7.6.4. РЕАКЦИЯ С МАГНИЕМ И СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

Флавоноиды реагируют с магнием и соляной кислотой, легко восстанавливаются, давая окрашенные соединения. При восстановлении кверцетина образуется цианидин.

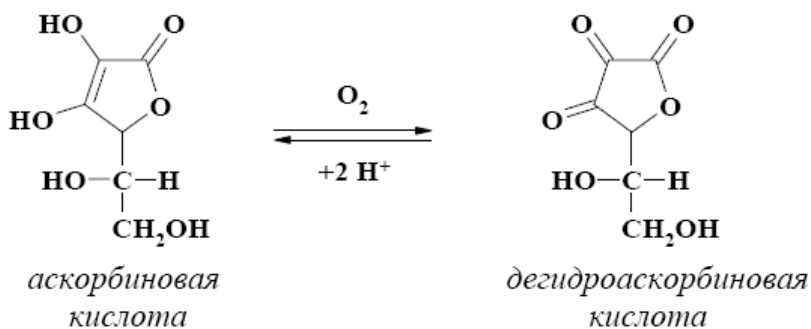


К 1 мл насыщенного спиртового раствора кверцетина на кончике скальпеля добавляют порошок металлического магния и 3-4 капли концентрированной соляной кислоты. Жидкость сначала окрашивается в розовый цвет, при стоянии интенсивность окраски усиливается.

7.7. КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Витамин С – водорастворимое соединение, содержащее шесть атомов углерода. Представляет собой лактон.

При недостатке витамина С в пище у человека развивается цинга. При цинге повышается хрупкость сосудов, возникают кровоизлияния, повреждаются кости особенно зубы. Суточная потребность в аскорбиновой кислоте взрослого человека при средних затратах физического труда — 50 мг. Богаты витамином С лимоны, черная смородина, шиповник, хвоя, из животных продуктов — печень.

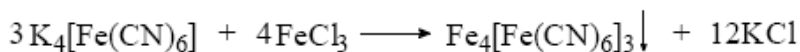
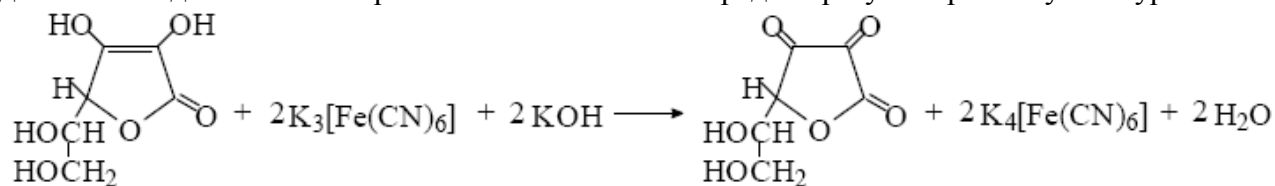


В основе качественных реакций и количественных методов определения аскорбиновой кислоты лежит окислительно-восстановительный процесс: аскорбиновая кислота окисляется дегидроаскорбиновой, а другое вещество восстанавливается.

7.7.1. РЕАКЦИЯ С ЖЕЛЕЗОСИНЕРОДИСТЫМ КАЛИЕМ

Реакция основана на том, что аскорбиновая кислота, окисляясь в дегидроаскорбиновую в

щелочной среде, может восстанавливать железосинеродистый калий до железистосинеродистого, последний в результате взаимодействия с хлорным железом в кислой среде образует берлинскую лазурь.



Синий

Ход работы

В пробирку отмеривают 10 капель вытяжки из шиповника, добавляют 2 капли 10% раствора гидроксида натрия, 2 капли 5% раствора железосинеродистого калия и перемешивают.

К содержимому пробирки добавляют 6 капель 10% раствора соляной кислоты и 2 капли 1% раствора хлорного железа. Выпадает синий осадок берлинской лазури, свидетельствующий о присутствии аскорбиновой кислоты в вытяжке из шиповника.

Для контроля проводят ту же реакцию, беря вместо вытяжки из шиповника дистиллированную воду. Появляется бурое окрашивание жидкости, обусловленное образованием железосинеродистой соли окиси железа.

7.7.2. РЕАКЦИЯ С МЕТИЛЕНОВОЙ СИНЬЮ

Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты и восстановлением метиленовой сини в бесцветную лейкоформу.

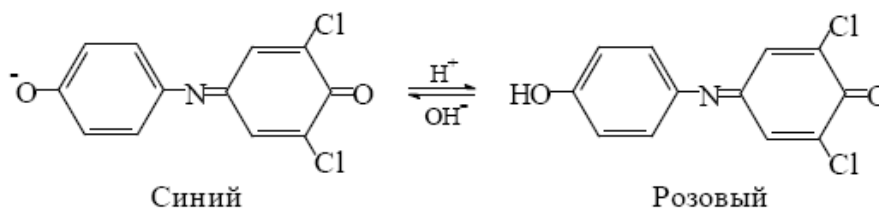
Ход работы

В пробирку наливают 2 капли 10% раствора метиленовой сини, 2 капли 10% раствора соды, 10 капель вытяжки из шиповника и нагревают. Жидкость обесцвечивается.

Для контроля проводят ту же реакцию, беря вместо вытяжки из шиповника дистиллированную воду. Обесцвечивания жидкости не происходит.

7.7.3. РЕАКЦИЯ С 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛОМ

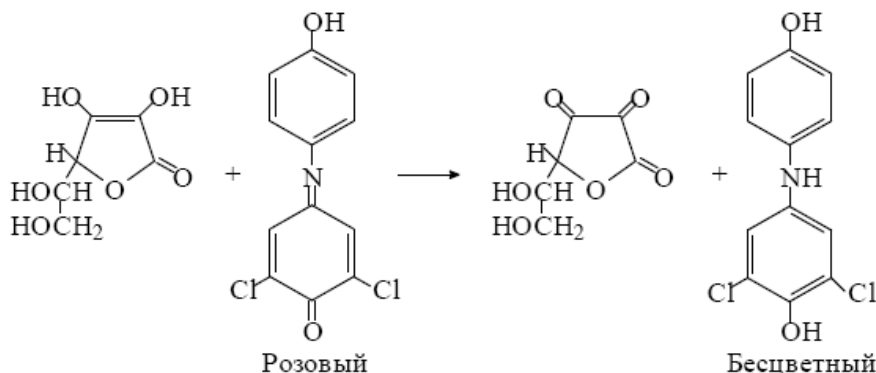
Титрование аскорбиновой кислоты 6-дихлорфенолиндофенолом (метод Тильманса) осуществляют в кислой среде, в которой 2,6-дихлорфенолиндофенол имеет розовую окраску, а в щелочной среде – синюю:



Синий

Розовый

За счет окисления аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую происходит восстановление индикатора 2,6-дихлорфенолиндофенола в бесцветное лейкосоединение.



Розовый

Бесцветный

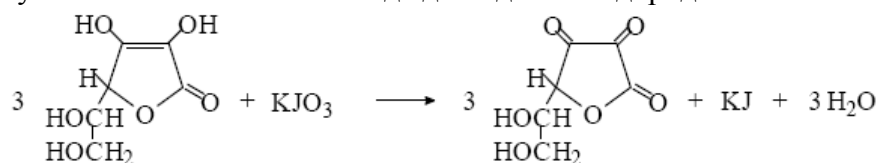
Ход работы

В две пробирки наливают по 10 капель 0,02% раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. В одну

из пробирок добавляют 10 капель вытяжки из шиповника, в другую 10 капель воды. Жидкость в пробирке с вытяжкой шиповника, обесцвечивается.

7.7.4. РЕАКЦИЯ С РАСТВОРОМ ЛЮГОЛЯ

При взаимодействии аскорбиновой кислоты с раствором Люголя происходит обесцвечивание в результате восстановления йода до йодисто-водородной кислоты.

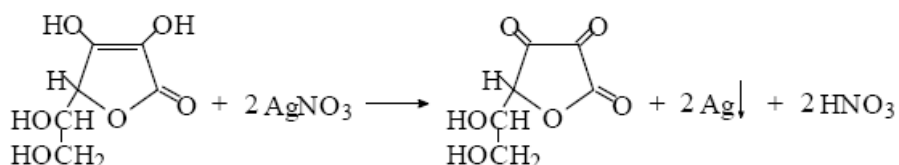


Ход работы

В 2 пробирки внести по 5 капель дистиллированной воды и по 2 капли раствора Люголя. В 1-ю пробирку добавить 10 капель сока картофеля, во 2-ю 10 капель раствора аскорбиновой кислоты. Что наблюдается?

7.7.5. СЕРЕБРЯНАЯ ПРОБА НА ВИТАМИН С

При добавлении витамина С к нитрату серебра выпадает в осадок в виде металлического серебра:



Ход работы

В две пробирки (опыт и контроль) вносят по 5 капель 1%-го раствора аскорбиновой кислоты; затем в опытную пробирку добавляют 1-2 капли 1%-го раствора азотно-кислого серебра, а в контрольную – 1-2 капли дистиллированной воды. В опытной пробе наблюдается появление темного осадка металлического серебра.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

№ п/п	Материал, содержащий витамин	Название витамина	Употребляемые реактивы и материалы	Наблюдаемые окраски жидкости, осадка, появление запаха, обесцвечивание жидкости	На чём основана реакция

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Витамины. История их открытия. Витамеры.
2. Номенклатура и классификация витаминов.
3. Витамин В₁. Химическая природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
4. Витамин В₂. Строение и участие его в окислительно-восстановительных реакциях. Содержание в продуктах, суточная потребность.
5. Витамин В₆. Формы и значения. Содержание в продуктах, суточная потребность.
6. Витамин В₁₂. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
7. Витамин С. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
8. м Р. Взаимообусловленность действия вит. С и Р. Содержание в продуктах, суточная потребность.
9. Витамин Н. Его строение и роль. Содержание в продуктах, суточная потребность.
10. Витамин РР. Содержание в продуктах, суточная потребность.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7. ФЕРМЕНТЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Выделить ферменты разных классов из различных биологических объектов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Ферменты — это белки, обладающие каталитической активностью. В клетках и жидкостях организма они выполняют роль биологических катализаторов, осуществляя свое действие путем снижения энергии активации.

Источником для получения ферментов служат различные биологические объекты: свежие и свежемороженые животные и растительные ткани, семена растений, биологические жидкости, микроорганизмы. Извлекают ферменты из этих объектов посредством экстрагирования водой, водными растворами глицерина, нейтральных солей, буферными растворами при одновременном механическом разрушении клеточных структур.

10.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ПО МЕТОДУ ВОЛЬГЕМУТА

Метод заключается в том, что слюну разводят в определенной последовательности, после чего одно и то же количество крахмала приливают, находят наименьшее содержание фермента, которое полностью расщепляет все количество добавленного крахмала, затем производят расчет на 1 мл слюны.

Амилазная активность слюны выражается количеством 1% раствора крахмала в мл, которое может расщепить 1 мл слюны при температуре 37 °С в течение 30 мин.

Ход работы

В 10 пронумерованных пробирок наливают по 1 мл воды. В 1 добавляют 1 мл слюны, разведенной в 10 раз, перемешивают несколько раз, втягивая и выпуская жидкость из пипетки. Набирают в пипетку 1 мл смеси из одной пробирки, переносят ее во 2-ю; из 2-й таким же образом в 3-ю и т.д. до 10 пробирки, из последней пробирки 1 мл смеси выливают. В каждой последующей пробирке, таким образом, содержание фермента вдвое меньше, чем в предыдущей.

Во все 10 пробирок приливают по 1 мл воды и по 2 мл 0,1% раствора крахмала. Перемешивают, встряхивают пробирки и помещают в термостат при температуре 37 °С на 30 мин. Затем пробирки вынимают, охлаждают, во все добавляют по 1 капле раствора йода, перемешивают и отмечают окраску.

Данные занести в таблицу.

Таблица Определение активности амилазы

№ пробирки	Разведение слюны	Окрашивание йодом	Активность амилазы
1	1:10		
2	1:20		
3	1:40		
4	1:80		
5	1:160		
6	1:320		
7	1:640		
8	1:1280		
9	1:2560		
10	1:5120		

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Активность α -амилазы выражают количеством миллилитров 0,1% раствора крахмала, которое может расщепить 1 мл неразведенной слюны при 37 °С в течение 30 минут до стадии эритродекстрина. Рассчитывают количество слюны в последней пробирке с желтоватой окраской.

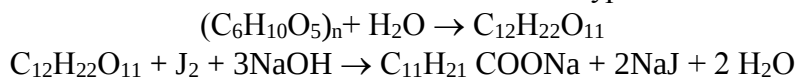
Например, если с красно-бурой окраской жидкость была отмечена в 5 пробирке, где слюна разбавлена в 160 раз и куда было прибавлено 2 мл 0,1% раствора крахмала, то 1 мл неразбавленной слюны расщепил бы в 160 раз больше 0,1% раствора крахмала: 1/160 мл слюны расщепляет 2 мл — 0,1% раствора крахмала, 1 мл слюны расщепляет x мл 0,1% раствора крахмала,

т. е. $x = 2 \cdot 1:1/160 = 320$ мл 0,1% раствора крахмала. Следовательно, 1 мл неразбавленной слюны расщепляет за 30 минут при 37 °С 320 мл 0,1% раствора крахмала. Условно это принимают за 320 единиц α -амилазы по Вольгемуту. Результат принято изображать следующим образом: $A\ 37^\circ/30' = 320$ ед.

10.2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ ПО ПРИРОСТУ МАЛЬТОЗЫ

Данный метод определения активности амилазы основан на измерении прироста количества мальтозы, которая образуется при действии амилазы на полисахариды — крахмал и гликоген.

Крахмал и гликоген не обладают восстанавливающей способностью, тогда как продукт их гидролиза мальтоза — обладает этим свойством. Реакция идет по уравнению:



В результате реакции йод, добавленный в реакционную смесь, в щелочной среде восстанавливается под действием образующейся мальтозы, превращаясь в бесцветное соединение — соль NaJ. Путем титрования определяют количество йода, эквивалентное данной величине мальтозы, и рассчитывают активность амилазы.

Ход работы

В две колбочки (опытную и контрольную) вносят по 0,1 мл слюны, разведенной в 5 раз, по 0,5 мл фосфатного буфера pH 6,8 и по 0,1 мл 1% раствора NaCl. В контрольную пробу вносят 0,5 мл 5% раствора HCl и кипятят.

В обе колбочки наливают 2 мл 2% раствора крахмала, перемешивают и ставят на 30 минут в термостат при 37 °С.

Спустя 30 минут в опытную колбочку вносят 0,5 мл 5% HCl и нагревают до кипения. Затем в обе колбы, добавляют по 15 мл 0,1 н. раствора J_2 и по каплям, все время перемешивая, добавляют 0,5 мл 40% раствора NaOH.

Оставляют пробы стоять 15 минут, а затем в обе колбочки вносят по 10 мл 5% раствора HCl и выделившийся J_2 титруют 0,05 н. раствором $Na_2S_2O_3$ до исчезновения сине-фиолетового окрашивания.

Рассчитывают активность амилазы: 1 мл 0,05 н. раствора J_2 эквивалентный 1 мл 0,05 н. раствора $Na_2S_2O_3$, соответствует 8,57 мг мальтозы. Количество образовавшейся мальтозы

$$C = (B-D) \cdot 8,57,$$

где В — количество 0,05 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование контрольной пробы; D — количество 0,05 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование опытной пробы; 8,57 коэффициент поправки на 0,05 н. раствора $Na_2S_2O_3$.

Активность амилазы А будет равна:

$$A = C/n,$$

где n — разведение пробы.

10.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ

Предлагаемый метод основан на учете образующегося в процессе реакции аммиака при гидролизе мочевины $NH_2-CO-NH_2$. При этом уреазы не действуют на тиомочевину, структурно сходное вещество $NH_2-CS-NH_2$.

Препарат уреазы приготовить заранее (8 г соевой муки или муки семян бобовых растений) заливают 46 мл дистиллированной воды, прибавляют 2 мл 0,1н. раствора HCl и несколько капель толуола, перемешивают и оставляют на ночь, затем фильтруют или центрифугируют, объем фильтрата доводят промывными водами до 50 мл).

Ход работы

В две колбы на 50 мл вносят по 5 мл препарата уреазы и по 5 мл 2% раствора мочевины в фосфатном буфере (pH 7), перемешивают. В одной из колб фермент инактивируют путем нагревания до кипения; обе колбы ставят на 1 час в термостат при 37 °С, после чего в колбы добавляют по 1 мл 0,1%-ного раствора $HgCl_2$, несколько капель 0,2%-ного метилового красного и выделившийся аммиак титруют 0,1 н. раствором HCl.

1 мл 0,1 н. раствора HCl соответствует 1,4 мг азота.

Расчет активности уреазы производят по формуле:

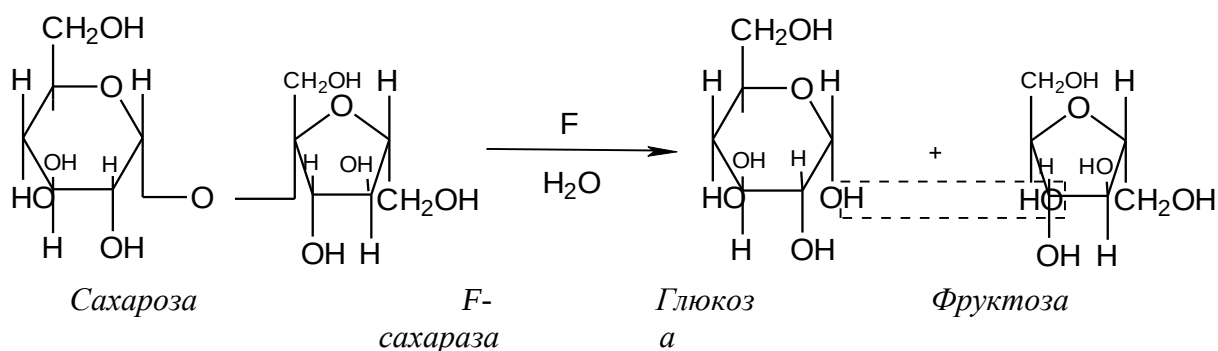
$$v = \frac{(A - B) \cdot T \cdot 1,4 \cdot 1,25 \cdot 5}{t}$$

где А и В — количество 0,1н. раствора НСl, пошедшее на титрование соответственно опытной пробы и контрольной, мл; Т — поправка к титру раствора НСl; t — время, в течение которого действовал фермент, мин; 1,25 — коэффициент для пересчета количества фермента на 1 г навески муки.

За единицу активности уреазы принимают такое количество фермента, которое за 5 минут при 37 °С и рН 7 образует из мочевины 1 мг азота аммиака.

10.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ САХАРАЗЫ

Сахараза вызывает гидролитическое расщепление сахарозы на глюкозу и фруктозу. Сахарозу обычно получают из дрожжей.



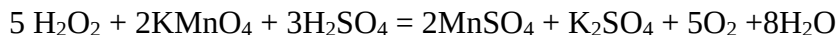
Ход работы

5 г высушенных на воздухе пивных или прессованных дрожжей растирают в течение 20 минут с кварцевым песком и 25 мл воды, подогревают до 60 °С, затем фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным, для чего первые порции мутного фильтрата снова выливают в воронку для фильтрования.

Берут 4 пробирки, в первые две приливают по 1 мл инвертазы, по 2 мл 5 % раствора NaOH и нагревают до кипения. В две другие приливают по 1 мл инвертазы. Затем во все 4 пробирки приливают по 5 мл 1% раствора сахарозы. Пробирки №3 и 4 ставят на 15 минут в термостат при 37 °С. По истечении указанного времени в пробирки № 3 и 4 приливают по 2 мл 5% раствора щелочи. После охлаждения во все пробирки добавляют по 5 мл Фелинговой жидкости и нагревают до кипения. Выпадает красный осадок гидрата закиси меди. По количеству осадка судят об активности инвертазы.

10.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ (ПО А.Н. БАХУ И А.И. ОПАРИНУ)

Метод определения активности каталазы основан на определении количества пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом. Количество H₂O₂ в реакционной смеси определяют титрованием в кислой среде раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л:



На основании приведенного уравнения реакции можно рассчитать, что 1 мл раствора с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л соответствует 1,7 мг (50 мкмоль) пероксида водорода.

10.6. ЗАВИСИМОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ОТ рН РЕАКЦИИ СРЕДЫ

Скорость ферментативных реакций зависит от содержания водород ионов в среде. Концентрация ионов водорода, при которой наблюдается максимальная скорость реакции, называется оптимальной (оптимум рН). При небольшом отклонении от оптимума рН скорость ферментативной реакции замедляется, при резком отклонении - реакция прекращается полностью.

Влияние рН на активность ферментов объясняется тем, что белковая молекула фермента является амфотерным полиэлектролитом, каталитический эффект которого зависит от степени

ионизации функциональных групп, которые входят в активный центр.

Ход работы

Готовят 5 буферных растворов с pH от 5,6 до 7,8, как указано в таблице.

Таблица Приготовление буферных растворов

№	pH	Количество 0,2 М раствора Na_2HPO_3 , мл	Количество 0,1 М раствора лимонной кислоты, мл
1	5,6	2,90	2,10
2	6,4	3,45	1,55
3	6,8	3,65	1,15
4	7,2	4,35	0,63
5	7,8	4,80	0,20

К 5 мл приготовленных смесей добавляют по 0,5 мл слюны, разбавленной водой в 10 раз и 0,5 мл крахмала. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и ставят в термостат при 37 °С на 10 минут. После чего из пробирки 3 отбирают несколько капель жидкости и на стекле смешивают с I_2 в KI. Если получается синее окрашивание, то реакцию с йодом повторяют каждые 5 минут до тех пор, пока не будет красного или оранжевого окрашивания, которое указывает на близкий конец гидролиза. Через 2-3 минуты после появления подобной окраски все пробирки вынимают из термостата и помещают в стакан со льдом. После этого быстро добавляют в каждую пробирку по 2-3 капли раствора йода, перемешивают и отмечают окраску. Оптимальная pH для амилазы слюны будет в той пробирке, в которой крахмал полностью расщепился (при реакции с йодом окраска будет желтой). Фиолетовое, красно-фиолетовое и бурое окрашивание показывает меньшую степень расщепления крахмала.

Результаты опыта занести в таблицу.

Таблица Зависимость активности амилазы слюны от pH среды

№ пробы	pH среды	Окраска с йодом	Оптимум pH
1	5,6		
2	6,4		
3	6,8		
4	7,2		
5	7,8		

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Зависимость активности амилазы от pH среды представить графически, откладывая по оси абсцисс значение pH среды, а по оси ординат — время в минутах, необходимое для гидролиза крахмала до стадии эритродекстрина.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Методы определения ферментативной активности. Особые приемы, применяемые при выделении ферментов.
2. В каких единицах измеряется ферментативная активность?
3. Способы определения активности ферментов.
4. Как можно обнаружить фермент в биологическом материале?
5. Дайте определение удельной активности фермента
6. Факторы, определяющие активность ферментов.
7. Химическая природа ферментов, их строение и структура.
8. Основные этапы и условия выделения ферментов из биоматериала.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8. УГЛЕВОДЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с методами выделения углеводов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Углеводы - обширный класс соединений широко распространенных в природе. По химической природе это органические вещества, представляющие собой альдегиды или кетоны

многоатомных спиртов. В зависимости от числа атомов углерода в цепи моносахариды делят на тетразы (C₄), пентозы (C₅), гексозы (C₆) и т.д. В каждую из этих групп включают и альдозы и кетозы.

Углеводы широко распространены в природе, они встречаются в свободной или связанной форме в любой растительной, животной или бактериальной клетке. Наиболее распространенный углевод – целлюлоза, структурный компонент деревьев и других растений. Главный пищевой ингредиент – крахмал.

Углеводы образуются в растениях в процессе фотосинтеза (80% сухого вещества растений составляют углеводы) и служат источником энергии для животных, питающихся этими растениями. Кроме этого, углеводы являются основным структурным материалом растений, составной частью нуклеиновых кислот, играющих важную роль в процессе биосинтеза белка.

1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УГЛЕВОДОВ

Метод основан на неодинаковой способности углеводов адсорбироваться на тех или иных адсорбентах и различной растворимости в смешивающихся жидкостях.

Ход работы

На пластинах наносят 1 мл 5% водного раствора сахаров в виде сплошной полосы длиной 2-5 мм, отступая от бокового и нижнего краев пластины на расстоянии 1 см. Пластинку вертикально помещают в камеру, которая заполнена разделяющей смесью до высоты 0,5 см. Состав разделяющей смеси можно взять любой из таблицы 32, например: н-бутанол - уксусная кислота - вода (60 мл-15 мл-25 мл). Пластинку выдерживают в камере до тех пор, пока высота подъема фронта восходящего растворителя не достигнет отмеченной длины разделительного пути, составляющая 9 см. По окончании разделения пластинку вынимают из камеры и сушат при комнатной температуре в вытяжном шкафу до испарения остатков растворителя.

Высушенные пластинки погружают в реагент, представляющий собой следующую смесь: н-бутанол - вода - уксусная кислота - фосфорная кислота – анилин - дефиниламин (60 мл-25 мл-15 мл- 10 мл- 1 мл- 2 г). Пластинки снова высушивают и проявляют в термостате при температуре 120 °С в течение 5 минут.

После проявления сопоставляют расположение пятен сахаров, которое будет различным в силу разной степени подвижности веществ (табл.). Степень подвижности сахаров на хроматограмме выражают через соотношение пути, пройденного данным соединением от линии старта к расстоянию, пройденному фронтом растворителя (R_f):

$$R_f = a/b$$

где, а- расстояние от линии старта до центра пятна;

б- расстояние от старта до финиша.

Таблица. Значения R_f некоторых углеводов

Вещество	А		Б		В	Г		Д	Е		Ж		З
	С1	С2	С3	С4	С5	С6	С7	С8	С9	С10	С11	С12	С13
Глюкоза	17	14	42	46	37	13	100	74	45	39	32	100	34
Ксилоза	39	45	39	54	100	27	126	-	57	49	-	155	56
Галактоза	18	11	32	40	30	12	-	67	42	35	37	83	-
Лактоза	4	-	25	23	8	-	47	43	34	26	12	36	33
Рамноза	62	78	52	60	140	49	-	-	60	55	-	210	66
Манноза	23	-	32	60	46	19	-	-	47	42	37	115	43
Мальтоза	6	-	-	32	10	34	61	55	39	30	-	53	-
Сахароза	8	-	29	36	-	40	74	59	44	39	-	66	-

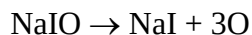
Обозначения: А - кремнезем, обработанный буфером; Б - силикагель; В - силикагель (готовые пластинки); Г - силикагель, обработанный буфером; Д - силикагель, борная кислота; Е - алусил; Ж - целлюлоза; З - тальк.

С1 этилацетат - 65%-й пропанол-2(65:35); С2 этилацетат - 65%-й пропанол-2 - вода (4:1:0,5); С3 метилэтилкетон - уксусная кислота - метанол (1:1:3); С4 бутанол - этилацетат - пропанол-2 - уксусная кислота - вода (35:100:60:35:30); С5 ацетонитрил - сероуглерод - вода (85:5:10); С6

бутанол - ацетон - вода (4:5:1); C7 хлороформ - уксусная кислота - вода (3:3,5:0,5); C8 метилэтилкетон - уксусная кислота - метанол (6:2:2); C9 пропанол - этилацетат - вода - 25%-й аммиак (5:1:1:3); C10 пропанол - этилацетат - вода - 25%-й аммиак (6:1:3:1); C11 бутанол - пиридин - вода (10:3:3); C12 вода - этилацетат - пиридин (25:100:35); C13 бутанол - вода - муравьиная кислота (5:5:1).

2. ЙОДОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТОЗЫ

Сущность метода заключается во взаимодействии между альдегидной группой молочного сахара или глюкозы с йодом в щелочной среде, в которой йод окислитель:



Выделившийся атомарный кислород окисляет молочный сахар в лактобионовую кислоту:



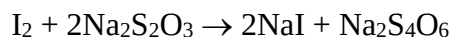
лактобионовая кислота

глюкозу, образовавшуюся при инверсии сахарозы, в глюконовую кислоту:



глюконовая кислота

При определении сахаров берут избыток йода и по разнице между количеством взятого и не прореагировавшего йода титрованием раствором гипосульфита натрия находят содержание сахара:



Молочный сахар имеет одну альдегидную группу и при переходе в лактобионовую кислоту присоединяет 1 атом кислорода.

Это эквивалентно 2 атомам йода или 1 мл 0,1 н раствора, окисляющего 18,01 мг молочного сахара (360,2:2). Грамм-эквивалент сахарозы при йодометрическом определении равен 171,0 (молекулярному весу, делённому на 2 (342:2)), так как одна молекулы глюкозы, полученной из сахарозы, соответствует 2 атома йода, то 1 мл 0,1 н раствора окисляет 17,1 мг сахарозы (фруктоза йодом практически не окисляется).

Ход работы

Отмеряют 5 мл молока в мерную колбу на 200 мл, прибавляют до половины колбы дистиллированную воду, 5 мл раствора медного купороса и 2 мл 1 н раствора едкого натра, перемешивая жидкость после прибавления каждого реактива.

Доливают до 200 мл водой, снова перемешивают и оставляют для отстаивания на 20 минут в темноте.

Отстоявшуюся жидкость профильтровывают в сухую колбу через складчатый фильтр.

25 мл фильтрата переносят в коническую колбу на 250 мл с притёртой или резиновой пробкой, приливают 12,5 мл 0,1 н раствора йода и сейчас же при непрерывном перемешивании добавляют из бюретки 18 мл 0,1 н раствора едкого натра.

Закрывают колбу пробкой и оставляют в темноте на 20 минут при комнатной температуре.

Прибавляют в колбу 4 мл 0,5 н раствора соляной кислоты, оттитровывают выделившийся йод 0,1 н раствором гипосульфита натрия в присутствии 1% раствора крахмала. Титрование ведут медленно, сначала без прибавления индикатора (до получения светло-жёлтой окраски), затем прибавляют 1 мл 1% раствора крахмала и продолжают титрование до момента, когда от 1 капли раствора гипосульфита исчезнет синяя окраска.

Проводят холостую пробу, для чего в другую такую же колбу отмеривают 12,5 мл 0,1 н раствора йода, добавляют при непрерывном помешивании 18 мл 0,1 н раствора едкого натра и, закрыв колбу пробкой, оставляют в темноте на 20 минут, а затем проводят определение как в первой колбе.

Содержание лактозы в % находят по формуле:

$$Л = 0,873 \cdot (а - б)$$

где Л – содержание лактозы; а - количество 0,1 н раствора гипосульфита, пошедшего на титрование йода в холостой пробе, мл; б - количество 0,1 н раствора гипосульфита, пошедшего на титрование йода при определении в фильтрате, мл; 0,873 – поправка на количество лактозы,

реагирующее с 1 мл 0,1 н раствора йода, г.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Физико-химические свойства глюкозы и других углеводов, на которых основаны методы их качественного и количественного определения в биологических жидкостях.
2. Сущность йодометрического определения лактозы.
3. Метод ТСХ для определения углеводов.
4. Фотосинтез, его значение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9. ЛИПИДЫ.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Научиться выделять и идентифицировать липиды.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Запасные липиды широко распространены в природе. В растениях они синтезируются в наиболее высоких концентрациях в семенах растений. Семена подсолнечника, хлопчатника, сои, льна и других культур, отличающиеся высокой массовой долей липидов, являются масличным сырьем и служат для промышленного получения растительных масел.

1. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА

1.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА В ЖЕЛТКЕ КУРИНОГО ЯЙЦА

Лецитины, относящиеся к группе фосфолипидов, не растворяются в воде и ацетоне, но хорошо растворяются в спирте, эфире, хлороформе.

В сухую пробирку вносят 10 капель ацетона и 2 капли спиртового раствора лецитина (в стакан помещают половину куриного желтка и, помешивая, прибавляют 40 мл горячего спирта, раствор охлаждают и фильтруют в сухую пробирку). Выпадает белый осадок. В другую пробирку прибавляют к 10 каплям лецитина несколько капель дистиллированной воды до образования устойчивой эмульсии.

1.2. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЛЕЦИТИН С ХЛОРИДОМ КАДМИЯ

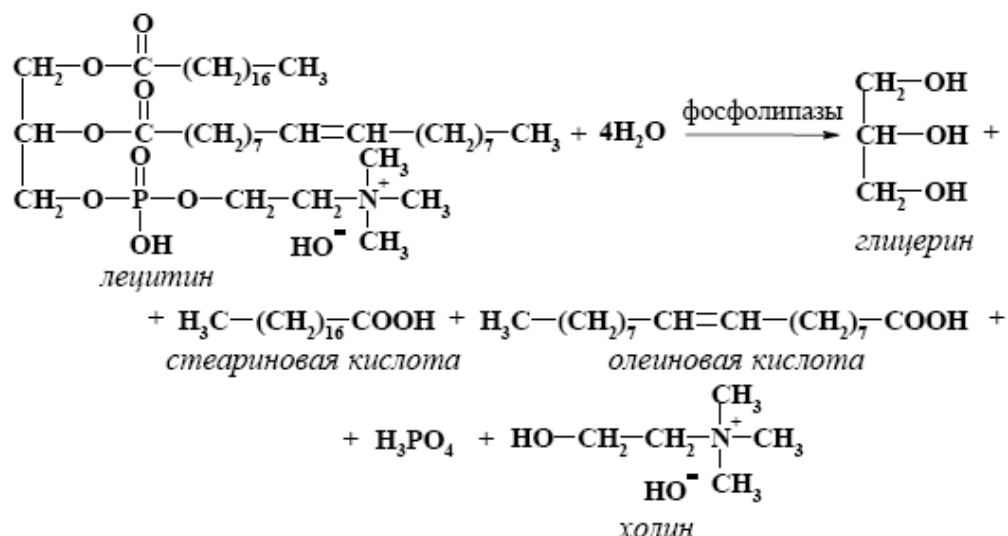
Эту реакцию не дают растворы холестерина и растительных масел.

Ход работы

К 2—3 мл спиртового раствора лецитина, полученного в предыдущем опыте, добавляют 1 мл насыщенного спиртового раствора хлорида кадмия. Выпадает белый хлопьевидный осадок комплексного соединения лецитина с хлоридом кадмия.

2. ГИДРОЛИЗ ЛЕЦИТИНОВ И ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА

В результате гидролиза лецитин под действием фосфолипаз А, В, С, Д распадается на составные части: жирные кислоты, холин, глицерин и фосфорную кислоту. В растворе устанавливают их наличие.



2.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛИНА

К 1–2 мл спиртового экстракта желтка добавляют равный объем 10 %-го раствора NaOH и кипятят 5–10 мин. При нагревании ощущается запах селедочного рассола, характерный для триметиламина, образующегося из холина.

2.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Полученный гидролизат разбавляют небольшим количеством воды и подкисляют 10 %-м раствором HCl. Выпадает осадок свободных жирных кислот, который отфильтровывают, фильтрат нейтрализуют 10 %-м раствором щелочи и упаривают на водяной бане досуха.

2.3. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИЦЕРИНА

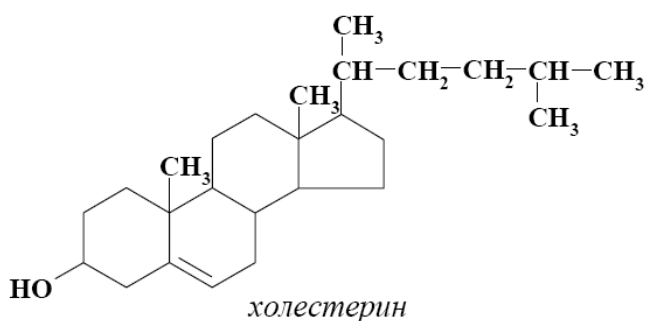
Часть сухого остатка смешивают с несколькими кристаллами KHSO_4 и нагревают. При этом ощущается резкий запах акролеина, образовавшегося из глицерина.

2.4. ОБНАРУЖЕНИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

Другую часть сухого остатка сплавляют в тигле с небольшим количеством KNO_3 и Na_2CO_3 . К охлажденному сплаву приливают 2 мл конц. HNO_3 и растирают палочкой, раствор сливают в пробирку и нагревают с небольшим избытком молибденово-кислого аммония (5–6 мл). При охлаждении образуется желтый кристаллический осадок фосфорномолибденово-кислого аммония.

3. ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В МОЗГУ

Холестерин относится к группе стероидов. Он не растворим в воде, но легко экстрагируется из клеток органическими растворителями – хлороформом, эфиром, бензолом или горячим спиртом.



По химической природе холестерин является циклическим ненасыщенным вторичным спиртом. В основе реакций лежит его способность образовывать окрашенные соединения в присутствии серной кислоты и уксусного ангидрида.

Ход работы

3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА

Тщательно растирают в фарфоровой ступке 3–5 г мозга с двумя частями гипса до однородной массы. Размазывают лопаткой густую массу тонким слоем по стеклянной пластинке и высушивают в сушильном шкафу при 60 °С. Сухую массу счищают ножом в сухую ступку, растирают сухим пестиком и переносят в большую сухую пробирку. Полученный порошок заливают 5–6 мл хлороформа и содержимое пробирки взбалтывают в течение 10 минут. Фильтруют содержимое пробирки в сухую пробирку через фильтр, смоченный хлороформом. С полученным фильтратом ставят качественные реакции.

3.2. РЕАКЦИЯ САЛЬКОВСКОГО

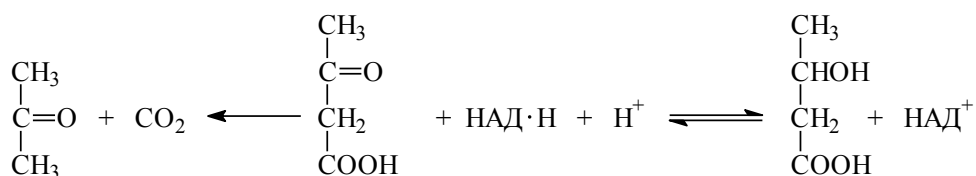
К 2–3 мл хлороформного раствора холестерина приливают 2–3 мл концентрированной серной кислоты и жидкость осторожно перемешивают. Когда жидкость отстаивается, верхний хлороформный слой оказывается окрашенным в красный цвет, нижний – в желто-красный цвет с зеленой флуоресценцией.

3.3. РЕАКЦИЯ ЛИБЕРМАННА—БУРХАРДТА

К 2–3 мл хлороформного раствора холестерина приливают 10 капель уксусного ангидрида и 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Жидкость хорошо взбалтывают и наблюдают образование сначала красной, затем синей и, наконец, сине-зеленой окраски. При незначительных количествах холестерина в растворе может сразу появиться зеленая окраска.

4. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА

Кетонные тела – общее название для продуктов обмена липидов у животных: ацетоуксусной, β -оксимасляной кислот и ацетона.



ацетон

ацетоуксусная кислота

β-оксимасляная кислота

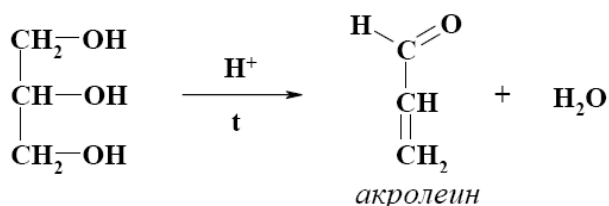
Ацетон и ацетоуксусная кислота образуют с нитропруссидом натрия в щелочной среде комплексное соединение розово-фиолетовой окраски. Интенсивность окраски зависит от количества кетоновых тел в реакции.

Ход работы

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

5. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИЦЕРИНСОДЕРЖАЩИХ ЛИПИДОВ. АКРОЛЕИНОВАЯ ПРОБА

Образование акролеина определяют по характерному запаху образующегося альдегида (запах горелого сала). При нагревании глицерина с гидросульфатом калия идет реакция дегидратации, в результате которой глицерин превращается в акролеин:



Ход работы

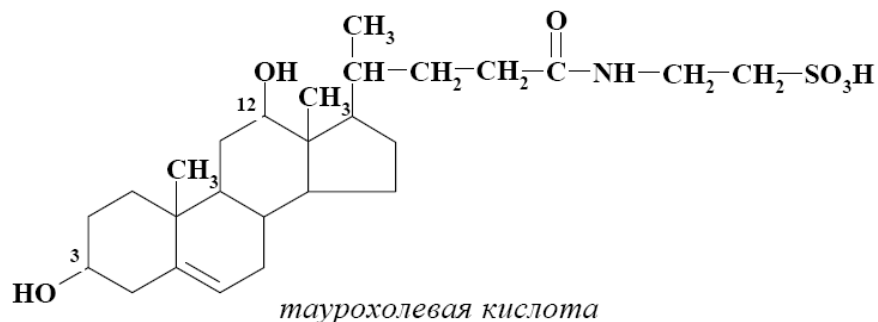
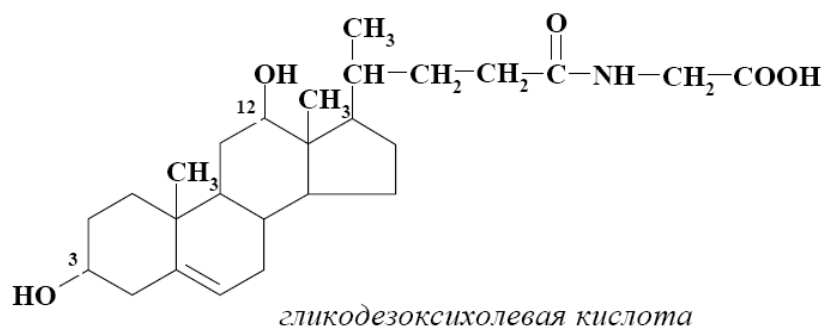
На дно двух пробирок поместить несколько кристалликов гидросульфата калия. В 1-ю пробирку добавить 5 капель растительного масла, во 2-ю 5 капель глицерина. Обе пробирки нагреть.

Обнаружить акролеин можно при внесении в пары фильтровальной бумаги, смоченной аммиачным раствором серебра. Бумага при этом темнеет.

6. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ (РЕАКЦИЯ ПЕТЕНКОФФЕРА)

Желчные кислоты образуются в печени и выделяются с желчью в свободном виде или в виде парных соединений с гликоколом или таурином. Желчные кислоты являются поверхностно-активными веществами и принимают участие в эмульгировании жиров, снижая поверхностное натяжение жировых капель, а также в активировании липазы и всасывании жирных кислот.

Проба основана на образовании окрашенного продукта при взаимодействии желчных кислот и оксиметилфурфурола. Последний образуется из сахарозы при действии концентрированной серной кислоты.



Ход работы

В пробирку наливают 10 капель концентрированной серной кислоты и осторожно наливают равный объем желчи, смешанной в отдельной пробирке с 1 каплей свежеприготовленного раствора сахара. На границе раздела жидкостей образуется осадок желчных кислот и появляется красновато-фиолетовое кольцо. При осторожном смешивании обеих жидкостей, так чтобы не происходило саморазогревание свыше 70 °С, жидкость принимает вишнево-красную окраску, которая при взбалтывании на воздухе быстро темнеет и приобретает пурпурный цвет.

Окраска обусловлена взаимодействием холевой кислоты с оксиметилфурфуролом, образующимся из тростникового сахара под действием серной кислоты. Надо избегать избытка сахара и нагревания выше 70 °С; так как может наступить обугливание, затемняющее окраску.

7. ОБНАРУЖЕНИЕ СТЕРОЛОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАСЛЕ

Ход работы

В сухую пробирку вносят 2 капли подсолнечного масла, 20 капель хлороформа. Добавляют 20 капель смеси серной кислоты с формалином и взбалтывают. Раствор разделяется на два слоя: хлороформный (вишневого цвета) и серной кислоты (красно-коричневого цвета с зеленой флуоресценцией). Из верхнего хлороформного слой отбирают 5-6 капель в сухую пробирку, добавляют 1-2 капли уксусного ангидрида и наблюдают появление синего окрашивания, переходящего в зеленое.

8. ДЕМОНСТРАЦИЯ КИСЛЫХ СВОЙСТВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Соли жирных кислот благодаря отрицательному заряду своих карбоксильных групп способны связываться с основными красителями с образованием комплексов, растворимых в органических растворителях.

Ход работы

В пробирку наливают 10 капель раствора солей жирных кислот, добавляют 10 капель 0,5% раствора метиленовой сини и 1 мл хлороформа. Встряхивают. В присутствии жирных кислот хлороформный слой окрашивается в синий цвет.

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ В СМЕСИ ЛИПИДОВ

Холинсодержащие фосфолипиды, имеющие четвертичный атом азота, проявляют свойства сильных органических оснований, поэтому они способны связывать красители (бромтимоловый синий, бромфеноловый синий), имеющие отрицательный заряд за счет сульфогруппы. Образовавшийся гидрофобный комплекс экстрагируется органическими растворителями. Остальные фосфолипиды (фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, кардиолипиды), у которых нет четвертичного атома азота, с этими красителями не соединяются.

Ход работы

К 1 мл 0,2% раствора смеси липидов приливают 1 мл 0,1% раствора бромтимолового синего с рН=8, 2мл хлороформа и перемешивают переворачиванием пробирки, не допуская образования пены, на протяжении 30 секунд. Оставляют пробирку на несколько минут для расслаивания. В присутствии холинсодержащих фосфолипидов хлороформный слой окрашивается в желтый цвет.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные свойства лецитина.
2. С помощью каких реакций можно обнаружить холестерин?
3. Объясните эмульгирующее действие липидов.
4. Какой фрагмент в молекуле жира обеспечивает протекание реакции присоединения брома?
5. Какие соединения дают похожую качественную реакцию? К какому классу органических веществ они относятся?
6. Определение понятия "липиды".
7. Биологическая роль липидов.
8. На чем основана классификация липидов?
9. От чего зависит жирнокислотный состав ацилглицеринов?
10. Простые липиды - жиры, воски и стероиды, общая характеристика.
11. Сложные липиды - фосфолипиды и гликолипиды, характеристика.
12. Триглицериды и их структура и разнообразие в природе.

6 семестр

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10. БИОЭНЕРГЕТИКА. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить реакции, лежащие в основе окисления субстратов, состав и последовательность ферментов дыхательной цепи.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Дегидразы – ферменты, способствующие окислению веществ отнятием водорода, который далее передается акцепторам водорода. Примером дегидраз является сукциндегидраза мышц. Для ее получения мясо гомогенизируют и многократно промывают водой, настаивая затем в течение часа в 0,9 % растворе NaCl.

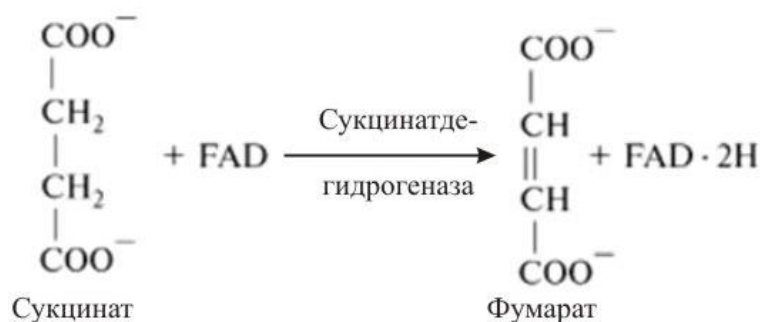
1.1. ИССЛЕДОВАНИЕ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Приготовление тканевого гомогената

2г ткани тщательно измельчить, хорошо растереть в ступке, добавив щепотку стеклянного порошка, добавить постепенно 20 мл дистиллированной воды, отфильтровать через марлю, отжать. Содержимое марли перенести в пробирку и суспендировать стеклянной палочкой с 8 мл воды. 2 мл полученного гомогената перелить в другую пробирку и прокипятить. Охладить и использовать содержимое пробирок для опытов

1.1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЫШЦ

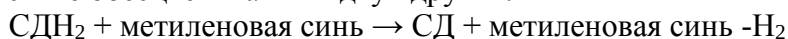
Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.2) катализирует превращение янтарной кислоты в фумаровую. Кофактором фермента является ФАД. Фермент прочно связан с внутренней мембраной митохондрий.



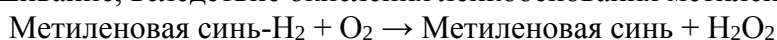
Ход работы

В 3 нумерованных пробирки помещают 3-4 мл мышечной кашицы и добавляют в первую – 1 мл 3 % раствора янтарной кислоты, нейтрализованной по лакмусу 10% раствором едкого натра; во вторую – 1 мл дистиллированной воды; в 3-ю 1 мл 3% яблочной кислоты.

В каждую пробирку добавляют 2-3 капли 0,02 % раствора метиленовой сини (до окрашивания смеси в голубой цвет), которая играет роль акцептора водорода. Содержимое пробирок перемешивают, и пробирки одновременно помещают в термостат при температуре 37 °С. Через 20-25 мин наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания в двух других.



Первую пробирку сильно взбалтывают, после обесцвечивания появляется вновь синее окрашивание, вследствие окисления лейкооснования метиленовой сини кислородом воздуха.



1.1.2. КОНКУРЕНТНОЕ ТОРМОЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЫШЦ

Сукцинатдегидрогеназная активность тормозится в присутствии малоновой кислоты вследствие близости ее структуры к таковой янтарной кислоты и происходящей вследствие этого конкуренции за фермент.

Ход работы

Навеску свежей мышцы массой 1 – 2 г растирают в ступке с небольшим количеством воды. Полученную кашицу переносят на двойной слой марли, помещенной на воронку и промывают 50 мл воды. Промытую кашицу отжимают, переносят в пробирку и суспендируют стеклянной палочкой в 4 мл воды. Полученную суспензию равномерно разливают в 4 пробирки и добавляют реактивы согласно табличным данным. Во все пробирки добавляют по 2-3 капли 1%-ного раствора метиленового синего и после перемешивания по 3-4 капли вазелинового масла. Пробирки ставят в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через 3-5 мин наблюдается изменения окраски в пробирках.

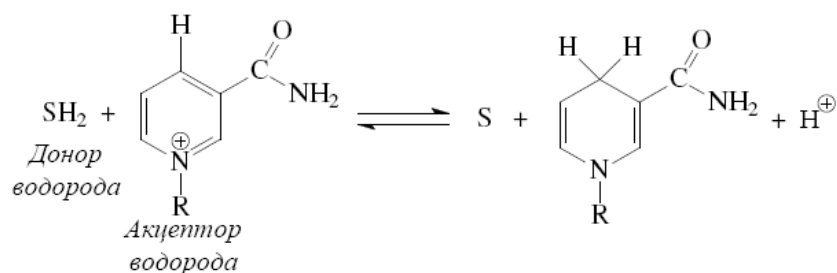
Полученные результаты внести в таблицу.

Таблица. Торможение активности СДГ

Пробирка	Сукцинат, мл	Вода, мл	Малонат, мл	Окраска	Вывод
Кипяченая	1	0,5	–		
Суспензия	1	0,5	–		
Суспензия	–	1,5	–		
Суспензия	1	–	0,5		

1.2. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

В печени содержатся ферменты, при участии которых происходит фосфоролит гликогена и дальнейшее превращение его до стадии образования фосфоглицериновой кислоты. Этот процесс может протекать в атмосфере азота и в атмосфере кислорода в присутствии фторида натрия. Если процесс протекает в атмосфере азота, в среде накапливается НАДН·Н⁺. Если процесс превращения гликогена происходит в атмосфере кислорода, то образовавшийся НАДН·Н⁺ окисляется при участии ферментов митохондриальной дыхательной цепи с образованием НАД и Н₂О. При окислении НАДН·Н⁺ образуются 3 молекулы АТФ.



Убыль минерального фосфата под влиянием ферментов, содержащихся в печени, в атмосфере кислорода протекает более интенсивно, чем в атмосфере азота.

Ход работы

На весах взвешивают навеску печени, записывают ее вес, затем помещают печень в фарфоровую ступку, стоящую на льду. Печень измельчают ножницами, добавляют немного битого стекла и растирают пестиком до получения однородной массы. После этого постепенно добавляют М/30 фосфатный буфер с рН 8,2 в количестве, равном весу печени. Содержимое ступки продолжают размешивать пестиком и добавляют 2 капли 1% раствора фтористого натрия. Полученную массу оставляют на несколько минут в ступке, чтобы осело стекло, затем часть вытяжки сливают в стеклянный стаканчик, стоящий на льду.

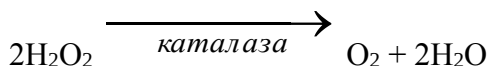
В 4 пробирки с притертыми пробками отмеривают при помощи шприца без иглы по 10 капель вытяжки из печени, приливают туда по 10 капель М/30 фосфатного буфера с рН 8,2, по 5 капель 1% раствора крахмала и добавляют по 1 капле фторида натрия. В 2 пробирки (контрольные) добавляют по 10 капель 5% раствора трихлоруксусной кислоты для денатурации ферментов. Помещают в штатив одну контрольную и одну опытную пробирки и пропускают через них кислород в течение 5 минут. В другой штатив также помещают контрольную и опытную пробирки и пропускают через них азот в течение 5 минут. Все четыре пробирки закрывают притертыми пробками и помещают в термостат при 38° на 30 минут. После этого в опытные пробирки добавляют по 10 капель 5% раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают. Содержимое всех пробирок фильтруют в чистые пронумерованные пробирки через влажные бумажные фильтры, помещенные в воронки. В пробирках с фильтрами проводят цветную реакцию на фосфор: добавляют в каждую пробирку по 10 капель молибдата (смесь равных объемов 2,5% раствора молибденовокислого аммония и 5N раствора серной кислоты) и 5 капель смеси растворов эйконогена и сульфата натрия. Помещают пробирки в термостат на 10 минут. Наблюдают развитие синей окраски, получаемой в результате реакции неорганического фосфата с молибденовым реактивом. Сравнивают визуальную интенсивность окраски в контрольных и опытных пробирках, термостатировавшихся в атмосфере кислорода и в атмосфере азота. Отмечают, в какой из опытных пробирок более интенсивно произошла эстерификация неорганического фосфата — в атмосфере кислорода или в атмосфере азота.

Сделайте выводы.

Примечание. При отсутствии эйконогена его можно заменить 1% раствором гирохинона 0,5 мл и 2 мл карбонатсульфитной смесью следующего состава: 40 г безводного карбоната натрия в 200 мл воды и 7,5 г сульфита натрия в 50 мл воды с последующим смешиванием растворов.

1.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ КАТАЛАЗЫ КРОВИ

Каталаза катализирует разложение перекиси водорода на молекулярный кислород и воду. По химической природе каталаза является геминферментом, так как в состав простетической группы этого фермента входит гем:



Каталаза содержится во всех тканях и жидкостях организма. Биологическая роль каталазы заключается в обезвреживании перекиси водорода путем разложения ее на воду и молекулярный кислород. Перекись водорода может образоваться в организме во время течения окислительно-восстановительных процессов.

Ход работы

В пробирку наливают 10—15 капель 1% раствора перекиси водорода и добавляют каплю крови. Жидкость вспенивается, так как происходит бурное выделение пузырьков кислорода. Результаты опыта заносятся в таблицу.

Таблица. Исследование действия каталазы крови

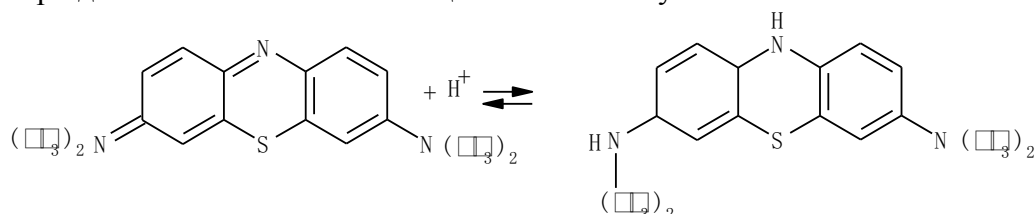
№ п/п	Ферменты	Субстрат	Реакция, катализируемая ферментом	Выявление действия ферментов

МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-

В живых организмах наиболее важными донорами электронов служат атомы водорода органических молекул. При помощи переносчиков электронов, имеющих промежуточный потенциал, осуществляется сложная последовательность реакций тканевого дыхания. Склонность к участию в окислительно-восстановительных реакциях может быть определена путем потенциометрических измерений, сводящихся к определению электродвижущей силы цепи, которая составлена из химически инертного электрода, погруженного в исследуемую редокс-систему, и электрода сравнения.

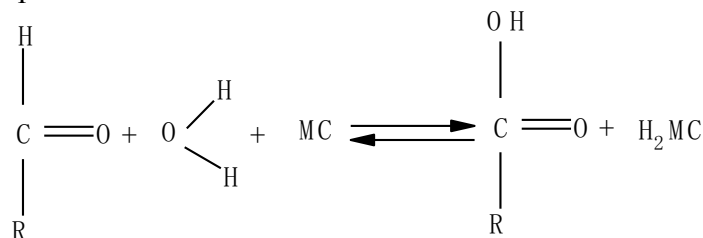
2. МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ «ВНУТРЕННЕГО ДЫХАНИЯ»

Метиленовая синь вступает в химическое взаимодействие с атомарным водородом, образующимся при действии металлического цинка на кислоту:



Продуктом этой реакции является бесцветное соединение - лейкометиленовая синь, которая под действием ионов-окислителей (Fe^{3+}) может вновь превращаться в исходный продукт. В результате этой реакции дегидрирования отнятый от молекулы лейкометиленовой сини водород соединяется с кислородом, образуя воду. Помимо ионов-окислителей аналогичное действие на лейкометиленовую синь оказывают и кислород воздуха и щелочная среда. В последнем случае, процесс дегидрирования идет значительно быстрее.

Глюкоза, инвертный сахар, смесь фруктозы и глюкозы также обладают способностью восстанавливать метиленовую синь до лейкометиленовой сини. Восстановителем в молекуле глюкозы является ее альдегидная группа —CHO , которая в процессе этой реакции окисляется до карбоксильной группы —COOH . Причем окисление молекулы глюкозы происходит не за счет кислорода воздуха, а за счет кислорода воды. При этом наряду с окислением молекулы глюкозы происходит процесс восстановления метиленовой сини. Схематически эту реакцию можно представить следующим образом:



Здесь MC — метиленовая синь.

Восстановленная метиленовая синь уже способна непосредственно вступать во взаимодействие с кислородом воздуха. При этом отнятый от ее молекулы водород соединяется с кислородом, образуя воду. Присоединение кислорода к углеводам осуществляется через промежуточную окислительно-восстановительную систему метиленовая синь - лейкометиленовая синь. Подобные процессы, только значительно более сложные, протекают в живой клетке, осуществляя так называемое «внутреннее дыхание».

Ход работы

Растворяют 5 г сахара в 50 мл дистиллированной воды, прибавляют к раствору 1 мл концентрированной азотной кислоты и выдерживают этот раствор в течение 30 мин при температуре 50-55 °С. Подготовленный таким способом инвертный сахар обладает сильными восстановительными свойствами.

В стеклянную пробирку наливают 0,1% раствор метиленовой сини, прибавляют к нему на кончике скальпеля цинковой пыли, подкисляют раствор несколькими каплями концентрированной уксусной кислоты.

Раствор метиленовой сини, имеющий ярко-голубой цвет, после прибавления к нему цинковой пыли и уксусной кислоты быстро обесцвечивается. Обесцвечившийся раствор метиленовой сини фильтруют через бумажный фильтр в три одинаковые стеклянные пробирки. В первую прибавляют несколько капель раствора FeCl_3 или азотной кислоты. Во вторую ничего не добавляют, ее лишь энергично встряхивают. В третью пробирку прибавляют небольшое количество гидроксида натрия и также сильно встряхивают.

После добавления к исследуемому раствору FeCl_3 или HNO_3 голубая окраска, свойственная метиленовой сини, полностью восстанавливается. Причем этот процесс проходит очень быстро. Значительно медленнее происходит восстановление окраски раствора во второй пробирке, несколько быстрее - в третьей. При встряхивании щелочной раствор (пробирка № 3) восстанавливает свою голубую окраску быстрее, чем кислотный (пробирка № 2).

Смешивают в пробирке одинаковые объемы растворов метиленовой сини и инвертного сахара, добавляют к смеси несколько капель едкого натра и оставляют ее на некоторое время в покое.

Через некоторое время раствор, имеющий голубую окраску, обесцвечивается. Полностью обесцвечившийся раствор сильно встряхивают и вновь оставляют в покое.

После энергичного встряхивания раствор вновь приобретает голубую окраску, которая при дальнейшем стоянии пробирки постепенно исчезает. Этот процесс может быть повторен многократно.

2.1 СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛОВ РИБОФЛАВИНА И МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы, измеренные при pH 7, обозначаются E'_0 . Окислительно-восстановительный потенциал является величиной, пропорциональной изменению свободной энергии. Вещество с большим окислительно-восстановительным потенциалом (с учетом алгебраического знака) окисляет вещество с меньшим окислительно-восстановительным потенциалом. Т.е. редокс-потенциалы являются мерой способности молекул обмениваться электронами.

Помимо потенциометрического измерения часто используют колориметрический метод, наблюдая изменение окраски специальных редокс-индикаторов в испытуемом растворе. Обычно в восстановленном состоянии эти индикаторы бесцветны, а в окисленном обладают определенной окраской. Причем для каждого индикатора зона перехода связана с характерной для него величиной E'_0 .

Ход работы

В пробирку наливают 5-6 капель воды, 1 каплю взвеси рибофлавина и добавляют по каплям раствор метиленового синего до появления синего или зеленовато-синего окрашивания смеси.

Бросают в окрашенную смесь кусочек цинка и капают 1 каплю концентрированной соляной кислоты. Выделяющийся водород начинает снижать редокс-потенциал системы, происходит восстановление метиленового синего и рибофлавина. Восстановление первого из них происходит быстрее, поэтому цвет смеси становится сначала зеленым, затем зеленовато-желтым и наконец бледно-желтым или розоватым.

Слабо окрашенную жидкость сливают в другую пробирку и наблюдают за изменением цвета. Водород более не образуется, а остаток его уходит в воздух. Восстановленная форма рибофлавина через метиленовый синий передает электроны и ионы водорода на кислород воздуха и раствор желтеет. После этого происходит окисление лейкометиленового синего, и содержащее пробирки меняет цвет через зеленый в синий.

Записать результаты опыта и составить схему переноса водорода (электронов и ионов водорода) с учетом стандартных окислительно-восстановительных потенциалов использованных компонентов.

2.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ ЛИМОННОКИСЛОГО ЦИКЛА

Непосредственному дегидрированию в организме под влиянием дегидрогеназ подвергаются многие субстраты. Наиболее важными среди них являются изолимонная, α -кетоглутаровая, янтарная (сукцинат), яблочная кислоты, участвующие в цитратном цикле (цикле трикарбоновых кислот или цикле Кребса). Отщепленный от субстратов водород (протоны и электроны) передается при помощи комплекса ферментов тканевого дыхания в конечном итоге на кислород. Изолимонная кислота окисляется при дегидрировании и декарбоксилировании в α -кетоглутаровую кислоту, а янтарная — в фумаровую.

При исследовании каталитического действия дегидрогеназы изолимонной кислоты (изоцитратдегидрогеназы) в качестве субстрата используют лимонную кислоту, которая изомеризуется в изолимонную под влиянием фермента аконитатгидратазы (КФ 4.2.1.3), содержащейся в тканевой кашице наряду с другими ферментами цикла трикарбоновых кислот.

Ход работы

В три пронумерованные пробирки вносят шпателем равные количества мышечной кашицы 0,2 г.

В первую пробирку добавляют 10 капель раствора цитрата натрия, во вторую — сукцината натрия, а в третью (контрольную) — 10 капель раствора сульфосалициловой кислоты. Если между кусочками мышцы остались пузырьки воздуха, их удаляют стеклянной палочкой.

В каждую пробирку добавляют по капле раствора метиленовой сини и по 10 капель вазелинового масла. Вазелиновое масло покрывает поверхность раствора, благодаря чему создаются анаэробные условия и тем самым предотвращается окисление восстановленных соединений кислородом воздуха.

Пробирку помещают в термостат или водяную баню при 37°C. Отмечают постепенное обесцвечивание метиленовой сини в пробирках с раствором цитрата и сукцината. В контрольной пробе метиленовая синь не обесцвечивается, т.к. фермент был инактивирован сульфосалициловой кислотой.

Результаты практических работ по обнаружению действия деадрогеназы молока и дегидрогеназ лимонного цикла занести в таблицу.

Таблица. Обнаружение дегидрогеназ лимоннокислого цикла

Источник фермента	Фермент	Субстрат	Реакция катализируемая ферментом	Акцептор водорода	Восстановление метиленовой сини	
					Не инактивированный фермент	Инактивированный фермент

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Разобщение окисления и фосфорилирования.
2. Сопряжение биологического окисления с фосфорилированием.
3. Сопряжение и разобщение биологического окисления и дыхания.
4. Что такое микросомальное окисление?
5. Митохондрии, их строение и функции. Локализация окислительного фосфорилирования в клетке.
6. Ингибиторы ферментов дыхательной цепи.
7. Эволюция представлений о биологическом окислении.
8. Назовите коферменты окислительно-восстановительных ферментов. Напишите их формулы в окисленной и восстановленной формах.
9. Цепь биологического окисления.
10. Сколько АТФ образуется по нормальному и сокращенному пути окисления?
11. Что такое окислительное фосфорилирование?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №11. МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ

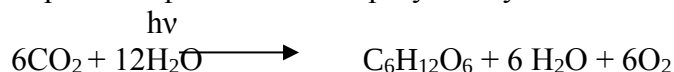
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть процессы катаболизма и анаболизма глюкозы.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Происходящий за счет световой энергии процесс усвоения углекислого газа зелеными растениями и образование органического вещества получил название фотосинтеза. Синтез крахмала протекает двухступенчато. Вначале синтезируется амилоза как более простой компонент крахмала. Затем часть амилозы используется для синтеза амилопектина.

1. ОБРАЗОВАНИЕ КРАХМАЛА В ПРОЦЕССЕ ФОТОСИНТЕЗА

При освещении листа в процессе фотосинтеза образуются углеводы.



Ход работы

Черенок листа опускают в воду, а поверхность листа на 40 мин, закрывают темной пленкой. Лист помещают под колпак, внутри которого расположен стаканчик с раствором бикарбоната натрия; добавляют небольшое количество серной кислоты для выделения CO_2 и насыщения им пространства под колпаком.

Открытую часть листа освещают лампой дневного света 60 мин. Лист погружают на 2 мин. в кипящую дистиллированную воду и затем на 10 мин в горячий спирт. После отмывания от спирта водой лист помещают в стаканчик с раствором йода в йодистом калии.

В освещенной половине листа наблюдают темно-синее окрашивание, а затемненная половина остается неокрашенной.

2. ОБНАРУЖЕНИЕ КРАХМАЛА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ

Крахмал может быть обнаружен только в зеленых листьях растений.

Ход работы

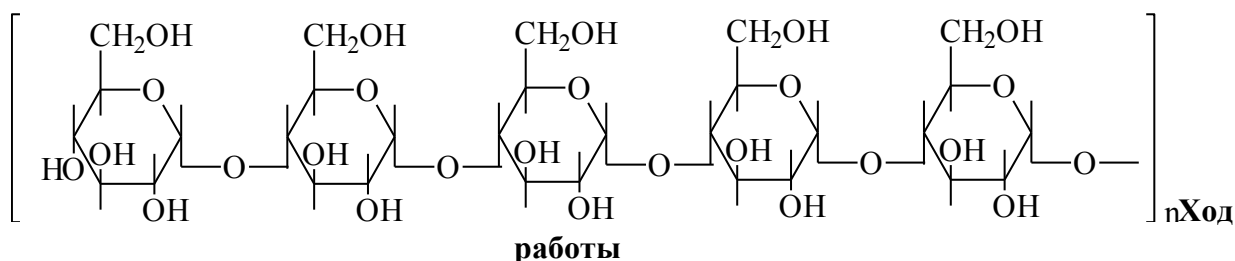
В две пронумерованные пробирки помещают: в первую - зеленый лист растения, во вторую - желтый. В обе пробирки наливают по 1 мл дистиллированной воды и содержимое кипятят 2 - 3 мин.

Горячую воду сливают и в пробирки наливают по 1 мл этилового спирта. Пробирки кипятят на водяной бане 3 - 5 мин при ежеминутном встряхивании. Хлорофилл зеленого листа и ксантофилл - желтого переходят в спирт, а листья обесцвечиваются. Окрашенный спирт сливают, а листья в пробирках заливают новыми порциями спирта и нагревают еще раз в течение 3 - 5 мин.

Спирт сливают, листья промывают несколько раз дистиллированной водой. Затем в каждую пробирку наливают 3 - 4 мл дистиллированной воды и кипятят на водяной бане для размягчения тканей листа.

Через 5 - 7 мин воду сливают, листья помещают на фильтровальную бумагу и наносят на них несколько капель раствора йода. Наблюдают появление синих точек, а затем посинение всего листа при наличии крахмала.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА В МЯКОТИ ПЛОДОВ И В КОРНЕПЛОДАХ



После размельчения проб отвешивают навески по 10 г мякоти тыквы (для петрушки, сельдерея навески увеличить), помещают в сосуд, приливают 9 cm^3 воды и размельчают в течение 5 минут. Полученную суспензию переливают в колбу на 200 cm^3 для клейстеризации крахмала, кипятят 5 минут с обратным холодильником. После охлаждения набирают 5 cm^3 пробы в пробирку и прибавляют 5 капель 0,3% раствора йода. Интенсивность появившейся окраски зависит от содержания и состава крахмала. Образцы, содержащие в свежей мякоти около 1 % крахмала, дают

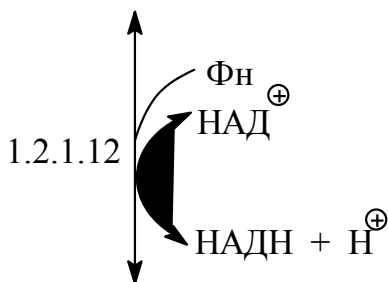
светло-голубую окраску, 2%-светло-синюю, 2,5%-синее окрашивание, 3,5%-темно-синее окрашивание. Окраска образцов, содержащих более 4,5% крахмала, трудно различима на глаз.

4. ОБНАРУЖЕНИЕ ФОСФОГЛИЦЕРИНОВОГО АЛЬДЕГИДА

3-фосфоглицериновый альдегид в ходе анаэробного превращения глюкозы дегидрогеназой 3-фосфаглицеринового альдегида окисляется в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту.



3-Фосфоглицериновый
альдегид



1,3-Дифосфоглицериновая кислота

При этом происходит восстановление НАД, который можно обнаружить по восстановлению метиленового синего в лейкосоединение.

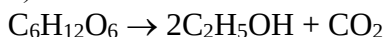
Ход работы

В пробирку вносят кусочек дрожжей (величиной с горошину), несколько капель раствора глюкозы, растирают содержимое стеклянной палочкой до получения равномерной взвеси. Добавляют каплю раствора метиленового голубого, перемешивают содержимое пробирки стеклянной палочкой.

Ставят пробирку в штатив и наблюдают обесцвечивание метиленового синего, начинающееся со дна пробирки.

5. ОБНАРУЖЕНИЕ ЭТАНОЛА

Лактоза молока при гидролизе образует β -галактозу и β -глюкозу (в отчете запишите схему гидролиза). Глюкоза под влиянием ферментов дрожжей может сбраживаться – окисляться до этилового спирта и оксида углерода (IV):



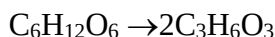
Ход работы

Для открытия этанола кефир и молочную сыворотку фильтруют. В пробирки наливают по 5 капель фильтрата кефира и молочной сыворотки и добавляют по 5 капель 10 %-го раствора гидроксида натрия, а также несколько капель 1 %-го раствора йода в 2 %-м йодиде калия.



6. ОБНАРУЖЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

При хранении молока происходит накопление в нем молочной кислоты. Молочная кислота образуется в результате молочнокислого брожения глюкозы, образовавшейся при гидролизе лактозы, присутствующей в молоке:

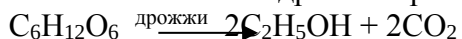


Ход работы

Проокисшее молоко фильтруют. С помощью универсального индикатора определяют среду фильтрата. В чистую пробирку приливают 3–5 капли раствора фенола и 2–3 капли раствора хлорида железа (III). К образовавшемуся раствору фенолята железа (III) сине-фиолетового цвета добавляют по каплям полученный фильтрат кислого молока до изменения первоначальной окраски раствора.

7. ПРОБА НА БРОЖЕНИЕ

Некоторые моносахариды под влиянием ферментов различных микроорганизмов испытывают разнообразные разложения, известные под названием брожения. Так, глюкоза при действии обыкновенных дрожжей распадается на винный спирт и углекислый газ по схеме:



Образующийся в результате брожения углекислый газ накапливается в трубке и распознается по поглощению его щелочью. Присутствие в трубке этилового спирта обнаруживается с помощью реакции получения йодоформа:



Процессы брожения сахаров имеют большое технологическое значение в виноделии, пивоварении, производстве уксуса и т.п.

Ход работы

Растереть 1 г дрожжей в ступке с 5 мл дистиллированной воды, и полученную массу смыть в стакан 30 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать содержимое стакана и добавить в него около 1 мл 1% виннокаменной кислоты (до яснокислой реакции на лакмус).

Налить содержимое стакана в трубку для брожения таким образом, чтобы закрытое колено трубки было заполнено, а в широкой части имелось некоторое количество жидкости. Заполненная таким образом трубка будет служить контролем, так как сами дрожжи могут содержать в себе некоторое количество сбраживаемых сахаров.

Далее 1 г дрожжей растереть в ступке с 5 мл исследуемого раствора глюкозы и полученную массу смыть в стакан 36 мл исследуемого раствора глюкозы. Тщательно перемешать содержимое стакана и добавить в него 1% , виннокаменной кислоты (до яснокислой реакции на лакмус). Налить вышеописанным способом содержимое стакана в другую трубку для брожения. Поставить на 2-3 часа обе наполненные трубки в термостат при 30-35°C.

Через 2-3 часа вынуть обе трубки для брожения из термостата, и если дрожжи активны и сами не содержат сбраживаемых сахаров, то наблюдают отсутствие образования газа (или появление ничтожного пузырька газа) в закрытом колене первой трубки и накопление газа в закрытом колене второй трубки (с глюкозой).

Чтобы убедиться в том, что образовавшийся во второй трубке газ есть CO₂, поступают так. В широкую часть трубки для брожения осторожно прибавляют 10% раствор едкого натра до края, плотно закрывают отверстие трубки подушечкой большого пальца и трубку несколько раз переворачивают. Углекислый газ поглощается щелочью, образуется вакуум; и мякоть палец присасывается к отверстию прибора.

Для обнаружения этилового спирта во второй трубке поступают так. Из бродильной трубки отфильтровывают в пробирку небольшое количество (3-4 мл) жидкости. К фильтрату добавляют 2-3 капли раствора йода и по каплям 10% едкого натра до обесцвечивания окрашивания от йода. Через некоторое время ощущается характерный запах йодоформа.

8. КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА

Распад крахмала происходит до стадии образования декстринов.

Ход работы

В большую пробирку с пипеткой помещают 1 мл 0,1 % раствора крахмала и 20 капель 2 н раствора серной кислоты. Нагреть на водяной бане в течение 10 мин, отбирая пипеткой каждые 2 мин в маленькие пробирки 3 - 4 капли гидролизата и добавляя в них по 1 капле йода. Обратить внимание на изменение окраски гидролизата с йодом в ходе гидролиза. К последней пробе в большой пробирке добавить 2 капли 2 н раствора сульфата меди, а затем добавлять по каплям 2 н раствора гидроксида натрия до образования растворимого темно-синего соединения. Далее полученный раствор нагреть (реакция Троммера). Появляется желто-красное окрашивание (положительная реакция Троммера). По результатам реакций сделать заключение о строении крахмала.

ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА ФЕРМЕНТАМИ ЖКТ

Различные ферменты в разной степени гидролизуют крахмал.

Ход работы

В три пробирки отмерить по 3 мл 0,5 % раствора крахмала. В 1-ю пробирку добавить 1 мл воды, во 2-ю - 1 мл желудочного сока, в 3-ю - 1мл вытяжки из поджелудочной железы (5 % раствор панкреатина). Из всех трех пробирок взять по 1 капле на стекло и проделать йодную пробу. Пробирки поместить в термостат при температуре 37 °С. Через каждые 5 мин проводить йодную пробу. Через 30 мин с содержимым трех пробирок проделать пробу Фелинга. Результаты занести в таблицу.

Таблица. Гидролиз крахмала

№	Добавляемая жидкость	Окраска с йодом, мин							Реакция Фелинга
		0	5	10	15	20	25	30	
1	Вода								
2	Пепсин								
3	Панкреатин								

ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА альфа-АМИЛАЗОЙ СЛЮНЫ

α -Амилаза слюны относится к классу гидролаз. Специфическими субстратами α -амилазы являются полисахариды крахмал и гликоген. Для исследования действия α -амилазы слюны в качестве субстрата берут крахмал. Нерасщепленный крахмал образует с йодом комплекс синего цвета и не обладает восстановительной способностью, так как почти не имеет свободных альдегидных групп. α -Амилаза гидролизует α -1,4-глюкановые связи в крахмале, гликогене и олигосахаридах, которые разрываются без определенного порядка. И мальтоза и глюкоза имеют свободные альдегидные группы, вследствие чего они обладают восстановительной способностью и открываются пробой Троммера.

Ход работы

К 5—10 каплям 1% раствора крахмала добавляют 1—2 капли раствора йода в йодистом калии и убеждаются в том, что крахмал с йодом дает синее окрашивание.

Заготавливают 8—10 пробирок, куда наливают по 1—3 капли раствора йода в йодистом калии.

В две другие пробирки помещают приблизительно по 5 мл раствора крахмала. В одну из них добавляют около 3 мл дистиллированной воды (контрольный опыт), а в другую—около 3 мл разбавленной слюны (основной опыт). Содержимое обеих пробирок перемешивают стеклянной палочкой и ставят пробирки в термостат при 37°С или держат в зажатой кисти руки. Замечают время.

Через несколько секунд (5—7) из контрольного и основного опытов отливают по несколько капель жидкости в пробирки с раствором йода в йодистом калии и наблюдают окрашивание. Отбор проб и реакцию с раствором йода производят несколько раз через короткие интервалы. Сначала синее окрашивание будет появляться от проб, взятых из обеих пробирок; затем из пробирки, где есть амилаза, проба жидкости начнет давать с йодом красно-бурое окрашивание. Вскоре отмечают, что пробы жидкости из пробирки слюной окрашивания с йодом более не дают. Эти различные окраски от йода указывают на то, что идет постепенный гидролиз крахмала с образованием декстринов. Когда последняя проба жидкости, взятая из пробирки со слюной, не изменит желтого цвета раствора йода, гидролиз считают завершенным и записывают время его окончания.

Пробы, взятые из контрольного опыта, все время дают синее окрашивание, что свидетельствует о том, что в отсутствие гидролиз крахмала не происходит.

С частью растворов основного и контрольного опытов производят пробу Троммера. С раствором из пробирки со слюной проба Троммера будет положительная, вследствие образования конечных продуктов ферментативного гидролиза крахмала. Раствор контрольного опыта пробу Троммера не дает. Наблюдают, что в пробирке с основным опытом опалесценция раствора процессе гидролиза исчезает.

Рекомендации к составлению протокола

Результаты работы записать в таблицу. В выводах обратить внимание на то, что гидролиз

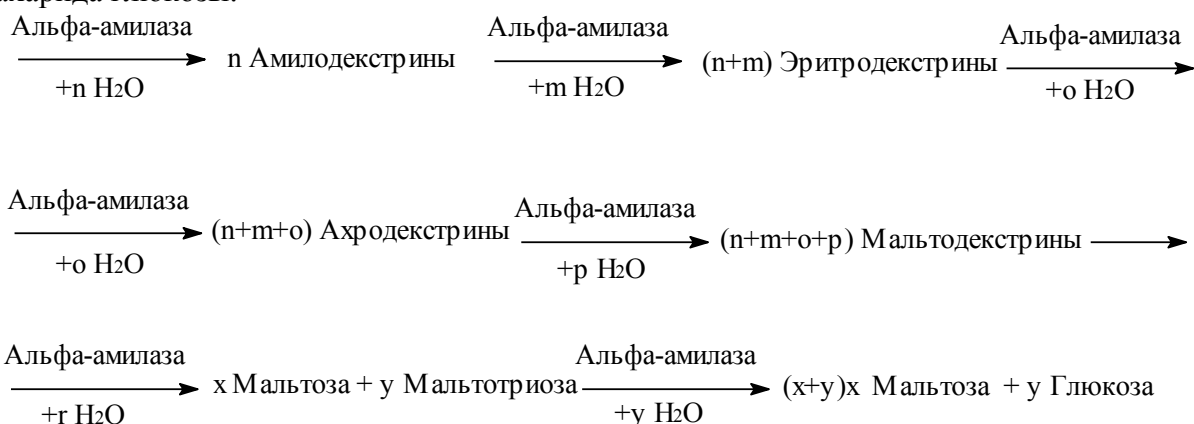
крахмала под влиянием α -амилазы идет постепенно, через промежуточные продукты, при температуре тела или близкой к ней, в течение короткого времени. Обосновать, почему конечные продукты гидролиза дают положительную реакцию Троммера.

Таблица. Гидролиз крахмала альфа-амилазой слюны

Название субстрата и продуктов гидролиза	Окраска с йодом	Время, затраченное на гидролиз	Температурные условия гидролиза	Реакция Троммера

ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕПЕНИ ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА

Слюна и другие пищеварительные соки животных и человека, являются концентрированными растворами ферментов. При гидролизе крахмала образуются последовательно промежуточные продукты: амилодекстрины (дают синее или фиолетовое окрашивание с йодом), эритродекстрины (красно-бурое окрашивание с йодом), ахродекстрины (не дают окрашивания с йодом), мальтодекстрины (не дают окрашивания с йодом). В качестве конечного продукта гидролиза под действием α -амилазы образуется смесь дисахарида мальтозы и моносахарида глюкозы.



В таблице приведены продукты гидролиза крахмала, их названия и окраски с йодом.

Таблица. Продукты гидролиза крахмала

Крахмал и продукты его гидролиза	Молекулярная масса продуктов гидролиза	Окраска с раствором Люголя
Крахмал	1 млн. и более	Синяя
Амилодекстрины	10 тыс.	Фиолетовая
Эритродекстрины	От 6 до 4 тыс.	Красно-коричневая
Ахродекстрины	3700	Оранжевая
Мальтодекстрины	1000	Желтая
Мальтоза	342	Светло-желтая

Ход работы

Хорошо прополоскать ротовую полость, вымыть пробирку проточной водой, набрать в рот 2-3 мл раствора с массовой долей хлорида натрия 1 % и держать 4-5 мин. Полученный таким образом раствор слюны собирают в пробирку и используют как раствор α -амилазы.

Для обнаружения амилазы в слюне и определения её активности, из полученного раствора отливают около 1 мл во вторую чистую пробирку и приливают двойной объем 1 % раствора крахмала и содержимое перемешивают путем плавного одноразового переворачивания пробирки, закрыв её пальцем. Смесь фермента с субстратом инкубируют в термостате при температуре 37-38 °С в течении 10 мин.

По истечении указанного времени наличие фермента и его активность определяют пробой с йодом: в пробирку вносят 1-2 капли раствора Люголя (по 1 капли на 1 мл содержимого) и встряхивают. По окраске появившейся в пробирке можно сделать вывод о продуктах реакции и активности фермента.

По результатам реакции сделать вывод о глубине гидролиза и активности ферментов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Гликолиз и гликогенолиз. Уравнения реакций.
2. Энергетический эффект распада глюкозы.
3. Пентозный цикл обмена углеводов.
4. Синтез глюкозы из неуглеводных компонентов?
5. Цикл трикарбоновых кислот.
6. Анаэробный путь обмена углеводов.
7. Обмен пировиноградной кислоты.
8. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты.
9. Химизм спиртового и молочнокислого брожения.
10. Напишите световую фазу фотосинтеза.
11. Напишите темновую фазу фотосинтеза.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12. МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть процессы обмена липидов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

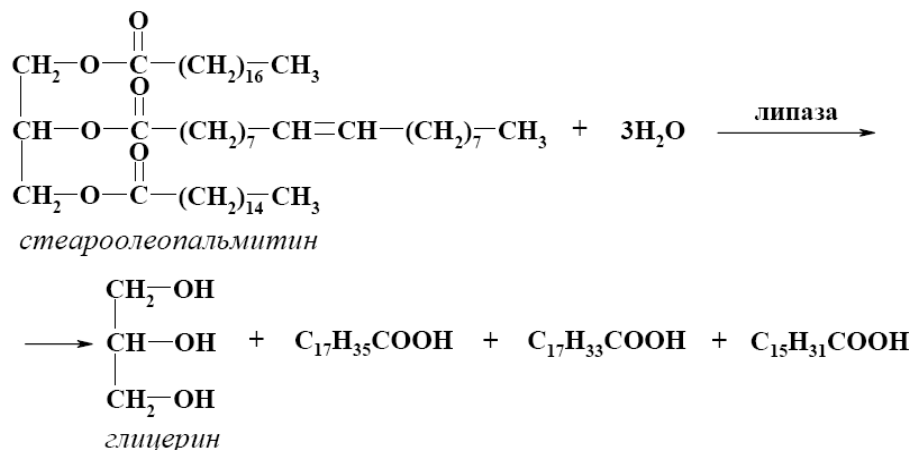
Слюна не содержит расщепляющих липиды ферментов. В полости рта жиры не подвергаются никаким изменениям. В желудочном соке содержится желудочная липаза, однако ее роль в гидролизе пищевых триглицеридов у взрослых невелика, ее содержание крайне низкое и pH желудочного сока далек от оптимума действия этого фермента и в желудке отсутствуют условия для эмульгирования триглицеридов, а липаза может действовать только на триглицериды в форме эмульсии. Поэтому переваривание липидов идет в кишечнике.

1. ПЕРЕВАРИВАНИЕ ЖИРОВ ЛИПАЗОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

Переваривание жиров у человека начинается, хотя и в незначительной степени, в желудке. Главным местом переваривания жиров является двенадцатиперстная кишка. Липаза панкреатического сока выделяется панкреатической железой частично в активном, частично в неактивном состоянии; неактивная липаза при действии желчи переводится в активную форму.

Липаза панкреатического сока проявляет свое действие, как в щелочной среде, так и в нейтральной и кислой средах. В кишечном соке также содержится липаза.

В результате действия липаз жиры присоединяют воду, расщепляясь при этом на глицерин и жирные кислоты.



Гидролиз жиров удобнее всего наблюдать при помощи липазы панкреатического сока. В качестве субстрата лучше всего взять молоко, жир которого, находясь в эмульгированном состоянии, быстро расщепляется на глицерин и жирные кислоты. Последние можно оттитровать щелочью.

Принцип метода. О скорости ферментативного распада можно судить по нарастанию кислотности, что может быть определено путем титрования щелочью. В качестве фермента могут быть использованы препараты поджелудочной железы (препарат панкреатина).

Ход работы

Очищают поджелудочную железу от жира, измельчают и перемешивают ее. Помещают

около 5 г измельченной железы в ступку и добавляют около 10 мл водно-глицеринового раствора. С помощью пестика тщательно растирают содержимое ступки в течение 5 минут. Отфильтровывают смесь в пробирку. Фильтрацию удобно вести через полотно; для одного опыта достаточно отфильтровывать 4 мл вытяжки.

Наливают в две пробирки по 2 мл полученной вытяжки. В первую пробирку к 2 мл вытяжки добавляют 2-3 капли желчи для активирования липазы.

Отмеривают с помощью цилиндра в 3 колбы (№1, №2, №3) по 25 мл молока.

Помещают колбы с молоком на 10-15 мин в термостат при 37 °С.

Отмеривают с помощью пипетки в три другие колбы (№4, №5, №6) по 5 мл дистиллированной воды и добавляют в каждую колбу по несколько капель фенолфталеина.

Добавляют, по возможности одновременно, в колбу №1 - 2 мл вытяжки липазы, активированной желчью, в колбу №2 – 2 мл не активированной вытяжки липазы, в колбу №3 - 2 мл разведенного в 5 раз раствора желчи.

Быстро и тщательно перемешивают содержимое каждой колбы.

Быстро отмеривают с помощью пипетки из колбы №1 (с активированной липазой) 5 мл жидкости переносят ее в колбу №4 (с водой и фенолфталеином), из колбы №2 (с не активированной липазой) 5 мл жидкости и переносят ее в колбу №5 (с водой и фенолфталеином), из колбы №3 (с разведенным раствором желчи) 5 мл жидкости и переносят ее в колбу №6 (также, с водой и фенолфталеином).

Колбы №1, №2, №3 вновь ставят в термостат при 37 °С. В процессе гидролитического расщепления жира происходит образование жирных кислот, которые оттитровывают затем 0,1 н раствором NaOH. Содержимое колб №4, №5, №6 оттитровывают 0,1 н щелочью до слабо-розового окрашивания при непрерывном помешивании.

Еще три раза через каждые 15 минут берут из колбы №1, колбы №2 и колбы №3 пробы по 5 мл и помещают соответственно в чистые колбы №4, №5, №6, в которые предварительно должно быть отмерено по 5 мл дистиллированной воды и добавлено по несколько капель фенолфталеина. Отмеренные пробы титруют по вышеуказанному методу.

Сравнивают объемы 0,1 нормальной щелочи, пошедшие на титрование всех трех проб из колбы № 2, всех трех проб из колбы №3 и 4, откладывая их по времени и вычерчивают кривые титрования.

По окончании титрования записать результаты в таблицу.

Таблица. Переваривание жиров липазой поджелудочного сока

№ п/ п	Добавленное вещество, мл					Расход NaOH, мл				
	Молоко	Фенол- фталеин	Вода	Панкреат ин	Желчь	Продолжительность опыта, мин				
						15	30	45	60	Всего

Так как гидролиз идет постепенно, количество освобождающихся инертных кислот нарастает по времени.

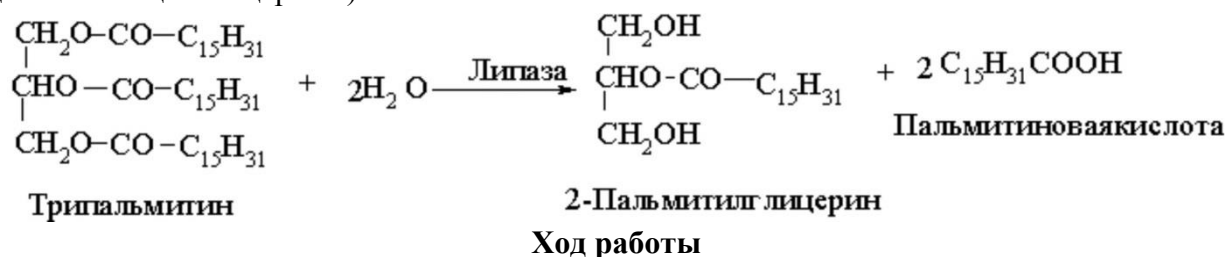
Изобразить графически динамику расщепления жира липазой для каждой пробы, откладывая на оси абсцисс время в минутах, а на оси ординат количество 01 н. раствора NaOH (в мл), израсходованного на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данное время (15, 30, 45, 60 минут).

На основании хода кривых на графике и полученных данных концентрации карбоксильных групп сделать вывод о зависимости активности липазы от присутствия желчных кислот. Отметить зависимость количества образовавшихся свободных жирных кислот от продолжительности ферментативного действия.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЛИПАЗЫ НА ЛИПИДЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В тонкой кишке происходит гидролиз липидов, 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 происходит поэтапно: сначала ферментами атакуются α - и α_1 -связи, а затем более медленно гидролизуются β -моноацилглицерины. Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, а также ди- и моноацилглицерины) всасываются и стенки кишечника.



Ход работы

Готовят 2 колбы для опытной и контрольной проб. Для контрольной пробы липазу предварительно кипятят в течение 10 мин на кипящей бане. В каждую колбу наливают молоко и препарат липазы, как указано в таблице.

Таблица. Исследование действия липазы

Компоненты смеси	Опыт, мл	Контроль, мл
Молоко (разведенное в соотношении 1:10)	10	10
Препарат липазы	1	1 (прокипяченный)

Приготовленные инкубационные смеси перемешивают. Затем из каждой колбы отбирают по 1 мл смеси в заранее приготовленные стаканчики для титрования. В каждый стаканчик добавляют 2 капли раствора фенолфталеина и титруют раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания. При первом титровании нейтрализуют органические кислоты - молочная и другие, которые присутствовали в молоке до начала действия липазы.

Оставшуюся в колбах смесь помещают в термостат, температура которого 37°C , и через определенные интервалы (10, 20, 30 мин) из каждой пробы отбирают (не вынимая из термостата) по 2 мл смеси и титруют 0,01 моль/л раствором гидроксида натрия. Время титрования и объем израсходованного гидроксида натрия фиксируют в таблице.

Таблица. Результаты титрования

Объем щелочи, пошедшей на титрование, мл	Время инкубации, мин			
	0	10	20	30
Опытная проба				
Контроль				

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результат 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 минусах), а по оси ординат - активность липазы, выраженную объемом 0,01 моль/л раствора гидроксида натрия в мл, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени.



В тетрадь записать сделанные выводы.

3. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ

Присутствие желчных кислот можно обнаружить реакцией Петтенкофера. Желчные кислоты

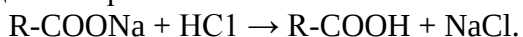
дают пурпурное окрашивание с оксиметилфуролом, образующимся из фруктозы в присутствии концентрированной серной кислоты.

Ход работы

На сухое часовое стекло наносят 1 каплю желчи и 1 каплю раствора сахарозы, хорошо перемешивают стеклянной палочкой. Рядом наносят 3 капли концентрированной серной кислоты (стекло не сдвигать с места). Через некоторое время на месте слияния капель наблюдают развитие красного окрашивания, переходящего при стоянии в красно-фиолетовое.

4. РОЛЬ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ТРАНСПОРТЕ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В КРОВИ

Опыт заключается в сравнении растворимости свободных жирных кислот и их комплексов с сывороточным альбумином. Комплекс возникает при взаимодействии растворимой натриевой соли высших жирных кислот (мыло) с альбумином. При добавлении соляной кислоты натрий вытесняется и образуются свободные жирные кислоты:



В комплексе с сывороточным альбумином высшие жирные кислоты остаются в растворе, а в отсутствие альбумина выпадают в осадок. Следует избегать избытка соляной кислоты, которая, вызывая денатурацию белка, может нарушить его способность к комплексообразованию.

Ход работы

В две пробирки вносят по 6 капель раствора мыла. В первую добавляют 20 капель сыворотки крови, во вторую – столько же воды. Пробирки слегка встряхивают. В пробирку с добавленной водой вливают по каплям (1—2 капли) 1% раствор соляной кислоты только до появления осадка свободных жирных кислот. В пробирку с сывороткой крови приливают такое же количество кислоты. Жирные кислоты не выпадают в осадок, так как образуют с сывороточным альбумином комплексное соединение.

Рекомендации к составлению протокола

Результаты исследования записать и обосновать различия в растворимости свободных жирных кислот и их комплексов с альбумином крови, а также указать на значение комплексообразования.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. α - и β -окисление высших жирных кислот.
2. Кетоновые тела, их значение, пути образования.
3. Механизм биосинтеза высших жирных кислот.
4. Механизм биосинтеза кефалина, роль ЦДФ в этом процессе.
5. Механизм биосинтеза лецитина, роль ЦДФ в этом процессе.
6. Механизм биосинтеза триглицеридов.
7. Обмен ацетил-КоА.
8. Обмен триглицеридов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13. МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть процессы обмена белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Белковый обмен - совокупность превращений белков и продуктов их распада — аминокислот в организмах. Обмен белков отличается от обмена углеводов и липидов рядом особенностей.

1. Очень ярко выраженное деление белков на «свои» и «чужие». Это строго контролируется иммунной и другими системами и нарушение опознания «своих» сопровождается значительными нарушениями функций клеток и органов.

2. Отсутствие «запасных» белков. Если углеводы депонируются в форме гликогена почти всеми клетками, а липиды в форме нейтрального жира адипоцитами, то все белки практически функционально активны и в случае необходимости происходит распад одних менее важных в данный момент и синтез других более важных для данной ситуации белков

3. Необходимость в дополнительных метаболических путях. Белки – основной носитель

азота в организме и если углеводородный скелет аминокислот просто вливается в общие метаболические пути, то обмен азота протекает по специфическим путям со своими особенностями превращений и регуляции

1. СТВОРАЖИВАНИЕ МОЛОКА ПЕПСИНОМ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

Под действием нейтрализованной желудочного сока молоко створаживается. Створаживание молока обусловлено способностью пепсина превращать казеиноген молока в казеин, кальциевая соль которого нерастворима в воде.

Ход работы

Берут 4 пробирки. В 1-ю пробирку наливают 2 мл желудочного сока. Во 2-ю 2 мл дистиллированной воды и порошка углекислого кальция до нейтральной реакции на лакмус, жидкость фильтруют. В 3-ю 2 мл желудочного сока с несколькими каплями 0,2 % соляной кислоты. В 4-ю прокипяченного желудочного сока.

Во все пробирки наливают по 10 капель свежего молока и поместить в термостат при температуре 37 °С на 5-10 мин. Отметить изменение окраски.

Результаты занести в таблицу.

Таблица. Створаживание молока пепсином желудочного сока

Субстрат	Фермент	Видимые изменения	Чем обусловлено изменение

2. ПЕРЕВАРИВАНИЕ ФИБРИНА ПЕПСИНОМ

Переваривание белков начинается в желудке под влиянием желудочного сока. Желудочный сок, выделяемый железами слизистой оболочки стенок желудка, представляет собой жидкость, содержащую 99% воды, свободную соляную кислоту, кислореагирующие фосфаты, хлористый натрий, протеолитический фермент — пепсин, липолитический фермент — липазу (расщепляет только эмульгированный жир) и другие вещества.

Пепсин выделяется главными клетками желез слизистой желудка в виде неактивного профермента — пепсиногена. Под влиянием соляной кислоты от пепсиногена отщепляются полипептиды, в результате чего пепсиноген превращается в активный фермент пепсин, способный к гидролитическому расщеплению пептидных связей белков. Пепсин является эндопептидазой, так как действует преимущественно на внутренние пептидные связи. Однако под влиянием пепсина разрываются также и некоторые пептидные связи, находящиеся на конце полипептидной цепи, что сопровождается появлением свободных аминокислот. В результате гидролиза белков пепсином образуются пептоны — смесь более или менее сложных полипептидов, а также в небольшом количестве свободные аминокислоты.

Ход работы

В одну пробирку наливают 20 капель желудочного сока или 0,1% раствора пепсина в 0,2% соляной кислоте.

В другую пробирку помещают 20 капель желудочного сока или 0,1 % раствора пепсина в 0,2% соляной кислоте, нейтрализованных содой.

В третью пробирку вливают 20 капель желудочного сока или 0,1% раствор пепсина в 0,2% соляной кислоте, предварительно под щелочных 0,4% раствором NaOH.

В четвертую пробирку закапывают 20 капель желудочного сока или 0,1 % раствора пепсина в 0,2% соляной кислоте, предварительно подвергнутых кипячению.

В пятую пробирку отмеривают 20 капель 0,2% раствора HCl.

Во все пять пробирок добавляют одинаковые небольшие кусочки фибрина, и пробирки помещают в термостат при 38—40°C.

После переваривания (растворения) фибрина в первой пробирке (примерно через 30 минут от начала опыта) все пробирки вынимают из термостата и наблюдают за изменениями фибрина.

Переваривание фибрина в первой пробе указывает на то, что пепсин действует в присутствии соляной кислоты. Фибрин во второй и третьей пробах остается неизменным, так как пепсин в нейтральной и щелочной среде неактивен. В четвертой пробе, где фермент был инактивирован кипячением, и в пятой пробе, в которой пепсина не было, может произойти лишь набухание

фибрина под влиянием соляной кислоты.

Содержимое каждой пробирки фильтруют и с фильтратом производят биуретовую реакцию. Положительная реакция обнаруживается только в первой пробе, где был активный пепсин, соляная кислота, фибрин, что указывает на присутствие в фильтрате продуктов переваривания белка. Результаты наблюдений занести в таблицу.

Таблица. Переваривание белков пепсином

№ пробы	Фермент	Субстрат	Реакция среды	Инактивация пепсина кипячением	Видимые изменения фибрина	Биуретовая реакция

В соответствии с полученными данными указать оптимальные условия для переваривания белка пепсином и роль соляной кислоты в этом процессе.

3. ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКА ТРИПСИНОМ

Под действием трипсина происходит гидролитическое расщепление пептонов, а также белков. Гидролиз под действием трипсина идет глубоко до частичного образования некоторых свободных аминокислот (триптофана). Оптимум действия трипсина лежит при слабощелочной реакции $pH=8-8,7$.

Ход работы

Пронумеровать три пробирки и налить в первую пробирку 4 мл раствора трипсина или панкреатина (щелочная среда), во вторую – 4 мл раствора трипсина или панкреатина, предварительно нейтрализованного соляной кислотой на лакмус, в третью – 4 мл подкисленного раствора трипсина или панкреатина.

Поместить в каждую пробирку по небольшому кусочку фибрина примерно равной величины. Все пробирки с содержимым одновременно поставить в водяную баню при $37^{\circ}C$.

Через 30 мин вынуть пробирки из бани и наблюдать результаты исследования. В первой пробирке должно иметь место растворение фибрина; во 2-й пробирке растворение не наблюдается; в третьей пробирке наблюдается лишь набухание фибрина.

4. КАЧЕСТВЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ АМИЛАЗЫ В ВЫТЯЖКЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Амилаза расщепляет 1,4-гликозидную связь крахмала с образованием мальтозы и глюкозы. Промежуточными продуктами гидролиза крахмала могут быть различные декстрины. Степень гидролиза крахмала можно контролировать, используя реакцию с йодом. Второй контрольной пробой может быть реакция Троммера, указывающая на наличие свободных альдегидных групп в мальтозе и глюкозе.

Ход работы

В большую пробирку помещают 2 мл 0,1% раствора крахмала и добавляют 1 мл вытяжки поджелудочной железы. Пробирку оставляют стоять при комнатной температуре, отбирая пипеткой в отдельные пробирки через каждые 2 минуты по 5-6 капель гидролизата и добавляя в них по 1 капле йода. Отметить время пошедшее на изменение окраски в ходе гидролиза. К последней пробе в большой пробирке добавить 5 капель 10% раствора гидроксида натрия, а затем по каплям 2% раствора сульфата меди, пока не прекратится его растворение. Полученный раствор осторожно нагреть. Появление желто-красного окрашивания говорит о положительной реакции Троммера.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ГИДРОЛИЗА БЕЛКА МЕТОДОМ ФОРМОЛЬНОГО ТИТРОВАНИЯ (ПО СЕРЕНСЕНУ)

В организме в процессе переваривания постоянно происходит гидролиз белков. При гидролизе простых белков образуются аминокислоты.

Гидролизаты белка (полученные искусственно, путем нагревания с кислотой или щелочью) применяют в качестве лекарственных препаратов для парентерального питания. Метод формольного титрования позволяет следить за ходом гидролиза белка, изучать действие протеолитических ферментов, а также определять количество белка, например, в молоке.

Количество карбоксильных групп, а, следовательно, и эквивалентное им количество

аминогрупп, определяют титрованием 0,1 М раствором натрий гидроксида в присутствии формальдегида; формальдегид химически связывает аминогруппы, обладающие основными свойствами, в результате чего раствор делается кислым (из-за наличия у аминокислот и белков карбоксильных групп). Белковый гидролизат получают нагреванием белка с серной кислотой (выполняется заранее лаборантом).

Ход работы

Определяют азот аминогрупп в 4-х пробах:

- 1) в растворе белка до гидролиза;
- 2) в гидролизате белка, полученного через 10 минут после гидролиза;
- 3) в гидролизате белка, полученного через 40 минут;
- 4) в растворе после полного гидролиза (1 час).

Для этого в колбочку наливают 5мл соответствующего раствора, добавляют 3мл 20% нейтрального раствора формалина и 2-3 капли 1% раствора фенолфталеина. Титруют из бюретки 0,1М раствором натрий гидроксида до образования розового окрашивания.

Проводят расчет степени гидролиза, отнимая от каждого значения титрования количество мл натрий гидроксида, использованное на титрование раствора белка до гидролиза (1-а проба).

Пример расчета: на титрование 5 мл 1-ой пробы использовали 0,2 мл 0,1 М раствора натрий гидроксида, 2-ой пробы - 1мл, 3-ей пробы – 2 мл, 4-ой пробы – 4 мл. Отнимая от каждого результата титрования количество мл натрий гидроксида, которое использовали на титрование 1-ой пробы (0,2 мл), будем иметь следующие цифры: на титрование второй пробы использовали 0,8 мл; 3-ей пробы -1,8 мл; 4-ой пробы - 3,8 мл. Количество мл натрий гидроксида, которое использовали на титрование 4-ой пробы, составляет 100%. Отсюда степень гидролиза равна:

- 1) для гидролизата, полученного через 10 минут:

$$3,8 - 100\%$$

$$0,8 - X \quad X = 21\%$$

- 2) для гидролизата, полученного через 40 минут:

$$3,8 - 100\% ;$$

$$1,8 - X \quad X=47,4\%$$

6. ДЕЙСТВИЕ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА НА БЕЛОК

Пронумеровать 4 пробирки. В каждую из них налить по 1мл желудочного сока.

Желудочный сок в пробирке №2 предварительно нагреть до кипения и охладить, в пробирке №3 – нейтрализовать 0,5%-ным раствором NaON (3-5 капель).

Во все пробирки добавить небольшое количество приготовленного белка. Хлопья белка куриного яйца, получить при кипячении ½ белка куриного яйца в 0,5 л H₂O.

Пробирки несколько раз встряхнуть и поместить №1-3 на водяную баню при 37 °С; №4 – в стакан со льдом.

Через каждые 8-10 минут содержимое пробирок взбалтывать.

Через 30 минут отметить, какие изменения произошли с белком.

Результаты наблюдения записать в таблицу.

Таблица. Действие желудочного сока на белок

№	Содержимое пробирки	Температура, °С	Результаты
1	Белок + 1мл желудочного сока	37	
2	Белок + 1мл прокипяченного желудочного сока	37	
3	Белок + 1мл нейтрализованного желудочного сока	37	
4	Белок + 1мл желудочного сока	0	

Белки расщепляются под воздействием ферментов желудочного сока, которые действуют лишь при определенной температуре и в кислой среде.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Конечные продукты распада аминокислот.

2. Преобразование аминокислот по аминогруппе.
3. Преобразование аминокислот по карбоксильной группе.
4. Преобразование аминокислот по радикалу.
5. Пути новообразования аминокислот.
6. Образование ядовитых продуктов распада белков под действием микрофлоры кишечника. Механизм обезвреживания.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14. МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ - освоение методов качественного и количественного определения мочевой кислоты.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Нуклеиновые кислоты не являются незаменимыми пищевыми факторами, и практически все клетки организма способны к синтезу нуклеотидов. Скоростью синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов определяется синтез нуклеиновых кислот. К заболеваниям, связанным с патологией обмена нуклеопротеинов, относятся подагра, мочекаменная болезнь, синдром Лёша-Нихена, оротацидурия, мегалобластическая анемия и другие.

Нуклеотиды – лекарственные препараты успешно применяются в клинике с лечебной целью. Аналоги пуринов и пиримидинов, их нуклеозиды и нуклеотиды широко используются в клинической медицине и научных исследованиях. Изменения в структуре гетероциклического кольца или углеводного компонента приводят к образованию соединений, токсический эффект которых обусловлен: ингибированием определенных ферментов, участвующих в синтезе нуклеотидов или нуклеиновых кислот; включением синтетических аналогов нуклеотидов в РНК или ДНК, где они нарушают комплементарное взаимодействие азотистых оснований или удлинение полинуклеотидных цепей.

Примерами аналогов пуринов и пиримидинов являются некоторые противоопухолевые и противовирусные препараты ингибирующие синтез пуринов и пиримидинов (6-меркаптопурин, тиогуанин, 5-фторурацил, 5-йодурацил). Ингибитором фермента ксантиноксидазы является аллопуринол, препарат, применяемый при лечении подагры и синдрома Лёша-Нихена.

1. ОБНАРУЖЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ПОМОЩИ МУРЕКСИДНОЙ ПРОБЫ

Мочевая кислота при окислении превращается в продукты (диалуровая кислота, аллоксан), которые конденсируются в аллоксантин. При действии аммиака на аллоксантин образуется пурпурная кислота, аммонийная соль которой – мурексид – обладает ярко-красным цветом, а калиевая – сине-фиолетовым.

Ход работы

Кристаллы мочевой кислоты помещают на дно фарфоровой чашки, смачивают каплями азотной кислоты (осторожно!), выпаривают досуха (не выше 70°C). Появляется коричнево-красное пятно, которое после охлаждения и осторожном смачивании с одного края аммиаком окрашивается в пурпурно-красный цвет, при смачивании с другого края раствором КОН – в сине-фиолетовый. Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

Практическое значение

Мурексидную пробу используют для открытия мочевой кислоты в мочевых камнях, осадках.

2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

Мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамовый реактив, развивается синяя окраска, интенсивность которой пропорциональна количеству мочевой кислоты. Количество образовавшейся фосфорновольфрамовой сини определяют путем титрования калием гексацианоферратом (III) $K_3[Fe(CN)_6]$, который окисляет фосфорновольфрамовую синь и окраска исчезает.

Ход работы

В колбу наливают 5 мл мочи, добавляют 2 мл фосфорновольфрамового реактива и 10 мл раствора Na_2CO_3 , перемешивают.

Из бюретки (осторожно!) по каплям приливают раствор $K_3[Fe(CN)_6]$ до исчезновения синего окрашивания.

Расчет

$$Con = \frac{C_{ст} \cdot A \cdot D}{B}$$

где Con – концентрация мочевой кислоты в пробе, $C_{ст}$ – концентрация стандартного раствора мочевой кислоты, соответствующего 1 мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ – 0,004 моль; B – объем мочи взятый для анализа, A – количество мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, пошедшего на титрование, D – суточный диурез (1200- 1500 мл).

Нормальные величины

Сыворотка крови

Дети 0,12-0,32 ммоль/л

Мужчины 0,24-0,50 ммоль/л

Женщины 0,16-0,44 ммоль/л

Моча 2,36-5,90 ммоль/сут

Запишите принцип метода и результаты проведения анализа. Сделайте вывод о наличии патологии.

Клинико-диагностическое значение

Уровень мочевой кислоты в крови (мононатриевая соль в комплексе с белком) определяется интенсивностью синтеза и выделением из организма. Повышение содержания мочевой кислоты наблюдается при уменьшении выделения ее почками, избыточном образовании (лейкозы). Повышение содержания мочевой кислоты в крови (гиперурикемия) является главным симптомом подагры. При подагре мочевая кислота откладывается в тканях, суставных сумках, хрящах, сухожилиях, суточное количество в моче снижается. Белки сыворотки стабилизируют ураты, но при снижении pH мочевая кислота кристаллизуется в тканях. Основным фармакологическим препаратом, используемым для лечения подагры, является аллопуринол, действие которого основано на ингибировании ксантиноксидазы. Ксантиноксидаза ускоряет окисление гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту. Донором электронов и кислорода в реакции является вода.

Злоупотребление алкоголем, отравление солями тяжелых металлов, заболевания почек уменьшают экскрецию мочевой кислоты (гипоурикурия). Экскрецию уратов повышают салицилаты, соли лития.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Охарактеризуйте переваривание нуклеопротеинов и васывание продуктов их распада в желудочно-кишечном тракте.
2. Охарактеризуйте анаболизм пуриновых нуклеотидов.
3. Напишите реакции синтеза АМФ и ГМФ из ИМФ, превращение нуклеозидмонофосфатов в трифосфаты.
4. Напишите биосинтез пиримидиновых нуклеотидов УМФ и ЦМФ, превращение их в трифосфаты.
7. Укажите регуляцию синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов по типу обратной связи, ее особенности.
8. Назовите нуклеотидные коферменты, укажите представление об их функции.
9. Охарактеризуйте катаболизм пуриновых нуклеотидов. Напишите химизм образования мочевой кислоты из АМФ и ГМФ.
10. Напишите химизм распада пиримидиновых нуклеотидов, конечные продукты процесса, укажите их утилизацию.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 15. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Цель работы

Изучить принципы матричного биосинтеза на примере репликации, транскрипции и трансляции; закрепить понимание роли нуклеиновых кислот в синтезе белков; научиться моделировать процессы биосинтеза и решать типовые задачи по молекулярной биологии.

Материалы и оборудование

таблицы генетического кода;
схемы строения ДНК, РНК, рибосом;
карточки с последовательностями нуклеотидов (ДНК, иРНК, тРНК);
наборы моделей нуклеотидов (пластиковые или бумажные);
микрокалькулятор;
лабораторный журнал для записей;
ручки, карандаши, линейки.

Теоретическая справка

Матричный биосинтез —

синтез биополимеров (нуклеиновых кислот, белков) на матрице — нуклеиновой кислоте (ДНК или РНК). Относится к пластическому обмену, требует затрат энергии АТФ.

Основные процессы матричного биосинтеза:

Репликация —

удвоение молекулы ДНК по принципу комплементарности с участием фермента ДНК-полимеразы.

Транскрипция — синтез иРНК на матрице ДНК с участием РНК-полимеразы.

Трансляция — синтез белка на рибосоме по матрице иРНК.

Ключевые понятия:

Триплет — три нуклеотида в ДНК.

Кодон — три нуклеотида в иРНК, кодирующие аминокислоту или сигнал остановки.

Антикодон — три нуклеотида в тРНК, комплементарные кодону иРНК.

Старт-кодон (АУГ) — инициирует трансляцию, кодирует метионин.

Стоп-кодона (УАА, УАГ, УГА) — завершают синтез белка.

Ход работы

Опыт 1. Моделирование репликации ДНК

Получите карточку с последовательностью одной цепи ДНК (например: 3'-ТГЦ-АТЦ-ГТА-ЦГТ-5').

Используя принцип комплементарности ($A \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow C$), достройте вторую цепь ДНК.

Запишите обе цепи, указав 5' и 3' концы.

Объясните, почему репликация называется полуконсервативной.

Опыт 2. Моделирование транскрипции

Возьмите ту же последовательность ДНК из опыта 1.

Определите транскрибируемую цепь (обычно 3'→5').

Постройте цепь иРНК по принципу комплементарности, заменяя Т на У ($A \leftrightarrow U$, $G \leftrightarrow C$).

Запишите последовательность иРНК с указанием 5' и 3' концов.

Сравните последовательности ДНК и иРНК, отметьте различия.

Опыт 3. Моделирование трансляции

Используйте полученную последовательность иРНК (например: 5'-АЦГ-УАГ-ЦАУ-ГЦА-3').

Разделите иРНК на кодоны (АЦГ, УАГ и т.д.).

С помощью таблицы генетического кода определите последовательность аминокислот.

Найдите старт-кодон и стоп-кодон, если они присутствуют.

Запишите первичную структуру синтезируемого белка (например: Тре-Стоп).

Объясните роль тРНК и рибосом в этом процессе.

Опыт 4. Решение задач на матричный биосинтез

Решите задачи:

Задача 1. Фрагмент ДНК имеет последовательность 3'-ГТА-ЦЦГ-ТАТ-ГЦА-5'. Определите последовательность иРНК и аминокислот в белке.

Задача 2. Антикодон тРНК имеет последовательность 5'-УГЦ-3'. Какой кодон иРНК ему комплементарен? Какая аминокислота будет перенесена? Используйте таблицу генетического кода.

Задача 3. В молекуле ДНК аденин составляет 20 % от общего числа нуклеотидов. Рассчитайте процентное содержание остальных нуклеотидов, используя правило Чаргаффа.

Оформление результатов

Для каждого опыта запишите исходные данные, промежуточные и конечные результаты.

Представьте результаты в виде таблиц:

Опыт	Исходная последовательность	Полученная последовательность	Результат (аминокислоты и т. д.)
Репликация	3'-ТГЦ-АТЦ-5'	5'-АЦГ-ТАГ-3'	Комплементарная цепь ДНК
Транскрипция	3'-ТГЦ-АТЦ-5'	5'-АЦГ-УАГ-3'	иРНК
Трансляция	5'-АЦГ-УАГ-3'	—	Тре-Стоп

Для задач приведите полное решение с пояснениями.

При необходимости постройте схемы процессов (репликация, транскрипция, трансляция) с подписями.

Контрольные вопросы

- 1) Что такое матричный биосинтез? Приведите примеры.
- 2) В чём заключается биологический смысл репликации?
- 3) Как происходит транскрипция? Какие ферменты участвуют?
- 4) Опишите этапы трансляции. Какова роль рибосом и тРНК?
- 5) Почему генетический код называют универсальным и вырожденным?
- 6) Что произойдёт, если в ДНК возникнет мутация (например, замена одного нуклеотида)? Как это повлияет на белок?
- 7) Как принцип комплементарности лежит в основе всех процессов матричного биосинтеза?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 16. ВОДНЫЙ ОБМЕН.

Цель работы

Изучить основные процессы водного обмена на примере растительных клеток: осмос, плазмолиз, деплазмолиз и тургор; понять механизмы перемещения воды через полупроницаемые мембраны и оценить влияние различных растворов на состояние клеток.

Материалы и оборудование

микроскоп;

предметные и покровные стёкла;

лезвие безопасной бритвы или скальпель;

фильтровальная бумага;

пинцет;

препаровальная игла;

1 М раствор NaCl;
1 М раствор KNO₃ ;
0,7 М раствор Ca(NO₃)₂ ;
дистиллированная вода;
луковица репчатого лука (Allium cepa);
стаканы или пробирки;
стеклянная палочка.

Теоретическая справка

Водный обмен в клетках регулируется осмотическими процессами — перемещением воды через полупроницаемую мембрану по градиенту осмотического потенциала. Ключевые понятия:

Осмоз —

диффузия воды из области с низкой концентрацией растворённых веществ в область с высокой.

Плазмолиз —

отделение протопласта от клеточной стенки в гипертоническом растворе из-за выхода воды.

Деплазмолиз —

восстановление нормального состояния клетки при переносе в гипотонический раствор или в воду.

Тургор —

внутреннее давление в клетке, поддерживаемое осмосом; обеспечивает упругость тканей.

Осмотический потенциал —

способность раствора притягивать воду; зависит от концентрации растворённых веществ.

Ход работы

Опыт 1. Наблюдение плазмолиза и деплазмолиза

Приготовьте микропрепарат: на предметное стекло нанесите каплю 1 М раствора NaCl и поместите в неё тонкий срез эпидермиса лука (с выпуклой стороны чешуи). Накройте покровным стеклом.

Рассмотрите препарат под микроскопом (сначала при малом, затем при большом увеличении). Найдите клетки с отчётливо видимыми стенками и протопластом.

Наблюдайте плазмолиз: протопласт отходит от клеточных стенок, форма клеток меняется. Зарисуйте несколько клеток, отметьте клеточную стенку, протопласт и пространство между ними.

Для деплазмолиза аккуратно оттяните раствор NaCl фильтровальной бумагой с одной стороны покровного стекла. Одновременно нанесите каплю дистиллированной воды с другой стороны.

Наблюдайте восстановление формы клеток. Зафиксируйте изменения в рисунке и описании.

Опыт 2. Влияние катионов на форму плазмолиза

На два предметных стекла нанесите: на первое —

каплю 1 М раствора KNO₃ , на второе — каплю 0,7 М раствора Ca(NO₃)₂ .

В каждую каплю поместите срез эпидермиса лука, накройте покровными стеклами.

Через 5–

10 минут рассмотрите препараты под микроскопом. Обратите внимание на форму плазмолиза:

в растворе KNO₃ ожидается быстрый и выраженный плазмолиз (ионы K⁺ повышают гидрофильность цитоплазмы);

в растворе Ca(NO₃)₂ плазмолиз может быть менее выраженным (ионы Ca²⁺ увеличивают вязкость цитоплазмы).

Зарисуйте клетки для обоих вариантов, подпишите тип раствора и форму плазмолиза (у голковый, вогнутый, выпуклый и т.д.).

Опыт 3. Демонстрация тургора на примере корнеплода моркови

Из середины корнеплода моркови вырежьте продольную полосу ткани шириной 8–12 мм, оставив две части корня соединёнными на 1/5 длины.

Поместите одну часть в стакан с насыщенным раствором NaCl, другую — в стакан с дистиллированной водой.

Оставьте на 1,5–2 часа.

Извлеките части корнеплода, сравните их тургор и размер.

Оформление результатов

Для каждого опыта приведите схематические рисунки клеток с подписями (клеточная стенка, протопласт, вакуоль, направление движения воды).

Заполните таблицы с наблюдениями (например, для опыта 3).

Опишите наблюдаемые явления, укажите время наступления плазмолиза, особенности его формы в разных растворах.

При необходимости приведите расчёты (например, осмотического потенциала, если это предусмотрено методикой).

Контрольные вопросы

- 1) Что такое осмос? Как он связан с водным обменом в клетках?
- 2) Почему в гипертоническом растворе происходит плазмолиз, а в гипотоническом — деплазмолиз?
- 3) Чем отличаются формы плазмолиза в растворах KNO_3 и $Ca(NO_3)_2$?
- 4) Как тургор влияет на состояние растительных тканей?
- 5) Какие факторы могут повлиять на скорость плазмолиза?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 17. МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН. МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить способы определения минеральных веществ в биоматериалах.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Минеральные вещества поступают в организм с пищей и водой. Основную часть этих соединений составляют хлористые, сернокислые, фосфорнокислые и углекислые соли калия, натрия, магния и кальция. В небольших количествах (мг, мкг) поступают йод, бром, фтор, железо, медь, марганец, цинк, кобальт, молибден и другие микроэлементы.

Минеральные вещества в организме содержатся в двух состояниях: в виде свободных ионов и в связанной с органическими веществами форме (белками, ферментами, витаминами). Что касается микроэлементов, то все они находятся в связанном состоянии (кобальт — в витамине B_{12} , медь — в тирозиназе и церулоплазмине, цинк — в карбоангидразе, в инсулине). Минеральные вещества связываются с органическими молекулами ковалентными (йод — в тиреоглобулине, в тироксине), электростатическими (магний и кальций — с различными ферментами) и координационными связями (железо — в гемопротеидах).

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФАТОВ

Фосфор в организме находится в виде неорганических солей и органических соединений (фосфорные эфиры углеводов, фосфопротеины, нуклеиновые кислоты, АМФ, АДФ, АТФ, фосфолипиды и др.). Он широко участвует в обменных процессах организма — белковом, углеводном, липидном.

1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ВОССТАНОВЛЕНИЮ ФОСФОРНО-МОЛИБДЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Принцип метода заключается в том, что после осаждения белков сыворотки в центрифугате остается неорганический фосфор, который с молибденовой кислотой образует фосфорно-молибденовую кислоту. Последняя восстанавливается эйконогеном до синего фосфорно-молибденового комплекса. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфора в сыворотке крови.

Ход работы

К 1 мл сыворотки прибавляют 4 мл дистиллированной воды, 5 мл 10% раствора

трихлоруксусной кислоты и смешивают. Выпадает осадок белков. Через 10 минут центрифугируют при 3000 об/мин. 10 минут.

К 5 мл центрифугата добавляют 1 мл 5% раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл дистиллированной воды.

Смесь оставляют на 20 минут при комнатной температуре, затем измеряют оптическую плотность на ФЭКе против контроля при длине волны 630—690 нм (красный светофильтр) в кювете толщиной слоя 1,0 см.

Контроль готовят одновременно с опытной пробой. К 2,5 мл трихлоруксусной кислоты приливают 2,5 мл воды, 1 мл молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена, 1,8 мл воды. Оставляют на 20 минут при комнатной температуре. Расчет производят по калибровочному графику.

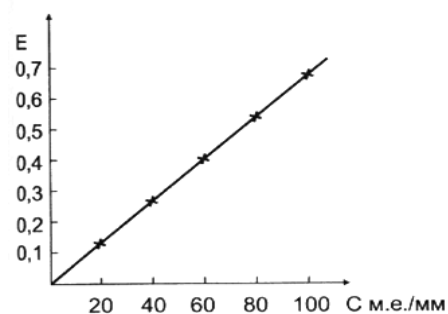
Построение калибровочного графика. Из рабочего стандартного раствора готовят разведения, как указано в таблице.

Таблица. Определение неорганического фосфора

№ пробы	Рабочий стандартный раствор, мл	Раствор трихлоруксусной кислоты, мл	Раствор молибденовокислого аммония, мл	Раствор эйконогена, мл	Дистиллированная вода, мл	Содержание фосфора в пробе	
						мг	мг%
1	0,5	2,5	1,0	0,2	3,8	0,01	2
2	1,0	2,5	1,0	0,2	3,3	0,02	4
3	2,0	2,5	1,0	0,2	2,3	0,04	8
4	3,0	2,5	1,0	0,2	1,3	0,06	12
5	4,0	2,5	1,0	0,2	0,3	0,08	16

После 20-минутного стояния пробы измеряют как опытные против контроля. На основании полученных при фотометрировании данных строят калибровочный график на миллиметровой бумаге, откладывая на оси ординат найденные величины оптической плотности, а на оси абсцисс — соответствующие им количества фосфора.

Полученные данные содержания неорганического фосфора в сыворотке записать в таблице и сопоставить с нормальными показателями.



Калибровочный график

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФАТОВ В СЛЮНЕ

Ход работы

2 мл слюны осаждают 2 мл 10% раствора ТХУ. Фильтруют.

К 2 мл фильтрата прибавляют 4 мл 5% раствора молибденовокислого аммония в 5 н. H_2SO_4 с добавлением 0,5% раствора аскорбиновой кислоты. Перемешивают и инкубируют в термостате при 45°C в течение 20 минут.

Наблюдают появление синего преходящего окрашивания, и выпадение осадка желтого цвета комплексного соединения фосфорномолибденовокислого аммония. Связать обнаружение фосфатов кальция в слюне с состоянием эмали зуба.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ

Кальций участвует в поддержании определенной проницаемости всех клеточных мембран, уменьшает уровень возбудимости нервных клеток (при недостатке его наступает перевозбуждение

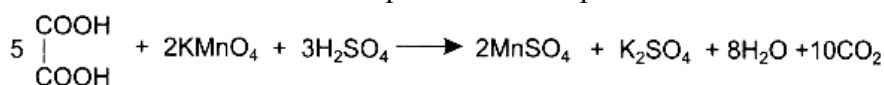
— тетания), принимает участие в свертывании крови, выполняет опорные функции, входя в состав костной ткани, активирует ряд ферментов. Всасывание кальция, поступающего с пищей, осуществляется путем связывания его со специальным белком, который находится в щеточной кайме клеток кишечного эпителия, после чего кальций транспортируется внутрь клеток. Синтез кальцийсвязывающего белка происходит в цитоплазме клеток кишечника при помощи активной формы витамина D₃ – 1,25 – (OH)₂D₃. Метод количественного определения кальция в сыворотке крови по де Ваарду основан на осаждении кальция непосредственно из сыворотки без предварительного осаждения белков в виде щавелевокислого кальция:



Оксалат кальция разлагается при нагревании с серной кислотой:



Освободившаяся щавелевая кислота оттитровывается перманганатом калия:



По количеству щавелевой кислоты, определенной титрованием перманганатом калия, выясняют количество кальция, которое было с ней связано.

Ход работы

В одну центрифужную пробирку наливают 1 мл сыворотки крови и 1 мл дистиллированной воды (опытная проба), а в другую 2 мл дистиллированной воды (контрольная проба). Эта проба служит контролем на содержание в реактивах кальция и на полноту отмывания от избытка щавелевокислого аммония.

В обе пробирки добавляют по 0,5 мл 4% раствора щавелевокислого аммония, слегка встряхивают и оставляют на 30 минут, после чего 10 минут центрифугируют. Перед центрифугированием пробирки попарно уравнивают.

Осторожно, чтобы не взмутить осадок, опрокидывают обе пробирки и сливают всю жидкость, после чего края пробирок протирают фильтровальной бумагой для полного удаления жидкости. Щавелевокислый кальций в опытной пробирке остается на дне в виде белого осадка.

Осадок щавелевокислого кальция отмывают от избытка щавелевокислого аммония и других веществ сыворотки слабым раствором аммиака (в слабощелочной среде щавелевокислый кальций нерастворим).

Для этого в обе центрифужные пробирки наливают по 2 мл 2% раствора аммиака, встряхивают и вновь центрифугируют в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливают, и промывание осадка производят еще 2 раза, повторяя манипуляции, описанные выше.

Сливают жидкость после последнего центрифугирования, и в обе пробирки вносят по 1 мл 1 н. раствора серной кислоты для растворения осадка щавелевокислого кальция. Осадки размешивают стеклянными палочками и, не вынимая их, помещают пробирки в нагретую водяную баню на 2 минуты.

Горячий раствор титруют при помешивании палочками из микробюретки 0,01 н. раствором перманганата до появления слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение одной минуты.

Расчет производят по формуле:

$$x = (a - b) \cdot 0,2 \cdot 100,$$

где x — количество кальция в сыворотке крови, мг%; a — количество 0,01 н. раствора марганцовокислого калия, израсходованное на титрование опытной пробы, мл; b — количество 0,01 н. раствора марганцовокислого калия, потраченное на титрование контрольной пробы, мл; 0,2 — количество кальция, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора перманганата, мг; 100 — коэффициент для пересчета на 100 мл сыворотки.

Если содержание кальция желательно выразить в ммоль/л, то полученное значение (x)

умножают на 0,25.

Результаты определения занести в таблицу. Сопоставить полученные данные с нормальными величинами содержания кальция в сыворотке крови.

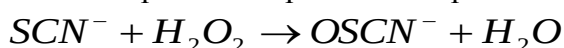
3. ОБНАРУЖЕНИЕ РОДАНИДОВ В СЛЮНЕ

Роданиды слюны обнаруживают по появлению красного окрашивания при добавлении к слюне хлорного железа. Это типичная и чувствительная реакция на роданиды обусловлена образованием роданистой соли трехвалентного железа в результате взаимодействия ионов Fe^{3+} и SCN^- и образования различных комплексов, имеющими состав от $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{NCS}^{2+}$ до $\text{Fe}(\text{NCS})_6^{3-}$. Некоторые органические соединения, например, соли лимонной и уксусной кислот, препятствуют образованию окраски.

Ход работы

К 5 каплям слюны добавляют 2 капли 2% раствора HCl и 2 капли 0,01% раствора FeCl_3 . Развивается красное окрашивание.

В гранулоцитах локализован фермент лактопероксидаза, которая окисляет имеющийся в слюне роданид с помощью перекиси водорода бактериального происхождения в гипотиоционат:



Гипотиоционат чрезвычайно бактерициден и совместно с H_2O_2 или ее радикалами действует антикариесогенно. Содержание роданидов велико в слюне курильщиков, что связано с поступлением в их организм синильной кислоты табачного дыма.

При составлении протокола сравните интенсивность окраски роданида железа в слюне курильщика и у некурящих табак.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ И ФОСФОРА В ТКАНИ ЗУБА

В построении зуба принимают участие три вида плотных тканей: эмаль, дентин, цемент.

Неорганические вещества зубной ткани представлены главным образом гидроксиапатитом $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$. Это малорастворимые кристаллы с высокой механической прочностью обеспечивают опорную функцию костной и зубной тканей. Находящиеся в кристаллической решетке гидроксильные ионы могут обмениваться на ионы фтора и хлора с образованием фторапатита $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{CaF}_2$ и хлорапатита $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{CaCl}_2$.

Ход работы

1. Для исследования минерального состава зуба необходимо растворить минеральные вещества (преимущественно апатиты) в соляной кислоте. Для этого навеску в 0,5 г зуба помещают в колбу и добавляют 30 мл 10% раствора соляной кислоты. Содержимое колбы кипятят на сетке под тягой.

2. Когда зуб полностью растворится, содержимое колбы охлаждают и переносят количественно в мерную колбу или цилиндр на 50 мл. Объем жидкости доводят до 50 мл, добавляя дистиллированную воду. Полученный гидролизат используют для качественного обнаружения кальция и фосфора и их количественного определения.

3. Качественная реакция на кальций. К 2 мл гидролизата приливают избыток насыщенного раствора щавелевокислого аммония до выпадения белого кристаллического осадка оксалата кальция.

4. Качественная реакция на фосфор. К 2 мл гидролизата прибавляют избыток раствора молибденовокислого аммония и нагревают. Образуется фосфорномолибденовокислый аммоний, окрашивающий жидкость в желтый цвет. При дальнейшем нагревании появляется желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

5. Количественное определение кальция. 1 мл гидролизата (содержит 0,01 г зуба) вносят в центрифужную пробирку, добавляют 3 капли индикатора метилового красного и нейтрализуют жидкость разбавленным аммиаком до появления оранжевого окрашивания.

6. Для осаждения кальция наливают 3 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония и оставляют пробирку на 30 минут, после чего осадок отделяют центрифугированием (предварительно уравнив пробирки) и сливают надосадочную жидкость, не взмучивая осадка.

7. Осадок промывают разбавленным аммиаком. Для этого в пробирку после удаления надосадочной жидкости приливают 5 мл разбавленного аммиака, перемешивая осадок стеклянной

палочкой, и центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают описанным выше способом, осадок еще один или два раза промывают разбавленным аммиаком.

8. После последнего промывания осадок растворяют в 3 мл разбавленной серной кислоты и на водяной бане подогревают пробирку до 70°C. Горячую жидкость титруют 0,05 н. раствором марганцовокислого калия до слабо-розового цвета.

9. Параллельно ставят и обрабатывают как опыт контрольную пробу, взяв вместо 1 мл гидролизата 1 мл дистиллированной воды.

10. Содержание кальция в зубе вычисляют по формуле:

$$x = \frac{B \cdot 1 \cdot 10000}{1000},$$

где x — содержание кальция в зубе, в %;

B — количество марганцовокислого калия, использованное на титрование опыта после вычета контроля, мл;

1 — количество мг кальция, эквивалентное 1 мл 0,05 н. раствора перманганата;

10000 — коэффициент для пересчета на 100 г зуба;

1000 — коэффициент для пересчета мг в г.

11. Количественное определение фосфора. 0,5 мл гидролизата вносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют дистиллированной воды до метки и перемешивают содержимое.

12. 5 мл разбавленного гидролизата (содержит 0,25 мг зуба) переносят в пробирку (или колбочку), прибавляют 1 мл 5% раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл дистиллированной воды.

13. Пробирку оставляют на 20 минут при комнатной температуре, затем измеряют оптическую плотность на ФЭКе против контроля при длине волны 630—690 нм (красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см.

14. Одновременно с опытной пробой готовят контроль. Для этого 0,3 мл 10% раствора соляной кислоты (соответствует концентрации 10% HCl в 0,5 мл гидролизата) вносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют воды до метки и перемешивают содержимое. 5 мл жидкости отмеривают в пробирку (или колбочку), добавляют 1 мл 5% раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл дистиллированной воды. Оставляют стоять при комнатной температуре на 20 минут.

15. Расчет производят по калибровочному графику с учетом разведения и по формуле:

$$x = \frac{A \cdot 100}{0,25} = A \cdot 400$$

где x — содержание фосфора, %; A — количество фосфора, найденное по калибровочному графику, мг; 0,25 — количество ткани зуба, отвечающее 5 мл разбавленного гидролизата, взятым для колориметрирования, мг; 100 — коэффициент для пересчета на 100 мг зубной ткани.

Содержание фосфора в зубе составляет около 15%.

Вычислить содержание кальция и фосфора в зубной ткани и полученные данные занести в таблицу. В выводах сопоставить содержание кальция и фосфора в разных биологических объектах.

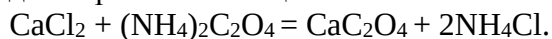
5. ИССЛЕДОВАНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА КОСТИ

При действии на кость соляной кислоты минеральная часть кости растворяется, остаток состоит в основном из белков. Кости заливают 5%-ным раствором соляной кислоты и оставляют на сутки или более. Затем солянокислую вытяжку, содержащую минеральные соли, сливают, органическую часть кости (оссеин) заливают водой. Органическую часть кости, представляющую собой в основном костный коллаген, вынимают из воды, измельчают ножом и промывают длительное время водой. Затем кипятят с водой и получают, поскольку был исключен процесс золки, техническую желатину. В солянокислой вытяжке, полученной при мацерации кости, содержатся кальций, магний, железо, фосфорная кислота, калий, натрий, фтор.

5.1. РЕАКЦИЯ НА КАЛЬЦИЙ

Открытие кальция основано на нерастворимости щавелевокислого кальция, образующегося

при воздействии на растворимые соли кальция щавелевокислым аммонием. В солянокислой вытяжке кальций находится в виде хлористого кальция

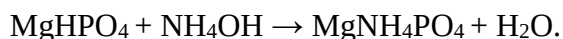


Ход работы

В пробирку с 5 мл солянокислой вытяжки приливают 2—3 мл 5%-ного раствора щавелевокислого аммония, встряхивают и наблюдают за образованием белого осадка щавелевокислого кальция.

5.2. РЕАКЦИЯ НА МАГНИЙ

Открытие магния основано на образовании двойной фосфорноаммонийной магниевой соли в фильтрате после удаления кальция в виде щавелевокислой соли (CaC_2O_4 отфильтровывают). Так как магний бывает связан главным образом с фосфорной кислотой, то обычно достаточно добавить только гидрат аммония



В фильтрате после удаления кальция в виде щавелевокислого кальция (CaC_2O_4) и магния в виде фосфорноаммонийномагниевой соли (MgNH_4PO_4) открывают оставшуюся фосфорную кислоту. Для этого к фильтрату добавляют магниезальную смесь, выпадает осадок (MgNH_4PO_4).

Ход работы

Наличие фосфорной кислоты в полученном осадке проверяют молибденовокислым аммонием ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$). Осадок растворяют в небольшом количестве 10%-ного раствора азотной кислоты и нагревают с 3 мл $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ на водяной бане. В присутствии фосфорной кислоты после охлаждения выпадает осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Роль минеральных веществ для организма человека.
2. Какие элементы относят к макроэлементам.
3. Какие элементы относят к микроэлементам.
4. Какие элементы относят к ультрамикроэлементам.
5. Способы определения минеральных веществ.
6. Регуляция водно-солевого обмена.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №18. ГОРМОНЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить классификацию и общие механизмы действия гормонов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

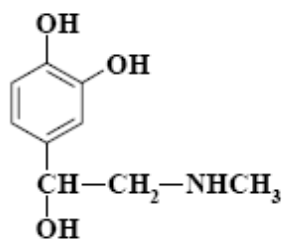
Гормоны представляют собой биологически активные, жизненно необходимые органические вещества, вырабатываемые органами (железами) внутренней секреции в незначительных количествах. По химической природе гормоны являются:

- белками (гормоны гипофиза, поджелудочной и парашитовидных желез).
- производными аминокислот (адреналин, тироксин).
- стероидами (гормоны коркового вещества, надпочечников и половые).

Биологическое значение гормонов заключается в их регулирующем действии на самые различные процессы в организме. Они поддерживают постоянство внутренней среды (гомеостаз), влияют на скорость химических реакций, физиологические функции, механизмы иммунитета, психическую деятельность, половое развитие и др.

1. ОБНАРУЖЕНИЕ АДРЕНАЛИНА

Адреналин, L-1-(3',4'-диоксифенил)-2-метиламиноэтанол (5) - гормон коры надпочечников. Играет большую роль в процессе передачи нервного возбуждения, влияет на сердечно-сосудистую систему (вызывает значительное повышение кровяного давления, увеличение частоты сердечных сокращений и минутного объема сердца). Усиливает гликогенолиз в мышцах и печени, что приводит к повышению уровня глюкозы в крови и увеличению образования молочной кислоты в мышцах.



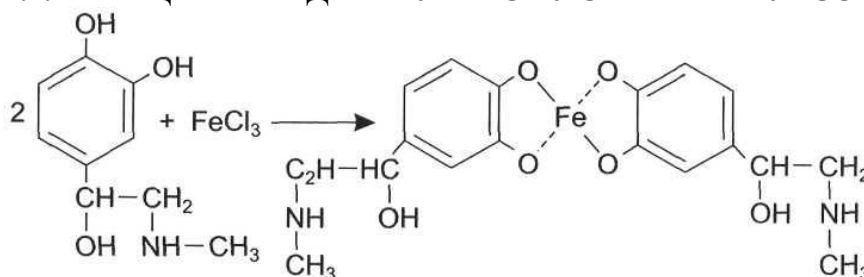
адреналин

Ход работы

1.1. РЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН С ЙОДАТОМ КАЛИЯ

В пробирку вносят 2-3 капли раствора адреналина (1:100), 2 капли 10% раствора KIO_3 и 2 капли 10% раствора уксусной кислоты, жидкость слегка нагревают. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

1.2. РЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН С ХЛОРНЫМ ЖЕЛЕЗОМ



В пробирку вносят 2-3 капли адреналина (1:100) и каплю 1% хлорного железа. Жидкость в пробирке принимает яркое изумрудно-зеленое окрашивание, постепенно переходя в желтоватое. Если к изумрудно-зеленому раствору прибавить 1 каплю концентрированного раствора аммиака, то окраска быстро переходит в зеленую и затем в коричневую.

1.3. ДИАЗОРЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН

При взаимодействии диазореактива с адреналином, жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

В пробирку вносят 3 капли 1% раствора сульфаниловой кислоты, 3 капли 5% раствора азотистокислого натрия, 5 капель раствора адреналина (1:100) и 3 капли 10% раствора углекислого натрия. Жидкость краснеет.

1.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НИТРИТНО-МОЛИБДЕНОВОГО РЕАКТИВА

Используют нитритно-молибденовый реактив (5 г нитрита натрия и 5 г молибдата натрия растворить в 50 мл дистиллированной воды).

В пробирку наливают 1 мл водного раствора адреналина, 1 мл 5% раствора соляной кислоты, 1 мл нитритно-молибденового реактива. Смесь перемешивают. Возникает желто-оранжевое окрашивание. При добавлении нескольких капель 10% раствора едкого натра появляется малиново-красная окраска, переходящая при внесении нескольких капель концентрированной соляной кислоты в лимонно-желтую.

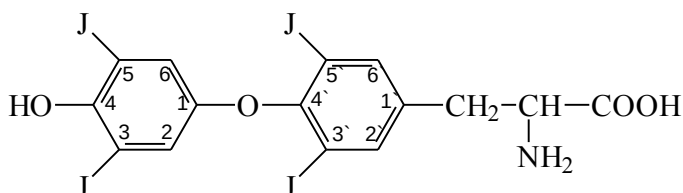
1.5. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО НАЛИЧИЯ ЯДРА ПИРОКАТЕХИНА В АДРЕНАЛИНЕ

Ход работы

В одну пробирку наливают 2 мл раствора адреналина, в другую - 2 мл пирокатехина. В обе пробирки добавляют несколько капель раствора хлорида железа - в обеих появляется изумрудно-зеленое окрашивание.

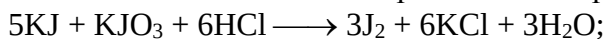
2. РЕАКЦИЯ НА ГОРМОНЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ТИРОКСИН)

Гормон щитовидной железы.



Гипофункция щитовидной железы в раннем детском возрасте приводит к болезни, которая в литературе известна как кретинизм. При этом заболевании происходит остановка роста, резко снижается скорость обменных процессов, отмечаются глубокие нарушения психики. Недостаточная функция щитовидной железы в зрелом возрасте приводит к развитию микседемы. Заболевание характеризуется нарушением водно-солевого, основного и жирового обменов. Повышенная функция щитовидной железы вызывает развитие базедовой болезни. При этом заболевании происходит резкое повышение обмена веществ, сопровождающегося усиленным распадом тканевых белков. Наблюдается отрицательный азотистый баланс. У больных развивается общее истощение организма, а также психические расстройства.

При щелочном гидролизе тироксина образуется йодистый калий, из которого йод можно вытеснить йодноватистокислым калием. Йод дает синее окрашивание с крахмалом:



$\text{J}_2 + \text{крахмал} \longrightarrow \text{синее окрашивание}$

Ход работы

В фарфоровой ступке измельчают 5 таблеток тиреоидина. Образованную массу переносят в колбу с помощью 5 мл воды, добавляют 5 мл 10% раствора едкого калия и кипятят 15 мин на электрической печи с асбестовой сеткой. К 3 мл охлажденного гидролизата добавляют 10% раствор серной кислоты до кислой реакции по лакмусу. Затем приливают 5 капель 1 % раствора крахмала и 1 мл раствора йодата калия для окисления йодида калия. Молекулярный йод, который выделяется, дает синее окрашивание с крахмалом. Напишите уравнение реакции.

3. ОБНАРУЖЕНИЕ ИНСУЛИНА

Инсулин - гормон, вырабатываемой поджелудочной железой животных и человека. Он регулирует содержание сахара (глюкозы) в крови. При его недостатке развивается весьма распространенное заболевание – сахарный диабет (гипергликемия). Инсулин является главным лекарственным препаратом для лечения этого заболевания и основное его количество производится экстракцией из поджелудочной железы сельскохозяйственных животных (свиней, крупного рогатого скота). Инсулин образуется в (β-клетках островков Лангерганса из своего предшественника — проинсулина.

3.1.ОБНАРУЖЕНИЕ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИЕЙ

По химической природе он является белком. Полипептидные цепи соединены в двух точках дисульфидными мостиками. Инсулин дает почти все характерные цветные реакции на белок.

Ход работы

В пробирку к 5 каплям раствора инсулина прибавляют 5 капель 10% раствора едкого натра и 1 кашпо 1% раствора сернокислой меди. Перемешивают, встряхивают. Наблюдают появление фиолетового окрашивания. Объяснить механизм реакции, сделать выводы.

3.2.ОБНАРУЖЕНИЕ РЕАКЦИЕЙ С СУЛЬФОСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

В пробирку вносят 1 мл раствора инсулина, добавляют 5 капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Наблюдают выпадение осадка белого цвета. Объяснить механизм реакции, сделать вывод.

3.3.ОБНАРУЖЕНИЕ РЕАКЦИЕЙ ФОЛЯ

В термостойкую пробирку вносят 5 капель раствора инсулина, 5 капель 30% раствора едкого натра и 1-2 капли 5% раствора уксуснокислого свинца. При длительном нагревании жидкость в пробирке бурлит и выпадает черный осадок сернистого свинца. Объяснить механизм реакции, сделать вывод.

3.4. ОБНАРУЖЕНИЕ РЕАКЦИЕЙ ГЕЛЛЕРА

К 10 каплям концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки приливают равный объем (10 капель) раствора инсулина. Пробирку наклоняют под углом 45° так, чтобы жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей образуется белый аморфный осадок в виде небольшого кольца.

4. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Половые гормоны играют важную роль в обмене веществ и способствуют возникновению вторичных половых признаков. Они вырабатываются половыми железами – семенниками и

яичниками. К важнейшим женским половым гормонам относятся эстрадиол, эстрон (фолликулин) и эстриол.

РЕАКЦИЯ НА ФОЛЛИКУЛИН (ЭСТРОН)

Фолликулин влияет на обмен белков, углеводов, нуклеиновых кислот, ускоряет окисление жиров в тканях и образование высокомолекулярных жирных кислот.

Ход работы

4.1. РЕАКЦИЯ С КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

В пробирку наливают 20-30 капель спиртового раствора фолликулина и помещают ее в кипящую баню на 5-10 минут для удаления спирта. К оставшемуся в пробирке фолликулину добавляют 20 капель концентрированной серной кислоты и пробирку вновь помещают в кипящую баню на 4-10 минут. Жидкость окрашивается в соломенно-желтый цвет, а при нагревании в оранжевый.

4.2. ОБРАЗОВАНИЕ ФЕНОЛЯТА ФОЛЛИКУЛИНА

В две сухие пробирки приливают по 0,5 мл раствора фолликулина. В первую добавляют 1 мл воды и отмечают образование эмульсии фолликулина. Во вторую, добавляют такое же количество 30%-ного раствора гидроксида натрия — помутнения не возникает, так как в щелочной среде происходит образование фенолята фолликулина.

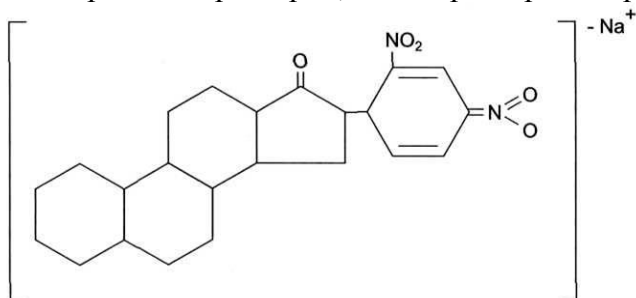
4.3. РЕАКЦИЯ НА ФЕНОЛЬНУЮ ГРУППУ

К 2 мл раствора фолликулина добавляют 1 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и 1 мл реактива Фолина. Возникает синее окрашивание, характерное для фенольной группы.

5. ГОРМОНЫ КОРКОВОГО СЛОЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Кортикостероиды имеют в основе своего строения кольцо циклопентанпергидро-фенантрена. Они синтезируются в корковом слое надпочечников из ацетилкоэнзима А (активная форма уксусной кислоты, источником которой являются как углеводы, так и липиды) или из холестерина. Важнейшим промежуточным продуктом является прогестерон. Из прогестерона образуются также женские (эстрогены) и мужские (андрогены) половые гормоны.

Основными нейтральными 17-кетостероидами, встречающимися в моче человека, являются андростерон, этиохоланолон, дегидроэпиандростерон, эпиандростерон и др.



Реакция открытия 17-кетостероидов в моче основана на способности 17-кетостероидов давать в щелочной среде с мета-динитробензолом продукт конденсации красного или красно-фиолетового цвета за счет метиленовой группы (CH₂), соседней с кетогруппой. Интенсивность окраски пропорциональна количеству находящихся в моче 17-кетостероидов.

Ход работы

1. В пробирку вносят 5 капель мочи, добавляют 5 капель 30% раствора гидроксида натрия и 5 капель 2% раствора мета-динитробензола.

2. Содержимое пробирки смешивают и оставляют стоять на несколько минут. При стоянии появляется красное окрашивание, обусловленное наличием 17-кетостероидов в моче. Сделать вывод.

6. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА КОРТИЗОЛ

6.1. С СОЛЯНОКИСЛЫМ ФЕНИЛГИДРАЗИНОМ

Благодаря наличию карбонильных групп кортизон, преднизолон, реагируя с фенилгидразином, образуют гидразон и озазон.

Ход работы

К 1 мл раствора преднизолон прибавляют 5 мл раствора фенилгидразина и нагревают на

водяной бане. Через несколько минут появляется желтое окрашивание.

6.2. С РЕАКТИВОМ ФЕЛИНГА

Кортизон и преднизолон способны восстанавливать закись меди из солей окиси.

Ход работы

К 1 мл раствора преднизолона прибавляют 1 мл реактива Фелинга, нагревают на спиртовке. Выпадает красный осадок закиси меди.

Результаты работы оформить в виде таблицы.

Таблица. Исследование гормонов

Название желез внутренней секреции	Гормон, выделяемый железой	Химическое строение гормона	Исследуемый материал	Реактивы	Что наблюдается	Чем обусловлена реакция

Отметить роль исследуемых гормонов в обмене веществ, проявление гипер- и гипofункции соответствующих желез внутренней секреции. В выводах сопоставить химизм проделанных качественных реакций с химической природой изучаемых гормонов или с наличием в их молекуле характерных группировок.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Химическая природа гормонов.
2. Кто из ученых занимался изучением гормонов.
3. Применение гормонов.
4. Принцип действия гормонов. Характеристика гормонов по классам.
5. Стероидные гормоны. Примеры, значение.
6. Пептидные гормоны. Примеры, значение.
7. Прочие гормоны. Примеры, значение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 19. ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ.

ТРАНСАМИНИРОВАНИЕ АЛЬФА-АМИНОКИСЛОТ

В основе метода лежит реакция трансаминирования в мышечной ткани. В качестве субстратов используют глутаминовую и пировиноградную кислоты:

Ход работы

В две пробирки (опытную и контрольную) наливают по 0,5 мл растворов пировиноградной и глутаминовой кислот, по 1 мл раствора монобромуксусной кислоты (для предотвращения гликолиза). В обе пробирки добавляют по 0,5 г свежей мышечной кашицы. В контрольную пробирку тотчас приливают 3 мл раствора уксусной кислоты и эту пробу кипятят на водяной бане 2—3 мин для инактивации ферментов. Пробирки помещают в термостат на 1,5 ч, периодически помешивая их стеклянными палочками. По окончании инкубации пробы вынимают из термостата. В опытную пробу добавляют 0,3 мл раствора уксусной кислоты и кипятят ее на водяной бане 2—3 мин. Отфильтровывают содержимое каждой пробы через маленький фильтр в чистую пробирку, отмечая ее соответствующим номером.

Подготавливают хроматографическую пластинку. Отступая 1 см от края пластинки, отмечают четыре точки. В первую точку наносят капилляром раствор глутаминовой кислоты, во вторую — аланина (т.е. растворы «свидетелей»), в третью — опытной пробы, в четвертую — контрольной пробы. Нанесение растворов производят обязательно чистыми капиллярами. Растворы опытной и контрольной пробы наносят два-три раза в одну и ту же точку, предварительно просушив на воздухе каплю, нанесенную в первый раз, для того, чтобы увеличить концентрацию аминокислот в месте нанесения. Хроматограммы помещают в хроматографическую камеру и хроматографируют в бутилово-уксусно-водной смеси (4:1:5). Хроматограммы высушивают и проявляют в растворе нингидрина. Затем прогревают в сушильном шкафу при 100° С.

Окрашенные пятна аминокислот обводят карандашом (т.к. пятна обесцвечиваются), рассчитывают R_f и сравнивают интенсивность пятен глутаминовой кислоты и аланина в опытной и контрольной пробах (табл.). Записывают принцип метода, реакцию трансаминирования, расчет R_f для пятен аминокислот, делают выводы, хроматограмму подклеивают к протоколу.

Таблица. Идентификация аминокислот по величинам R_f при хроматографии (в бутилово-уксусно-водной смеси 4 : 1 : 5)

Аминокислота	R_f
Цистин	0,05
Цистеин	0,08
Лизин	0,10
Гистидин	0,11
Аргинин	0,12
Аспарагиновая кислота	0,15
Серин	0,16
Глицин	0,17
Глутаминовая кислота	0,18
Треонин	0,19
Аланин	0,25
Пролин	0,27
Тирозин	0,28
Триптофан	0,43
Метионин	0,44
Валин	0,45
Фенилаланин	0,53
Изолейцин	0,59
Лейцин	0,61
Норлейцин	0,63

Контрольные вопросы

- 1) Что такое метаболизм? Какие два взаимосвязанных процесса он объединяет?
- 2) Дайте определение ассимиляции (пластического обмена) и диссимиляции (энергетического обмена). Приведите по 2–3 примера каждого процесса.
- 3) В чём заключается основная взаимосвязь между ассимиляцией и диссимиляцией? Как они зависят друг от друга?
- 4) Какую роль играет АТФ в обмене веществ? Почему его называют «энергетической валютой» клетки?
- 5) Как связаны процессы дыхания и фотосинтеза у растений с точки зрения обмена веществ?

Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)

Перечень основной литературы

1. Любимова Н.В., Бабкина И.В.; Тимофеев Ю.С. Проведение биохимических исследований –учебник. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2024. – 256 с.
2. Базовый курс биохимии // Под ред. А.И. Глухова, А.Е. Губаревой. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 584 с.
3. Лелевич, С. В. Клиническая биохимия: — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 304 с. — ISBN 978-5-8114-5146-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133476>

Перечень дополнительной литературы

1. Клиническая лабораторная диагностика: сборник ситуационных задач: учебное пособие

- / Е. Г. Бутолин, В. Г. Иванов, М. В. Терещенко, В. В. Максимова. — 2-е изд. стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2024. — 108 с. — ISBN 978-5-507-47622-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/398480>
2. Биохимия: учебное пособие / А. В. Стрыгин, Б. Е. Толкачев, А. М. Доценко, Е. И. Морковин. — Волгоград : ВолгГМУ, 2022. — 132 с. — ISBN 978-5-9652-0820-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/338252>
3. Клиническая биохимия: учебное пособие / Т. П. Бондарь, К. С. Светлицкий, Н. И. Ковалевич [и др.]. — Ставрополь: СтГМУ, 2020. — 204 с. — ISBN 978-5-89822-635-0. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/216803>
4. Биохимические исследования в клинической практике: Руководство для врачей / А.А. Кишкун. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2014. — 528 с.: ил.
5. Основы биохимического анализа: лабораторный практикум : учебное пособие / составители О. С. Котлярова, С. М. Чыдым. — Новосибирск : НГАУ, 2020. — 77 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/257708>
6. Лелевич, С. В. Теория и практика лабораторных биохимических исследований : учебное пособие для спо / С. В. Лелевич. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 304 с. — ISBN 978-5-507-50169-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/414779>
7. Сборник ситуационных задач по клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / О. С. Абрамовских, И. В. Батигова, И. А. Лаптева [и др.]. — Челябинск : ЮУГМУ, 2023. — 101 с. — ISBN 978-5-94507-261-9. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/442340>
8. Карпенко, Л. Ю. Биологическая химия : учебное пособие / Л. Ю. Карпенко, А. А. Бахта, А. И. Козицына. — Санкт-Петербург : СПбГУВМ, 2022. — 228 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/366575>
9. Кузнецов, О. Е. Лабораторные исследования в клинике : учебное пособие для спо / О. Е. Кузнецов, С. А. Ляликов. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 500 с. — ISBN 978-5-507-51527-1. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/422633>
10. Лабораторный практикум по биохимии для студентов лечебного и педиатрического факультетов : учебное пособие / О. Л. Носарева, Е. А. Степовая, Е. В. Шахристова, Л. В. Спирина. — 3-е изд., доп. и испр. — Томск : СибГМУ, 2023. — 165 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/369047>

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
для обучающихся по организации и проведению самостоятельной работы
по дисциплине «ОБЩАЯ БИОХИМИЯ»
для студентов специальности 30.05.01 Медицинская биохимия

Введение

Для современного специалиста важно формирование системных фундаментальных знаний, умений и навыков по биохимическим закономерностям, представляющих важность при подготовке студентов медиков к системному восприятию естественнонаучных и профессиональных дисциплин, формировании у них навыков биохимического анализа, необходимых для последующей практической деятельности.

Целью данного пособия является формирование общепрофессиональных компетенций будущего специалиста по специальности 30.05.01 Медицинская биохимия.

Знания, полученные в ходе освоения дисциплины, применяются при написании выпускной квалификационной работы, при прохождении преддипломной практики, а также в дальнейшей профессиональной деятельности.

Общая характеристика самостоятельной работы студента при изучении дисциплины «Общая биохимия»

Самостоятельная работа проводится в виде самостоятельного изучения литературы и подготовки заданий. Основной целью этих видов самостоятельной работы является улучшение профессиональной подготовки специалистов высшей квалификации, направленное на формирование действенной системы фундаментальных и профессиональных знаний, умений и навыков, которые они могли бы свободно и самостоятельно применять в практической деятельности.

В ходе организации самостоятельной работы решаются следующие задачи:

- Показать связь между структурой и функцией ферментов; биологическое значение ферментов.
- Сформировать у студентов представления о ферментах, нарушение работы которых приводит к наследственным заболеваниям человека.
- Ознакомить со способами выделения и очистки ферментов.
- Обучить технике современного биохимического анализа, методам оценки и выбору методов анализа, адекватных поставленной задаче.

В ходе постановки целей и задач необходимо учитывать, что их выполнение направлено не только на формирование общеучебных умений и навыков, но и определяется рамками данной предметной области.

Общая характеристика самостоятельной работы студента при изучении дисциплины «Общая биохимия»

Самостоятельная работа проводится в виде самостоятельного изучения литературы и подготовки заданий. Основной целью этих видов самостоятельной работы является улучшение профессиональной подготовки специалистов высшей квалификации, направленное на формирование действенной системы фундаментальных и профессиональных знаний, умений и навыков, которые они могли бы свободно и самостоятельно применять в практической деятельности.

В ходе организации самостоятельной работы решаются следующие задачи:

- Показать связь между структурой и функцией белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов; биологическое значение витаминов.
- Сформировать у студентов представления о процессах переноса и реализации генетической информации, нарушение которых приводит к наследственным заболеваниям человека; основах биоэнергетики; метаболических путях и основных механизмах регуляции обмена углеводов, липидов, аминокислот, нуклеотидов.
- Ознакомить со способами обезвреживания токсических веществ в организме, применяя знания механизмов обезвреживания эндогенных веществ и чужеродных соединений.
- Обучить технике современного биохимического анализа, методам оценки и выбору методов анализа, адекватных поставленной задаче.

В ходе постановки целей и задач необходимо учитывать, что их выполнение направлено не только на формирование общеучебных умений и навыков, но и определяется рамками данной предметной области.

Методические рекомендации по изучению теоретического материала

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала курса «Биохимия» студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины в библиотеке СКФУ. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных. Все это поможет в решении задач, тестировании и подготовке к зачету.

Методические указания по подготовке к лабораторным занятиям

При подготовке к практическим занятиям рекомендуется изучить контрольные вопросы по данному занятию, теоретический материал, изложенный в пособии, обратить внимание на технику безопасности и изучить методику проведения опытов. В протоколе должны быть отражены следующие разделы:

1. Номер занятия.
2. Название работы.
3. Цель работы.
4. Принцип метода и химический механизм реакций.
5. Расчеты.
6. Результаты.
7. Выводы.

Методические рекомендации по подготовке к индивидуальным заданиям

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала курса студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины в библиотеке СКФУ. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных. Все это поможет в решении задач, тестировании и подготовке к контрольным точкам.

Методические рекомендации при подготовке к докладам

Изучение основных разделов заканчивается разработкой творческих заданий, на которых обобщается весь материал по данной части учебной программы.

Творческие задания представляет собой не только одну из форм текущего контроля, но и одну из активных форм учебных занятий, проводимых как в виде беседы преподавателя со студентами, так и в виде занятия, посвященного обсуждению определенной темы.

Целями творческих заданий являются: выяснение у студентов знаний, их углубление (повышение) и закрепление по той или иной теме курса; формирование у студентов навыков анализа теоретических проблем на основе самостоятельного изучения учебной и научной литературы.

Основная задача творческих заданий – пробудить у студента стремление к чтению и использованию дополнительной литературы. На занятия могут выносятся как проблемные

(нередко спорные теоретические вопросы), так и вопросы, требующие самостоятельного изучения, а также более глубокой проработки.

На самостоятельную подготовку к творческому заданию студенту отводится 1-2 недели. Подготовка включает в себя изучение рекомендованной литературы и составление конспекта.

Методические указания к тестам

Самостоятельные ответы на вопросы, как и решение задач существенно дополняют лекции и самостоятельно пройденный материал по дисциплине. В процессе анализа и решения задач студенты расширяют и углубляют знания, полученные из лекционного курса и учебников, учатся глубже понимать биохимические законы и формулы, разбираться в их особенностях, границах применения, приобретают умение применять общие закономерности к конкретным случаям. В процессе решения задач вырабатываются навыки вычислений, работы со справочной литературой, таблицами. Решение задач не только способствует закреплению знаний и тренировке в применении изучаемых законов, но и формирует особый стиль умственной деятельности, особый метод подхода к биохимическим явлениям.

На занятиях используются:

1) задачи-упражнения, помогающие студентам приобрести твёрдые навыки расчёта и вычислений;

2) задачи для демонстрации практического применения тех или иных законов;

3) задачи для закрепления и контроля знаний;

4) познавательные задачи.

Несмотря на различие в видах задач, их решение можно проводить по следующему общему плану, который надо продиктовать студентам:

1. прочесть условие задачи; посмотреть, все ли термины в условиях задачи известны и понятны (если что-то неясно, следует обратиться к учебнику, просмотреть решения предыдущих задач, посоветоваться с преподавателем);

2. написать схему реакции, если это необходимо;

3. установить, какие законы и соотношения могут быть использованы при решении данной задачи;

4. составить уравнения, которые характеризуют рассматриваемые явления с количественной стороны;

5. решить эти уравнения относительно неизвестных величин, получить ответ.

Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)

Перечень основной литературы

1. Любимова Н.В., Бабкина И.В.; Тимофеев Ю.С. Проведение биохимических исследований – учебник. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2024. – 256 с.

2. Базовый курс биохимии // Под ред. А.И. Глухова, А.Е. Губаревой. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 584 с.

3. Лелевич, С. В. Клиническая биохимия: — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 304 с. — ISBN 978-5-8114-5146-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133476>

Перечень дополнительной литературы

1. Клиническая лабораторная диагностика: сборник ситуационных задач: учебное пособие / Е. Г. Бутолин, В. Г. Иванов, М. В. Терещенко, В. В. Максимова. — 2-е изд. стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2024. — 108 с. — ISBN 978-5-507-47622-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/398480>

2. Биохимия: учебное пособие / А. В. Стрыгин, Б. Е. Толкачев, А. М. Доценко, Е. И. Морковин. — Волгоград : ВолгГМУ, 2022. — 132 с. — ISBN 978-5-9652-0820-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/338252>

3. Клиническая биохимия: учебное пособие / Т. П. Бондарь, К. С. Светлицкий, Н. И. Ковалевич [и др.]. — Ставрополь: СтГМУ, 2020. — 204 с. — ISBN 978-5-89822-635-0. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/216803>
4. Биохимические исследования в клинической практике: Руководство для врачей / А.А. Кишкун. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2014. — 528 с.: ил.
5. Основы биохимического анализа: лабораторный практикум : учебное пособие / составители О. С. Котлярова, С. М. Чыдым. — Новосибирск : НГАУ, 2020. — 77 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/257708>
6. Лелевич, С. В. Теория и практика лабораторных биохимических исследований : учебное пособие для спо / С. В. Лелевич. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 304 с. — ISBN 978-5-507-50169-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/414779>
7. Сборник ситуационных задач по клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / О. С. Абрамовских, И. В. Батигова, И. А. Лаптева [и др.]. — Челябинск : ЮУГМУ, 2023. — 101 с. — ISBN 978-5-94507-261-9. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/442340>
8. Карпенко, Л. Ю. Биологическая химия : учебное пособие / Л. Ю. Карпенко, А. А. Бахта, А. И. Козицына. — Санкт-Петербург : СПбГУВМ, 2022. — 228 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/366575>
9. Кузнецов, О. Е. Лабораторные исследования в клинике : учебное пособие для спо / О. Е. Кузнецов, С. А. Ляликов. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 500 с. — ISBN 978-5-507-51527-1. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/422633>
10. Лабораторный практикум по биохимии для студентов лечебного и педиатрического факультетов : учебное пособие / О. Л. Носарева, Е. А. Степовая, Е. В. Шахристова, Л. В. Спирина. — 3-е изд., доп. и испр. — Томск : СибГМУ, 2023. — 165 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/369047>

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
для обучающихся по организации и проведению практических занятий
по дисциплине «ОБЩАЯ БИОХИМИЯ»
для студентов специальности 30.05.01 Медицинская биохимия

5 семестр
Тема1
ВВЕДЕНИЕ В БИОХИМИЮ. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ
ВОПРОСЫ
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какую лабораторную посуду применяют в биохимии?
2. Правила мытья лабораторной посуды.
3. Какое лабораторное оборудование используют в биохимии? Какие анализы на этом оборудовании можно провести.
4. Калибровка мерной посуды.
5. Какие международные системы единиц (СИ) используются в лабораторной практике?
6. Методы расчета экспериментальных данных.
7. Какие ошибки возможны при расчетах?
8. Приведите примеры приготовления растительных образцов.
9. Приведите примеры приготовления образцов из тканей животных.

ТЕМА 2,3
АМИНОКИСЛОТЫ И ПЕПТИДЫ
ВОПРОСЫ

- №1.** Напишите структурную формулу тетрапептида (Н) тир-глу-гли-вал (ОН) и последовательно подействуйте на него химотрипсином и карбоксипептидазой А. Назовите образовавшиеся продукты реакций.
- №2.** Напишите структурные формулы всех аминокислот состава $C_3H_7NO_2$ и назовите их.
- №3.** Приведите структурные формулы всех аминотрикарбоновых кислот.
- №4.** Напишите изомерные аминокислоты, отличающиеся строением скелета.
- №5.** Приведите примеры аминокислот, у которых преобладают: а) кислотные свойства; б) основные свойства.
- №6.** Напишите уравнения реакций, доказывающих амфотерность аланина.
- №7.** Приведите уравнение реакции образования соединений с пептидной связью.
- №8.** Сколько дипептидов может быть получено из трех аминокислот.
- №9.** Сколько трипептидов может быть получено из двух аминокислот?
- №10.** Напишите, какие аминокислоты можно получить, замещая один из атомов водорода в метильной группе аланина различными группировками.
- №11.** Напишите химические формулы гетероциклических аминокислот. Дайте им названия по тривиальной и рациональной номенклатурам. Укажите, какие реакции возможны по радикалам названных аминокислот.
- №12.** Напишите и дайте название тетрапептиду из валина, лизина, глутаминовой кислоты и триптофана.
- №13.** Объясните принципы цветных реакций на белки и аминокислоты: биуретовой, нингидриновой, ксантопротеиновой, на тирозин, на серосодержащие аминокислоты.
- №14.** Напишите тетрапептид
- | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| Асп-фен-глу-гис | Тир-цис-лиз-вал | Вал-три-гли-арг |
|-----------------|-----------------|-----------------|
- №15.** Напишите тетрапептид
- | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ала-тир-лиз-глу | Гис-ала-лиз-мет | Асп-гис-тир-тре |
|-----------------|-----------------|-----------------|
- №16.** Напишите тетрапептид
- | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| Асп-вал-мет-сер | Тре-цис-глу-иле | Лей-лиз-три-асп |
|-----------------|-----------------|-----------------|
- №17.** Напишите тетрапептид
- | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| Гис-асп-ала-лиз | Глу-мет-лей-ала | Фен-тре-гли-цис |
|-----------------|-----------------|-----------------|
- №18.** Напишите названия и формулы всех трипептидов, которые можно получить из следующих аминокислот: глицина, фенилаланина, лейцина. (В молекулу трипептида можно брать каждую из

названных аминокислот только по одному разу).

№19. Напишите химические формулы серосодержащих аминокислот и дайте им названия по тривиальной и рациональной номенклатурам. Укажите, какие реакции возможны по радикалам названных аминокислот.

№20. Напишите названия и формулы всех трипептидов, которые можно получить из следующих аминокислот: валина, триптофана, аспарагиновой кислоты. (В молекуле трипептида можно брать каждую из аминокислот только по одному разу.)

№21. Напишите реакцию взаимодействия с азотистой кислотой ряда аминокислот: а) оксипролина; б) тирозина; в) глицина.

№22. Напишите реакцию взаимодействия аминокислоты с формальдегидом.

№23. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Содержание углерода (%) в белках. Б. Содержание азота (%) в белках.

№24. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Содержание отрицательно заряженных групп в молекуле аминокислоты в изоэлектрической точке. Б. Содержание положительно заряженных групп в молекуле аминокислоты в изоэлектрической точке.

№25. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Растворимость альбуминов в воде. Б. Растворимость глобулинов в воде.

№26. Фосфопротеиды содержат в качестве небелковой части остаток фосфорной кислоты, которая образует сложноэфирные группировки за счет гидроксильных групп серина, треонина, тирозина, входящих в состав полипептидной цепи. Напишите схему реакций присоединения фосфорной кислоты к следующим фрагментам рибонуклеазы: а) Сер-Гли-Тре-Сер-Глу; б) Тир-Лпз-Сер-Гли-Тре.

№27. Напишите уравнения реакций синтеза следующих дипептидов: а) глицилглицина, б) аланилвалина, в) глициллейцина, г) валилсерина.

№28. Напишите уравнения реакций синтеза следующих трипептидов: а) глицилаланилаланина, б) глицилглицилаланина, в) аланилцистеинилвалина, г) изолейцилвалилглутамин.

№29. Сколько различных трипептидов можно синтезировать из аминокислот глицина, валина и серина, если использовать каждую аминокислоту только один раз?

№30. Какое из указанных веществ является пептидом? Дайте ему название: а) $H_2N-CH_2-C=O$ б) $H_2N-CH_2-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH_2-COOH$ в) $CH_3-H_2C-CH_2-CH_3$ г) $H_2N-CO-CH_2-CH_3$.

№31. Напишите и назовите формулы дипептидов, которые могут быть получены из аминокислот: а) треонина и цистеина, б) фенилаланина и аспарагина, в) аргинина и лейцина.

№32. Напишите формулы следующих трипептидов:

а) аланилглицилаланина, б) лейцилглицилаланина, в) аланиллейцилглицина.

№33. Напишите названия и формулы всех трипептидов, которые можно получить из следующих аминокислот: а) аланин, аланин, аланин, б) глицин, глицин, аланин, в) глицин, лейцин, аланин. В молекулу три пептида можно брать каждую из названных трех молекул только по одному разу.

№34. Напишите структурную формулу тирозина. Дайте название этой аминокислоте по номенклатуре ИЮПАК.

№35. Напишите формулу метионина. Название аминокислоты по номенклатуре ИЮПАК.

№36. Напишите структурную формулу пентапептида следующего строения: Цис - Арг - Фен - Глу - Три.

Тема 4 БЕЛКИ Вопросы

- №1.** Что такое белок и какова его биологическая роль? Как связаны аминокислоты между собой в молекуле белка?
- №2.** В каких пределах варьируется молекулярный вес белков? Методы определения молекулярного веса белков.
- №3.** Какие свойства положены в основу классификации белков?
- №4.** Назовите связи, стабилизирующие первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры.
- №5.** Чем обусловлены реакции осаждения белков? При каких температурных условиях возможно осаждение белков?
- №6.** Что такое изоэлектрическая точка? Почему она различна у разных белков? Назвать белки основного и кислого характера.
- №7.** Что такое денатурация и ренатурация? Чем может быть вызвана денатурация белков?
- №8.** Методы количественного определения аминокислот.
- №9.** При помощи каких цветных реакций можно установить различные аминокислоты?
- №10.** Классификация аминокислот. Физические свойства аминокислот. Химические свойства аминокислот.
- №11.** Очистка белков от низкомолекулярных примесей.
- №12.** Теоретические основы хроматографического разделения аминокислот.
- №13.** Какими методами можно освободить раствор белка от низкомолекулярных веществ? Как доказать, что при диализе белок остается в целлофановом мешочке, а ионы соли находятся в диализирующей жидкости?
- №14.** Физические свойства белковых веществ.
- №15.** Способы гомогенизации биологического материала. Как осуществляется экстракция белков? Методы фракционирования белков. Методы очистки белков.
- №12.** Какие существуют группы сложных белков? Какова их роль в организме и где они встречаются?

Тема 5 НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ Вопросы

- №1.** Перечислите основные отличия РНК от ДНК.
- №2.** Какие продукты образуются при: а) частичном; б) полном гидролизе нуклеиновых кислот?
- №3.** Какой из нуклеозидов имеет наименьшее число атомов кислорода в молекуле? Напишите его структурную формулу.
- №4.** Какой из нуклеотидов имеет наименьшее число атомов кислорода в молекуле? Напишите его структурную формулу.
- №5.** Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.
А. Содержание ДНК в ядре. Б. Содержание ДНК в других субклеточных структурах.
- №6.** Напишите формулы следующих нуклеозидтрифосфатов: а) ГТФ - гуанозинтрифосфат, б) УТФ - уридинтрифосфат, в) ЦТФ - цитидинтрифосфат.
- №7.** Напишите уравнение реакции кислотного гидролиза аденозин-5-трифосфата в соответствии со схемой: $АТФ \rightarrow \text{пирофосфат} + \text{аденин} + \text{рибозо-5-фосфат}$.
- №8.** Мононуклеотиды под влиянием ферментов отщепляют или присоединяют фосфатные группы. Под влиянием аденилаткиназы идет реакция: $АТФ + АМФ \rightarrow 2АДФ$ Напишите полное уравнение этой реакции.
- №9.** Нуклеотиды под влиянием ферментов подвергаются гидролизу. Аденозинмонофосфат при

участии фермента АМФ-нуклеозидазы образует аденин и D-рибозо-5-фосфат. Напишите уравнение этой реакции.

№10. Нуклеотиды под влиянием ферментов распадаются, при этом отщепляются остатки фосфорной кислоты и получаются соединения, состоящие из основания и углевода. Такие вещества: из гуаниловой - гуанозин, из цитидиловой - цитидин, из уридиловой - уридин. Напишите формулы названных нуклеозидов.

№11. При кислотном гидролизе нуклеозидов: аденозина, гуанозина, цитидина и уридина образуются основания (соответственно аденин, гуанин, цитозин, урацил) и D-рибоза. Напишите уравнения этих реакций.

№12. Нуклеозиды и основания, входящие в состав моонуклеотидов, подвергаются гидролизу при воздействии на них соответствующих ферментов. При этом выделяется аммиак. Напишите уравнения реакций гидролиза оснований:

а) цитозин + $H_2O \rightarrow$

б) аденин + $H_2O \rightarrow$

в) гуанин + $H_2O \rightarrow$

№13. Напишите уравнение реакции гидролиза аденозина в соответствии со схемой:

аденозин + $H_2O \rightarrow$ инозин + NH_3

№14. Напишите уравнение реакции гидролиза цитидина в соответствии со схемой:

цитидин + $H_2O \rightarrow$ уридин + NH_3

№15. Напишите уравнение реакции гидролиза гуанозина в соответствии со схемой:

гуанозин + $H_2O \rightarrow$ ксантозин + NH_3

№16. Напишите формулы следующих моонуклеотидов: а) инозин-5-фосфат, б) ксантозин-3-фосфат, в) тимидин-3-фосфат.

№17. Напишите уравнения реакций распада моонуклеотида в соответствии со схемой: аденозин $\rightarrow$ гипоксантин $\rightarrow$ мочевая кислота.

№18. Напишите в двух таутомерных формах каждое из следующих оснований: гуанин, урацил, тимин и цитозин.

№19. В составе моонуклеотидов встречаются две пентозы: D-рибоза и D-дезоксирибоза. Напишите их формулы.

№20. Напишите формулу моонуклеотида, в котором основанием является урацил, а углеводом дезоксирибоза.

№21. Напишите формулу динуклеотида, входящего в состав ДНК, в котором в качестве оснований были бы аденин и гуанин.

№22. Для удобства написания формул нуклеозидов пользуются их сокращенными буквенными обозначениями: А - аденозин, Г - гуанозин, Т - дезокситимидин, Ц - цитидин, У - уридин. Напишите используя условное написание для нуклеозидов и обозначая остаток фосфорной кислоты буквой р (малое), полинуклеотидную цепочку записывают в таком виде: рАрЦрЦрТрАрГрА.

№23. Напишите формулу фрагмента ДНК, выраженную сокращенной формулой - рАрЦрТ, и схему реакции расщепления этого фрагмента до нуклеозидов.

Тема 6 ВИТАМИНЫ Вопросы

№1. Предскажите химические свойства ценного фармацевтического сырья — никотиновой кислоты. Напишите по одному уравнению реакции, характеризующий свойства функциональной группы, гетероатома и ароматической системы.

№2. Сколько изопреновых единиц содержится в молекуле:

а) β -каротина; б) витамина Е; в) витамина А.

№3. Что такое витамины? Когда и кем они открыты? Классификация витаминов.

№4. Какие витамины относятся к группе жирорастворимых? Примеры.

№5. Какова структура витаминов группы "А" и их физико-химические свойства? Какие из известных провитаминов обладают наибольшей активностью витамина А и как они используются в организме?

№6. Витамин D, его химическое строение, биологическая роль, источник и провитамины. Какие стероиды и при каких условиях синтезируются в витамин D в организме?

№7. Каковы физико-химические свойства никотиновой кислоты?

№8. Каково строение рибофлавина? Его распространение в природе и участие в обмене веществ?

№9. Какова химическая природа тиамина? Пищевые источники этого витамина.

№10. Какие свойства аскорбиновой кислоты и 2,6-дихлорфенолиндифенола лежат в основе количественного определения витамина С? Почему титрование витамина С ведут в кислой среде? Какие продукты образуются при окислении витамина С?

№11. В чем заключается принцип метода количественного определения витамина Р?

№12. В чем биологическая роль водорастворимых витаминов?

№13. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Суточная потребность человека в витамине А. Б. Суточная потребность человека в витамине С.

№14. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме А > Б, Б > А; А = Б.

А. Количество витаминов у витамина Д? Б. Количество витаминов у витамина К.

Тема 7 ФЕРМЕНТЫ

1. Определение и общая характеристика

Ферменты (энзимы) —

биологические катализаторы белковой природы, присутствующие во всех живых клетках и ускоряющие биохимические реакции. Термин происходит от лат. fermentum («закваска») и греч. en zyme («в дрожжах»).

Ключевые свойства ферментов:

высокая каталитическая активность (ускоряют реакции в 10⁶–10¹² раз);

специфичность действия;

регулируемость активности;

работа в мягких условиях (температура ~37 °С, нормальное давление, нейтральный pH);

почти 100 % выход продуктов без побочных реакций;

чувствительность к изменениям температуры и pH.

2. Строение ферментов

Ферменты могут быть:

простыми белками (состоят только из аминокислот);

сложными белками (имеют белковую часть — апофермент — и небелковую — кофактор или кофермент).

Кофакторы:

ионы металлов (Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ и др.);

органические соединения (производные витаминов).

Активный центр —

участок фермента, непосредственно взаимодействующий с субстратом. Образован аминокислотными остатками из разных участков полипептидной цепи.

3. Специфичность ферментов

Модели специфичности:

«Замок и ключ» (Р. Фишер, XIX в.) — жёсткое соответствие структуры фермента и субстрата.

«Индукцированное соответствие» (Д. Кошланд, 1959 г.) — при связывании субстрата фермент меняет конформацию, обеспечивая оптимальное взаимодействие.

Типы специфичности:

абсолютная (один субстрат);

групповая (субстраты сходной структуры);

стереоспецифичность (работа с определённым изомером).

4. Механизм действия ферментов

Этапы ферментативной реакции:

Образование фермент-субстратного комплекса ($E+S \leftrightarrow ES$).

Превращение субстрата в активированном комплексе ($ES \rightarrow ES^*$).

Образование продукта реакции ($ES^* \rightarrow EP$).

Отделение продукта от фермента ($EP \rightarrow E+P$).

Роль фермента —

снижение энергии активации реакции за счёт стабилизации переходного состояния.

Тема 8 УГЛЕВОДЫ Вопросы

№1. Укажите какие из пар сахаров представляют собой анамеры, эпимеры или пару альдзо-кетоза и напишите их формулы:

а) α -глюкоза - β -глюкоза

б) глюкоза – галактоза

в) глицероальдегид - дегидроксиацетон

г) глюкоза - манноза

д) глюкоза – фруктоза

№2. Выберите правильный ответ и напишите структурные формулы:

Представителями пентоз являются:

а) диоксиацетон

б) рибоза

в) сахароза

г) фруктоза

№3. Выберите правильный ответ и напишите структурные формулы:

Представителями гексоз являются:

а) целлюлоза

б) глюкоза

в) лактоза

г) галактоза

№4. Подберите названия к перечисленным углеводам и напишите их формулы:

а) лактоза; б) мальтоза; в) сахароза; г) ни один из углеводов

1) глюкоза- α ,1,2-фруктоза; 2) глюкоза- α 1,4-глюкоза; 3) фруктоза- β 1,6-галактоза; 4) галактоза- β 1,4-глюкоза

№5. Нарисуйте проекционные формулы Фишера следующих моносахаридов:

а) L- глюкозы; б) α - D – глюкофуранозы; в) D – галактозы; гд) β - L- галактопиранозы; д) L- маннозы; е) α - D – маннопиранозы.

№6. Нарисуйте формулы Хеуорса и кресловидные конформации для следующих моно и дисахаридов:

а) α -D-глюкопиранозы; б) α -L-фруктофуранозы; в) β -L-маннопиранозы; г) O- α -L-глюкопиранозил-(1,4)- β -D-маннопиранозы; д) O- β -D-глюкофуранозил-(1,1)- α -L-галактопиранозы.

№7. Почему фруктоза дает положительную реакцию с реактивом Фелинга, а сахароза нет? Приведите примеры реакций.

№8. Напишите структурные формулы:

рибозо-5-фосфата, ксилулозо-5-фосфата, глюкозо-6-фосфата, галактозо-1-фосфата, фруктозо-1,6-

дифосфата.

№9. Напишите структурную формулу дисахарида, состоящего из двух остатков глюкозы, связанных между собой α -1,4-гликозидной связью. Как называется этот дисахарид?

№10. Какие химические реакции подтверждают тот факт, что глюкоза - вещество с двойственной химической функцией?

№11. Приведите реакции, с помощью которой можно различить глюкозу и фруктозу.

№12. Напишите уравнение реакции брожения глюкозы, при котором не выделяются газообразные продукты.

№13. Дезоксиуглеводы - это аналоги углеводов, в которых одна группа -ОН заменена на атом водорода. Определите молекулярную формулу дезоксирибозы. Напишите уравнения ее реакций водородом и аммиачным раствором оксида серебра.

№14. Приведите структурную формулу мальтозы, которая представляет собой дисахарид, образованный двумя остатками α -глюкозы связанными между собой через первый и четвертый атомы углерода.

№15. Какие продукты могут образоваться при частичном и полном гидролизе крахмала.

№16. На чём основаны методы определения углеводов?

№17. Хроматографические основы определения углеводов.

№18. Классификация углеводов. Значение углеводов для человека.

№19. Дайте общую характеристику углеводов, укажите их классификацию.

№20. Для какого типа строения дисахаридов - мальтозного (а) или трегалозного (б) - характерны редуцирующие свойства?

№21. Дайте характеристику гомополисахаридов, назовите представителей. Напишите формулы.

№22. Какие вещества относятся к гетерополисахаридам? Укажите их состав.

№23. Чем объяснить, что дисахарид лактоза может существовать в двух аномерных формах, а у другого дисахарида - сахарозы - аномерных форм не обнаружено?

№24. Какими особенностями строения обусловлены различия в свойствах полисахаридов целлюлозы и гликогена?

№25. С помощью каких химических реакций можно из глюкозы получить фруктозу?

№26. Среди углеводов различают моносахариды - соединения, не способные к гидролизу на простые составные части, и ди- и полисахариды - более сложные соединения, способные к такому гидролизу. Какие из перечисляемых ниже углеводов относятся к дисахаридам - углеводам, распадающимся при гидролизе на два моносахарида: фруктоза, мальтоза, крахмал, сахароза?

№27. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, А > А, А = Б.

А. Количество глюкозы, полученной при гидролизе 1 моль лактозы. Б. Количество глюкозы, полученной при гидролизе 1 моль мальтозы.

№28. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, А > А, А = Б.

А. Число α -1,4-гликозидных связей в молекуле гликогена. Б. Число α -1,6-гликозидных связей в молекуле гликогена.

№29. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, А > А, А = Б.

А. Содержание амилозы в крахмале. Б. Содержание амилопектина в крахмале.

№30. А. Что такое кольчатоцепная таутомерия? Б. Напишите формулы моносахаридов в циклической форме (проекционные формулы Хеуорса): а) пентоз; б) гексоз.

№31. Напишите структурные формулы: а) α -D-глюкопиранозы; б) β -D-глюкопиранозы.

№32. Напишите структурные формулы дисахаридов: а) трегалозы; б) мальтозы.

№33. Напишите строение: а) амилозы; б) амилопектина; в) целлюлозы.

№34. Напишите строение: а) хитина; б) гиалуроновой кислоты; в) хондроитинсульфата; г) гепарина.

- №35.** Напишите формулы: а) D-глицеральдегид-β-фосфата; б) дигидроксиацетонфосфата.
- №36.** Напишите структурные формулы: а) α-рибофуранозы; б) α-дезоксирiboфуранозы.
- №37.** Напишите формулы: а) D- и L-глицеринового альдегида, б) диоксиацетона.
- №38.** Напишите формулу α- и β-рибозы. Напишите формулу дезоксирибозы в ее открытой и в циклической форме.
- №39.** Напишите формулы α- и β-глюкозы.
- №40.** Напишите циклические формулы (в виде формул Хеуорзса) следующих гексоз: а) фруктозы, б) маннозы, в) галактозы.
- №41.** β-D-Фруктофураноза в растворе находится в равновесии с β-D-фруктопиранозой. Напишите обе эти формулы.
- №42.** Важную роль в обмене играют фосфорные эфиры глюкозы. Напишите в циклической форме формулы: а) глюкозо-1-фосфата, б) глюкозо-6-фосфата.
- №43.** При брожении дрожжевого сока накапливается эфир фруктозо-1,6-дифосфат, являющийся обязательным продуктом распада глюкозы. Напишите формулу фруктозо-1,6-дифосфата.
- №44.** Напишите уравнение окисления мальтозы аммиачным раствором окиси серебра.
- №45.** Напишите формулы мальтозы и целлобиозы, используя пиранозные циклы. Укажите в этих молекулах их восстанавливающиеся и невосстанавливающиеся концы.
- №46.** Под влиянием сахаразы свекловичный или тростниковый сахар распадается на моносахариды. Напишите уравнение гидролиза свекловичного сахара.
- №47.** Мальтоза, получаемая из крахмала, гидролизуеться под влиянием фермента α-глюкозидазы, образуя глюкозу. Напишите уравнение гидролиза мальтозы.
- №48.** Сколько разных форм глюкозы вам известно? Напишите их структурные формулы. Различаются ли разные формы глюкозы составом молекул или их строением?
- №49.** Глюкозидаза гидролизует глюкозиды: α-D-глюкозид + H₂O → спирт + D-глюкоза Напишите уравнение гидролиза α-D-этилглюкозида.
- №50.** Фермент трегалаза осуществляет гидролиз трегалозы: трегалоза + H₂O → глюкоза Напишите уравнение этой реакции.
- №51.** Напишите фрагмент молекулы крахмала (из четырех-пяти звеньев) и уравнение гидролиза крахмала до образования мальтозы. Обратите внимание на расположение кислородных мостиков и группы –CH₂ОН в соседних глюкозных звеньях молекулы крахмала. Укажите редуцирующийся и нередуцирующийся концы фрагмента молекулы крахмала и мальтозы.
- №52.** Молекулы гликогена построены из звеньев глюкозы и обладают разветвленным строением. Первый атом углерода одного звена глюкозы связан с шестым атомом углерода другой цепи. У гликогена боковые цепи следуют друг за другом на расстоянии от 3 до 5 звеньев. Напишите фрагмент разветвленной формулы гликогена.
- №53.** Лактоза - дисахарид, содержащийся в молоке, под влиянием β-глюкозидазы гидролизуеться до составляющих ее моносахаридов - галактозы и глюкозы. Напишите уравнение гидролиза лактозы.

Тема 9

ЛИПИДЫ

Вопросы

- №1.** Изобразите формулы следующих соединений: а) олеолиноленостеарин, б) пальмитохолестерин. К какой группе природных соединений относятся данные вещества? Что общего между ними и чем они отличаются друг от друга?
- №2.** Приведите схему гидролиза триолеина.
- №3.** Какое общее свойство объединяет вещества, относящиеся к группе липидов?
- №4.** Перечислите основные свойства лецитина.
- №5.** С помощью каких реакций можно обнаружить холестерин?
- №6.** Какой химический процесс лежит в основе прогоркания жиров?

- №7.** Определение понятия "липиды". Биологическая роль липидов. На чем основа классификация липидов?
- №8.** От чего зависит жирнокислотный состав ацилглицеринов?
- №9.** Характеристика фосфолипидов, какие их свойства используют при выделении?
- №10.** Какова химическая природа желчных кислот?
- №11.** Почему растительные масла, как правило, жидкие при комнатной температуре, а животные жиры твердые?
- №12.** Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.
А. Устойчивость восков к действию света и окислителей. Б. Устойчивость жиров к действию света и окислителей.
- №13.** В составе триацилглицеролов имеется пальмитиновая (П), олеиновая (О) и стеариновая (С) кислоты. Укажите все возможные виды триацилглицеролов (используя сокращенные обозначения).
- №14.** Сколько изопреновых единиц содержится в структуре: а) сквалена; б) β -каротина; в) витамина А?
- №15.** Какие продукты образуются в результате мягкого щелочного гидролиза: а) 1-стеароил-2,3-дипальмитоилглицерола; б) 1-стеароил-2-элаидолфосфатидилинозита; в) 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидил-холина?
- №16.** Напишите формулы следующих триглицеридов:
а) тристеарина, б) трипальмитина, в) триолеина.
- №17.** Напишите формулы смешанных триглицеридов: а) диолеопальмитина, б) пальмитолеостеарина, в) дипальмитостеарина.
- №18.** Молекулы нейтральных жиров могут содержать три различные жирные кислоты. Напишите формулу такого триглицерида.
- №19.** Под влиянием катализатора (никеля или омедненного никеля) остатки непредельных кислот, входящих в состав жиров, присоединяют водород. В результате этой гидрогенизации жидкие жиры становятся твердыми. Напишите уравнения гидрирования следующих триглицеридов: а) олеодистеарина, б) диолеопальмитина, в) олеолиноленостеарина.
- №20.** Ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав животных жиров, всегда являются только цис-изомерами. Напишите структурные формулы цис-изомеров трех непредельных кислот, входящих в состав жира.
- №21.** Жироподобные вещества - фосфатиды являются производными фосфатидной кислоты. Сама фосфатидная кислота является производным глицерина, в котором имеются два остатка жирных кислот и один остаток фосфорной кислоты. Напишите формулу фосфатидной кислоты.
- №22.** Фосфатиды являются производными фосфатидной кислоты, в которых группа -ОН фосфорной кислоты образует эфир с аминокислотами (холином, коламином) или аминокислотой. Напишите формулы следующих фосфатидов: а) лецитина (фосфатидилхолин), б) кефалина (фосфатидилколамин), в) серинфосфатида (фосфатидилсерин).
- №23.** Напишите уравнение реакции гидролиза тристеарина.
- №24.** Гидролиз лецитина идет в три стадии: 1) отщепление жирных кислот, 2) отщепление холина, 3) отщепление фосфорной кислоты. Напишите уравнения реакции последовательного расщепления лецитина.
- №25.** Под влиянием некоторых ферментов (змеиного яда) от молекулы лецитина отщепляется ненасыщенная кислота и образуется лизолецитин. Он обладает сильным гемолитическим действием, разрушает эритроциты крови. Напишите уравнение реакции образования лизолецитина.
- №26.** В пчелином воске содержится эфир пальмитиновой кислоты и мирицилового спирта. Напишите формулу этого эфира.
- №27.** В нервных окончаниях вырабатывается ацетилхолин (медиатор - передатчик нервного

возбуждения). Ацетилхолин является уксуснокислым эфиром холина. Напишите формулу ацетилхолина.

№28. Главным звеном в молекуле стерина желчных кислот и других веществ является циклопентан пергидрофенантрен. Холевая кислота является 3,7,12-триоксихолановой кислотой, а дезоксихолановая - 3,12-диоксихолановой. Напишите формулы холевой и дезоксихолановой кислот.

№29. Парная кислота гликохолевая является соединением холевой и гликохола. Напишите формулу гликохолевой кислоты.

№30. Гликодезоксихолановая кислота, участвующая в эмульгировании жиров, является соединением дезоксихолановой кислоты с гликохолом. Напишите формулу гликодезоксихолановой кислоты.

№31. Желчные парные кислоты таурохолевая и тауродезоксихолановая являются соединением соответственно холевой и дезоксихолановой кислот с таурином. Напишите их формулы.

№32. Из фитостерина (растительные стерин) особый интерес представляет эргостерин (содержится в грибах, дрожжах). По своему строению он отличается от холестерина тем, что имеет не одну, а три двойные связи в молекуле (между 5-м и 6-м, 7-м и 8-м, 22-м и 23-м атомами углерода). Напишите формулу эргостерина.

№33. Сколько разных взаимных расположений радикалов может быть у простого эфира, полученного из глицерина и имеющего 3 разные группы $-OR_1$; $-OR_2$; $-OR_3$?

№34. Напишите структурные формулы двух возможных изомеров жира, в состав которого входят один остаток пальмитиновой и 2 остатка стеариновой кислоты.

№35. В состав свиного жира входят триглицериды: трипальмитин, триолеин, пальмитидолеин, пальмитостеаринолеин. Напишите формулы перечисленных триглицеридов.

№36. В кокосовом и пальмовом маслах найдены стеаридипальмитин, олеидипальмитин, миридидипальмитин и пальмидимиристин. Напишите формулы перечисленных триглицеридов.

№37. Напишите формулы лауриновой, миристиновой, пальмитоолеиновой, арахидоновой кислот.

№38. Напишите формулы холестана, холестанола, холестерола, холевой кислоты. Укажите возможную генетическую взаимосвязь между перечисленными соединениями.

№39. Напишите формулы холестеролпальмитата, эргостеролстеарата и стигмастерололеата.

6 семестр

Тема 10.

БИОЭНЕРГЕТИКА. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

Вопросы

№1. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Число молекул АТФ, синтезированных дышащими эритроцитами в аэробных условиях. Б. Число молекул АТФ, синтезированных теми же эритроцитами в анаэробных условиях.

№2. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Окислительно-восстановительный потенциал системы цитохром b (Fe^{2+}) → цитохром b (Fe^{3+}).

Б. Окислительно-восстановительный потенциал системы цитохром с (Fe^{2+}) → цитохром с (Fe^{3+}).

№3. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Окислительно-восстановительный потенциал системы цитохром с (Fe^{2+}) → цитохром с (Fe^{3+}). Б.

Окислительно-восстановительный потенциал системы цитохром а-а₃ (Cu^+) → а-а₃ (Cu^{2+}).

№4. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Число молей АТФ, синтезируемых при апотомическом окислении углеводов. Б. Число молей АТФ, синтезируемых при гликолизе.

№5. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Число молекул АТФ, синтезирующихся при брожении. Б. Число молекул АТФ, синтезирующихся при гликолизе.

№6. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$. А. Число молей АТФ, образующихся при биологическом окислении яблочной кислоты в щавелевоуксусную. Б. Число молей АТФ, образующихся при биологическом окислении янтарной кислоты в фумаровую.

№7. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Энергетический эффект полного окисления молекулы гексозы. Б. Энергетический эффект полного окисления молекулы тристеарина.

№8. Напишите формулу простетической группы цитохрома типа b.

№9. Приведите схему расположения основных компонентов дыхательной цепи митохондрий.

№10. Укажите ферменты, принимающие участие в превращениях:

а) яблочная кислота $\rightarrow$ щавелевоуксусная кислота;

б) 3-фосфоглицериновый альдегид $\rightarrow$ фосфодиоксиацетон.

Тема 11

МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ

Вопросы

№1. Сколько молекул АТФ образуется по гликолитическому пути при расщеплении 1 молекулы глюкозы и 1 молекулы гликозильного остатка гликогена?

№2. Каков выход АТФ при полном окислении в аэробном процессе: а) 1 молекулы уксусной кислоты? б) 1 молекулы глюкозы?

№3. Многие соединения синтезируются в реакциях гликолиза и ЦТК или из родственных соединений. Используя в качестве субстрата ПВК, укажите реакции, ведущие к образованию следующих соединений: а) аспарагиновая кислота; б) молочная кислота; в) ацетоуксусная кислота

№4. Радиоактивную глюкозу, меченную углеродными атомами в положении 3 и 4 инкубировали в анаэробных условиях с гомогенатом печени. В каких положениях будут находиться изотопные атомы углерода в образующемся лактате?

№5. Радиоактивную глюкозу, меченную углеродными атомами в положении 1 инкубировали с ферментами гликолиза. Укажите в каком положении будет содержаться в образующейся ПВК изотопный атом углерода?

№6. Какое количество АТФ может образоваться за счет окисления каждого из субстратов, если принять, что гликолиз, ЦТК и окислительное фосфорилирование полностью активны?

а) ПВК; б) НАДН; в) фруктоза-1,6-дифосфат; г) фосфоенолпируват; д) глюкоза.

№7. Напишите уравнение равновесного состояния для образования гликогена из галактозы.

№8. Напишите уравнение равновесного состояния для образования глюкозы из фруктозы в печени.

№9. Напишите уравнение равновесного состояния для превращения глицерола в ПВК.

№10. Сколько АТФ образуется при распаде глюкозы до молочной кислоты?

№11. Правильны ли утверждения?

а) мобилизация гликогена – его распад до глюкозы?

б) при распаде глюкозы до H_2O и CO_2 образуется 35 молекул АТФ?

в) при окислительном декарбоксилировании ПВК образуется молочная кислота?

г) при анаэробном распаде глюкозы образуется 36 молекул АТФ?

№12. На каком этапе анаэробного гликолиза используются 2 молекулы АТФ и синтезируется 6 молей АТФ (суммарный эффект 4 молей АТФ)

глюкоза $\rightarrow$ 2 ПВК; 2) глицеральдегид $\rightarrow$ ПВК; 3) глюкоза $\rightarrow$ 2-фосфоглицерат; 4) 3-

фосфоглицерат → ПВК; 5) фруктоза-6-фосфат → 2 ПВК

№13. Источником атомов углерода в глюкозе не может быть:

1) аспартат; 2) CO_2 ; 3) глицерин; 4) малат; 5) ацетил-КоА

№14. Напишите схемы реакций с использованием структурных формул субстратов и продуктов и с указанием ферментов, катализирующих данные реакции: а) Глюкоза + АТФ → Глюкозо-6-фосфат; б) Фруктозо-1,6-дифосфат → 3-Фосфоглицериновый альдегид + Фосфодиоксиацетон; в) 3-Фосфоглицериновая кислота → 2-Фосфоглицериновая кислота; г) Фосфоенолпировиноградная кислота + АДФ → Пировиноградная кислота + АТФ; д) Пировиноградная кислота + НАДН + H^+ → Молочная кислота + НАД;

№15. Из схемы глюконеогенеза выберите реакции, ускоряемые ферментами, относящимися к классу гидролаз.

№16. Напишите схемы реакций, катализируемых: а) гликогенфосфорилазой; б) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой; в) лактоназой; г) транскетолазой; д) трансальдолазой.

№17. Напишите схемы реакций, назовите ферменты, ускоряющие указанные реакции, и определите класс ферментов: а) Глюкоза + АТФ → Глюкозо-6-фосфат; б) Глюкозо-1-фосфат → Глюкозо-6-фосфат; в) Молочная кислота + НАД⁺ → Пировиноградная кислота + НАДН + H^+ ; г) Аланин + H_2O → Молочная кислота + NH_3 ; д) Аланин → Этиламин + CO_2 .

№18. С помощью каких реакции можно осуществить следующие превращения: сахароза → глюкоза → глюконовая кислота?

№19. В чём разница при определении моносахаридов и полисахаридов?

№20. К каким классам относятся ферменты, катализирующие реакции цикла трикарбоновых кислот?

№21. Каков энергетический эффект окисления глюкозы в аэробном процессе?

№22. Как осуществляется окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты?

№23. Напишите процесс распада пировиноградной кислоты в аэробных условиях?

№24. Какое строение имеет гликоген? Каков механизм синтеза гликогена?

№25. В каких случаях расходуется гликоген, для каких нужд организма? Каков механизм распада гликогена? Какие конечные и промежуточные продукты распада гликогена известны?

№26. Какое влияние оказывает различное содержание гликогена на состояние мышечной ткани при её переработке? В каких количествах содержится гликоген в различных органах?

№27. Какие ферменты ЖКТ действуют на дисахариды и полисахариды? Каков механизм всасывания углеводов и какова сравнительная скорость всасывания отдельных гексоз и пентоз?

№28. Какой процесс называется гликогенолизом и в чём его отличие от гликолиза?

№29. Как осуществляется синтез глюкозы из неуглеводных компонентов?

№30. Фотосинтез, его значение. Основные реакции.

№31. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Энергетический эффект превращения сукцинил-КоА в янтарную кислоту в цикле три- и дикарбоновых кислот. Б. Энергетический эффект превращения α-кетоглутаровой кислоты в сукцинил-КоА в цикле три- и дикарбоновых кислот.

№32. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Энергетический эффект превращения фумаровой кислоты в щавелевоуксусную кислоту в цикле три- и дикарбоновых кислот. Б. Энергетический эффект превращения изолимонной кислоты в α-кетоглутаровую кислоту в цикле три- и дикарбоновых кислот.

№33. Напишите уравнение реакции образования и распада дисахарида лактозы.

№34. Что называется процессом гликолиза? Напишите суммарное уравнение процесса гликолиза.

№35. Напишите уравнение реакции образования глюкозо-6-фосфата при гликолизе. Какой фермент катализирует эту реакцию?

№36. Какой фермент принимает участие в образовании фруктозо-1,6-дифосфата в процессе

гликолиза? Напишите уравнение реакции.

№37. Напишите уравнение реакции образования при гликолизе D-глицеральдегид-β-фосфата. Какие ферменты принимают участие в этой реакции?

№38. Напишите уравнение реакций образования в процессе гликолиза 3-фосфоглицерата. Какие ферменты принимают участие в этих реакциях?

№39. Напишите реакции возможных путей биосинтеза и распада сахарозы.

№40. Напишите уравнение реакций превращения гликогена в глюкозо-6-фосфат при гликогенолизе. Какие ферменты катализируют эти превращения?

№41. Напишите уравнение реакции образования при спиртовом брожении этанола из глицеральдегид-3-фосфата. Какие ферменты участвуют в этом процессе?

№42. Напишите уравнения реакций, соответствующие следующей схеме превращений: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow X \rightarrow CH_3COOH$. Определите неизвестное вещество X.

№43. Напишите уравнение реакций получения в процессе гликолиза L-лактата из 3-фосфоглицерата. Какие ферменты принимают участие в этих реакциях?

№44. Напишите уравнение реакции биосинтеза гликогена из фруктозо-1-фосфата. Какие ферменты и коферменты принимают участие в этом процессе?

№45. Напишите уравнения реакций пентозофосфатного цикла, связанные с образованием НАДФН. Какие ферменты катализируют эти реакции?

№46. Напишите суммарное уравнение спиртового брожения.

№47. Какую реакцию катализирует фермент пентозофосфатного пути превращения глюкозы - транскетолаза? Напишите уравнение реакции.

№48. На каких этапах превращения цикла Кребса происходят реакции дегидрирования: а) цитрата в цис-аконитат; б) цитрата в изоцитрат; в) окисления α-кетоглутарата; г) малата в оксалоацетат; д) сукцината в фумарат; е) фумарата в малат; ж) изоцитрата в α-кетоглутарат.

№49. Напишите уравнение реакции окислительного декарбоксилирования изоцитрата. Сколько молекул АТФ может синтезироваться при условии сопряжения этой реакции с фосфорилированием АДФ?

№50. Распад полисахаридов идет или при гидролизе, или при фосфоролизе. В случае гидролиза по месту разрыва эфирной связи присоединяются элементы воды, при фосфоролизе отщепляется остаток глюкозы от невозстанавливающегося конца молекулы и образуется с молекулой фосфата глюкозо-1-фосфат. Напишите уравнение реакции гидролиза крахмала (только четыре звена молекулы крахмала).

№51. Напишите уравнение гидролиза клетчатки под влиянием фермента целлюлазы. Этот фермент имеется в организме древесного жучка, поэтому последний может питаться древесиной, расщепляя клетчатку до глюкозы.

№52. Сахароза при участии фосфорилазы подвергается фосфоролизу: $\text{сахароза} + H_3PO_4 \rightarrow \alpha\text{-О-глюкозо-1-фосфат} + \beta\text{-D-фруктофураноза}$. Напишите полное уравнение реакции в соответствии с приведенной схемой (формулы напишите в виде циклических формул Хеуорса).

№53. Фермент глюкозодегидрогеназа действует на β-D-глюкозу: $D\text{-глюкоза} + \text{НАДФ} \rightarrow D\text{-глюконо-6-лактон} + \text{НАДФН}_2$. Напишите уравнения окисления β-D-глюкозы.

№54. Под влиянием фермента галактокиназы D-галактоза образует фосфорный эфир за счет переноса фосфатной группы с АТФ: $\text{галактоза} + \text{АТФ} \rightarrow \text{галактоза-1-фосфат} + \text{АДФ}$. Напишите уравнение этой реакции.

№55. Фосфоглюкокиназа катализирует перенос фосфатной группы: $\text{фруктозо-6-фосфат} + \text{АТФ} \rightarrow D\text{-фруктоза-1,6-дифосфат} + \text{АДФ}$. Напишите уравнение этой реакции, обозначив вещества полными формулами.

№56. Фермент фосфоглюкокиназа катализирует превращение: $\text{фруктозо-1-фосфат} + \text{АТФ} \rightarrow \text{фруктозо-1,6-дифосфат} + \text{АДФ}$. Напишите уравнение этой реакции.

№57. При каталитическом действии глюкозо-1-фосфатфосфодисмутазы происходит реакция, выражаемая следующей схемой: $L\text{-глюкозо-1-фосфат} + D\text{-глюкозо-1-фосфат} \rightarrow \text{глюкозо-1,6-}$

дифосфат + D-глюкоза. Напишите уравнение этой реакции.

№58. Синтез полисахаридов (гликогена) в организме происходит за счет молекул глюкозы в их активизированной форме - УДФ-глюкозы. Напишите полное уравнение ферментативного образования УДФ-глюкозы в соответствии со схемой: АТФ + УДФ + АДФ + УТФ + глюкозо-1-фосфат → УДФ-глюкоза + Н₃РО₄

№59. Сахароза в растениях и у высших организмов синтезируется в соответствии со следующей схемой: УДФ-глюкоза + D-фруктоза → сахароза + УДФ. Напишите полное уравнение этой реакции.

№60. Спиртовое брожение идет аналогично процессу анаэробного превращения глюкозы в тканях, только на предпоследнем этапе пировиноградная кислота декарбоксилируется, превращаясь в уксусный альдегид, который под влиянием дегидрогеназы этилового спирта забирает два атома водорода от НАД и, восстанавливаясь, образует этиловый спирт. Напишите уравнение реакции восстановления уксусного альдегида в этиловый спирт.

№61. Активным донором глюкозильных остатков при синтезе дисахаров является уридиндифосфоглюкоза. Напишите уравнение реакции в соответствии со схемой:

Уридиндифосфоглюкоза + D-фруктоза → сахароза + уридиндифосфат

№62. Мальтоза синтезируется в организме бактерий. Напишите уравнение реакции в соответствии со схемой: α-D-глюкозо-1-фосфат + глюкоза → мальтоза + Н₃РО₄

№63. Полисахариды получают путем наращивания глюкозильных остатков на конец растущей цепи полисахарида подобно синтезу дисахаридов. Напишите уравнение реакции синтеза трисахарида из мальтозы и УДФ-глюкозы. (Наращивание происходит на невосстанавливаемом конце полисахарида.)

№64. Напишите уравнение реакции синтеза трисахарида из сахарозы и уридиндифосфоглюкозы.

№65. Напишите уравнение реакции синтеза трисахарида из лактозы и уридиндифосфоглюкозы.

№66. Составьте, включая необходимые процессы фосфорилирования, суммарные уравнения реакций превращения: а) D-фруктозы в молочную кислоту; б) D-маннозы в 2-фосфоенолпировиноградную кислоту; в) глюкозо-1,6-дифосфата в этанол и оксид углерода (IV).

№67. Напишите суммарное уравнение реакции превращения фруктозо-1,6-дифосфата в 2-фосфоенолпировиноградную кислоту в присутствии арсенита, если известно, что последний ингибирует реакции фосфорилирования.

№68. Фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, глюкозо-6-фосфат, 3-фосфоглицериновая кислота, фосфодиоксиацетон, 3-фосфоглицериновый альдегид, 2-фосфоенолпировиноградная кислота, 2-фосфоглицериновая кислота. Поставьте эти соединения в порядке их превращения по схеме дихотомического пути распада глюкозо-6-фосфата.

№69. Напишите суммарное уравнение реакции превращения глюкозы в рибозо-5-фосфат.

№70. Напишите суммарное уравнение реакций ресинтеза глюкозо-6-фосфата из рибулозо-5-фосфата при апотомическом распаде углеводов.

№71. Напишите суммарное уравнение реакции окисления лимонной кислоты в цикле три- и дикарбоновых кислот, зная, что сукцинатдегидрогеназа полностью ингибирована малоновой кислотой.

№72. Составьте суммарное уравнение реакции биосинтеза глюкозы из пировиноградной кислоты.

№73. Составьте суммарное уравнение реакции биосинтеза глюкозы из лимонной кислоты.

№74. Составьте суммарное уравнение реакций наращивания полигликозидной цепочки гликогена на один остаток глюкозы, если последняя возникла из пировиноградной кислоты.

Тема 12

МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ

Вопросы

№1. Как осуществляется переход от липидов к углеводам? Ответ иллюстрируйте соответствующими уравнениями химических реакций.

№2. Приведите схему превращения глицерина в 2-фосфоглицериновую кислоту и назовите ферменты, катализирующие этот процесс. Приведите схему разрушения пальмитиновой кислоты путем β -окисления.

№3. Исходя из бутирил-КоА, опишите механизм биосинтеза капроновой кислоты.

№4. Приведите схему превращения пировиноградной кислоты в стеролы. В чем биологическая роль стеролов и стеридов?

№5. Каков выход АТФ при полном окислении пальмитиновой кислоты в аэробном процессе?

№6. Какое количество АТФ образуется за счет окисления в цитоплазме клетки глицеральдегид-3-фосфата с участием НАД⁺ (челночный механизм)?

№7. Пальмитиновую кислоту, меченную углеродными атомами по карбоксильной группе, дали с пищей животному, а затем в глюкозных единицах гликогена отметили появление изотопного атома углерода. Изобразите последовательности реакций, в результате которых изотопный атом углерода появляется в глюкозе.

№8. Напишите схемы реакций с использованием структурных формул субстратов и продуктов, а также ферментов, ускоряющих данные реакции:

а) Глицерин + АТФ $\rightarrow$ Фосфоглицерин + АДФ;

б) Пальмитиновая кислота + АТФ + КоА8Н $\rightarrow$ Пальмитил-КоА + АМФ + Н₄Р₂О₇;

в) β -Оксилаурил-КоА + НАД⁺ $\rightarrow$ β -Кетолаурил-КоА + НАДН + Н⁺;

№9. Напишите уравнение реакций, в результате которых большая часть трипальмитина, водимого с пищей в организм человека, будет откладываться в жировых тканях в виде трипальмитина.

№10. Для каждого из процессов назовите орган и ткань взрослого человека, наиболее активно осуществляющих данные процессы: а) холестерин $\rightarrow$ холиевая кислота; б) креатин $\rightarrow$ креатинфосфат; в) ацетат $\rightarrow$ углекислый газ; г) кислород $\rightarrow$ вода

№11. Напишите уравнение реакции равновесного состояния для превращения стеарата в ацетоацетат.

№12. Каков энергетический выход первого и последнего этапов β -окисления?

№13. Докажите, что энергетическая ценность окисления 1 моль триацилглицеридов выше, чем 1 моль глюкозы.

№14. Напишите уравнение реакции равновесного состояния для синтеза триацилглицерола из глицерина и жирной кислоты.

№15. Назовите продукты, образующиеся при гидролизе 1-стеароил – олеилфосфатидсерина в присутствии сильного основания с последующим кислотным гидролизом.

№16. Назовите продукты, образующиеся при обработке 1-пальмитоил–2-линолеилфосфатидилхолина фосфолипазой.

№17. Напишите реакцию гидролиза жира и лецитина.

№18. Какова роль желчи в переваривании и всасывании жиров? Какова химическая природа желчных кислот?

№19. Из чего синтезируется в животном организме холестерин и в какие биологически важные вещества он превращается?

№20. Каким образом глицерин включается в обмен углеводов?

№21. Сущность процессов, протекающих при окислении липидов.

№22. β -Окисление жирных кислот. Какие ферменты катализируют этот процесс?

№23. Приведите принципиальную схему синтеза ацилглицеринов.

№24. Окисление ненасыщенных жирных кислот. Напишите уравнения реакций.

№25. Каким путем синтезируются жирные кислоты в организме? Напишите уравнения реакций.

№26. Биосинтез фосфоглицеридов. Напишите уравнения реакций.

№27. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Число молекул ацетил-КоА, образовавшихся при β -окислении стеариновой кислоты. Б. Количество молекул ацетил-КоА, образовавшихся при β -окислении олеиновой кислоты.

№28. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Число изопреноидных группировок в двух молекулах фарнезилпирофосфата. Б. Число изопреноидных группировок в молекуле сквалена.

№29. Напишите суммарное уравнение биосинтеза стеариновой кислоты из ацетил-КоА, НАДФН₂ и АТФ.

№30. Напишите суммарное уравнение биосинтеза пальмитоолеиновой кислоты из ацетил-КоА, НАДФН₂ и АТФ.

№31. Напишите уравнение реакции окисления стеариновой кислоты по ω-углеродному атому; назовите ферменты, катализирующие данный процесс.

№32. Напишите уравнения первых двух реакций преобразования линолевой кислоты перед началом ее β-окисления. Назовите ферменты, катализирующие эти реакции.

№33. Сколько молекул АТФ необходимо для образования три пальмитина из глицерола и пальмитиновой кислоты? Напишите суммарное уравнение биосинтеза трипальмитина.

№34. Напишите суммарное уравнение биосинтеза стеариновой кислоты из ацетил-КоА, НАДФН₂ и АТФ.

№35. Напишите суммарное уравнение биосинтеза пальмитоолеиновой кислоты из ацетил-КоА, НАДФН₂ и АТФ.

№36. Напишите суммарное уравнение биосинтеза стеариновой кислоты из лауриновой кислоты и НАДФН₂, протекающего в микросомах.

№37. Напишите суммарное уравнение биосинтеза трипальмитина из глюкозы в клетках печени в условиях аэробноза. Включите в уравнение изменения системы АТФ.

№38. Сколько высокоэнергетических фосфатных связей необходимо для биосинтеза одной молекулы дипальмитилфосфатидилсерина из пальмитиновой кислоты?

№39. Сколько высокоэнергетических фосфатных связей необходимо для биосинтеза одной молекулы дипальмитилфосфатидилхолина из пальмитиновой кислоты, серина, глицерина и метионина?

№40. Сколько высокоэнергетических фосфатных связей необходимо для биосинтеза одной молекулы холестерина?

№41. Сколько высокоэнергетических фосфатных связей в молекулах АТФ может синтезироваться при окислении НАДФН₂ (эти связи используются при образовании трех молекул пальмитиновой кислоты)?

№42. Под влиянием щелочи, а в организме при действии фермента липазы происходит ступенчатое расщепление триглицеридов на глицерин и жирные кислоты. Напишите уравнения реакции расщепления триглицеридов: тристеарина, трипальмитина, диолеостеарина.

№43. Лецитин синтезируется из холина и диглицерида:

1) холин + АТФ киназа → холинфосфат + АДФ;

2) холинфосфат + ЦТФ → цитидиндифосфатхолин + пирофосфат;

3) цитидиндифосфатхолин + диглицерид → ЦМФ + лецитин.

Напишите уравнения реакций в соответствии с этой схемой. Суммируйте уравнения реакций.

№44. При неполном окислении жиров в организме больных диабетом в моче появляются ацетоуксусная кислота (β-кетомасляная), β-оксимасляная кислота (продукт восстановления первой) и ацетон. Группу этих веществ в медицине называют кетоническими телами. Напишите формулы этих веществ.

№45. Фермент липаза вызывает гидролиз преимущественно внешних (α) эфирных связей: триглицерид + Н₂О → диглицерид + жирная кислота

Напишите уравнение реакции гидролиза триглицерида.

№46. Под влиянием фермента фосфолипазы α-лецитин подвергается гидролизу и образует лизолецитин и ненасыщенную жирную кислоту. Напишите уравнение реакции гидролиза одного из лецитинов.

№47. Фосфолипаза гидролизует лизолецитины: лизолецитин + $H_2O \rightarrow$ глицерофосфохолин + жирная кислота. Напишите уравнение реакции.

№48. Фермент ацетилхолинэстераза катализирует реакцию гидролиза ацетилхолина: ацетилхолин + $H_2O \rightarrow$ холин + уксусная кислота. Напишите полное уравнение этой реакции.

№49. Фермент холинацетилтрансфераза переносит ацетильную группу на молекулу холина: ацетил-КоА + холин $\rightarrow$ КоА + ацетилхолин. Напишите уравнение этой реакции.

№50. Глицераткиназа осуществляет перенос остатка фосфорной кислоты к глицериновой кислоте: глицерат + АТФ $\rightarrow$ D-3-фосфоглицерат + АДФ. Напишите уравнение реакции образования фосфоглицерата.

№51. Фермент фосфоглицератфосфомутаза обуславливает внутримолекулярный перенос фосфорильных групп: 2-фосфоглицерат $\rightarrow$ 3-фосфоглицерат. Напишите уравнение этой реакции.

№52. Напишите уравнения реакций, протекающих по следующей схеме: ацил-КоА-дегидрогеназа $\rightarrow$ пальмитиновая кислота $\rightarrow$ ацил-КоА-синтетаза $\rightarrow$ еноил-КоА-гидратаза $\rightarrow$ β -оксиацил-КоА-дегидрогеназа $\rightarrow$ β -кетацил-КоА-эстераза. Назовите промежуточные и конечный продукты реакций.

№53. Напишите уравнение реакции окисления стеариновой кислоты по углеродному атому. Назовите ферменты, катализирующие этот двухстадийный процесс.

№54. Напишите уравнения первых двух реакций преобразования линолевой кислоты перед ее вступлением на путь β -окисления. Назовите ферменты, участвующие в этих реакциях.

№55. Напишите уравнение реакции синтеза кефалина из дипальмитина и ЦДФ-коламина в присутствии этаноламинфосфотрансферазы.

Тема 13 МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ Вопросы

№1. Многие соединения синтезируются в реакциях гликолиза и ЦТК или родственных соединений. Используя в качестве субстрата ПВК, укажите реакции, ведущие к образованию следующих соединений: а) уксусная кислота; б) аланин; в) глутаминовая кислота.

№2. Назовите α -оксикетокислоту, образующуюся при переаминировании из следующих аминокислот: а) аланин; б) глутамат; в) фенилаланин.

№3. Напишите уравнение реакции равновесного состояния для превращения аспартата в глюкозу через оксалоацетат.

№4. Напишите уравнение реакции равновесного состояния для превращения аспартата в оксалоацетат через фумарат.

№5. В результате реакции дезаминирования аминокислот были получены следующие кетокислоты: пировиноградная, щавелево-уксусная, α -кетоглутаровая. Напишите формулы соответствующих аминокислот, из которых были получены перечисленные кетокислоты. Из каких стадий состоит процесс, окислительного дезаминирования? Напишите уравнения химических реакций.

№6. Напишите уравнение реакции равновесного состояния для синтеза аланина из глюкозы.

№7. Напишите реакции дезаминирования следующих аминокислот:

а) глутамин; б) серин; в) аспарагин.

№8. Напишите схему синтеза глюкозы из серина.

№9. Напишите уравнение реакции переаминирования с участием пиридоксальфосфата между изолейцином и щавелевоуксусной кислотой.

№10. Какие продукты образуются при окислительном дезаминировании аспарагиновой кислоты и аланина? Напишите схемы реакций и назовите продукты реакций и ферменты, катализирующие эти реакции.

№11. Какие диамины образуются в результате декарбоксилирования тирозина и гистидина? Напишите схемы реакций декарбоксилирования названных аминокислот и укажите ферменты,

ускоряющие эти реакции.

№12. Какие ферменты производят последовательно расщепление белка в желудочно-кишечном тракте? Каковы свойства этих ферментов?

№13. Роль соляной кислоты в переваривании белков. Состав желудочного сока.

№14. К какой группе ферментов по классификации относится пепсин? Механизм створаживания молока пепсином. Что такое пепсиноген и в чем заключается его активирование?

№15. Субстратная специфичность действия протеолитических ферментов? Какова роль энтеропептидазы кишечного сока?

№16. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Количество триплетов, не участвующих в кодировании. Б. Количество триплетов, участвующих в кодировании.

№17. Напишите уравнения реакций, соответствующие схеме:

Уксусная кислота $\rightarrow X \rightarrow$ глицин

Определите неизвестное вещество X.

№18. Напишите уравнения реакций, соответствующие схемам

Пропанол-1 $\rightarrow X \rightarrow Y \rightarrow$ аланин

Определите неизвестные вещества X и Y.

№19. Назовите кислоты, образующиеся в результате внутримолекулярного дезаминирования: а) предельные кислоты; б) гидроксикислоты; в) кетокислоты; г) непредельные кислоты. Напишите уравнение внутримолекулярного дезаминирования аланина.

№20. Для какой аминокислоты деметилирование способствует реакциям метилирования: а) изолейцина; б) метионина; в) 5-аденозилметионина? Напишите реакцию метилирования норадреналина.

№21. Какая аминокислота может превращаться в β -гидрокси- β -метилглутарил-5-КоА, один из промежуточных продуктов биосинтеза стероидов: а) лейцин; б) валин; в) глутамат; г) треонин? Напишите формулу этой аминокислоты.

№22. Какие аминокислоты при ферментативном превращении образуют пигмент меланин: а) триптофан; б) фенилаланин; в) тирозин; г) оксипролин? Напишите реакцию окисления этих аминокислот.

№23. Какая аминокислота является промежуточным продуктом при биосинтезе мочевины и расщепляется с образованием орнитина и мочевины: а) лейцин; б) цитруллин; в) аргинин; д) валин? Напишите уравнения всех реакций образования мочевины.

№24. В чем заключается реакция активирования аминокислот: а) в образовании аминоксилацил-АТФ; б) в образовании аминоксилатфосфатов; в) в образовании аминоксил-КоА? Напишите уравнение этой реакции. Назовите фермент.

№25. Напишите схему гидролиза белка по стадиям: белок $\rightarrow$ полипептиды $\rightarrow$ свободные кислоты. Обозначьте число звеньев аминокислот в молекуле белка через n, число звеньев в образующихся полипептидах через x, y, z при условии, что $x + y + z$ равно n.

№26. Фермент аминопептидаза гидролизует дипептиды и трипептиды, отщепляя N-концевой остаток. Напишите формулу любого трипептида и реакцию его гидролиза с помощью аминопептидазы.

№27. Аминокислоты под влиянием ферментов подвергаются окислительному дезаминированию, которое осуществляется в присутствии дегидрогеназы в две стадии:

первая - образование иминокислоты в результате перехода двух атомов водорода к НАД:

глутаминовая кислота + НАД $\rightarrow$ иминоглутаровая + НАДН₂;

вторая - гидролиз образовавшейся иминокислоты:

иминоглутаровая кислота + H₂O $\rightarrow$ NH₃ + α -кетоглутаровая кислота.

Напишите уравнения этих реакций.

№28. Напишите уравнения реакций окислительного дезаминирования с участием НАД следующих

аминокислот: а) аланина, б) валина.

№29. Напишите уравнение реакции окислительного дезаминирования фенилаланина и триптофана с участием флавинофосфорной кислоты.

№30. L-Аспарагновая кислота в растениях дезаминируется под влиянием аспартазы. В результате дезаминирования получается фумаровая кислота. Напишите уравнение этой реакции.

№31. Цистеин под влиянием дисульфогидразы дезаминируется: цистеин $\rightarrow$ α -аминоакриловая кислота $\rightarrow$ иминопропионовая кислота $\rightarrow$ пировиноградная кислота + NH_3 Напишите уравнения этих реакций.

№32. L-Серин дезаминируется при участии гидратазы, отщепляя воду, а далее по схеме, сходной с дезаминированием цистеина. Напишите уравнения дезаминирования L-серина.

№33. В результате реакции дезаминирования аминокислот были получены следующие кислоты: а) пировиноградная, б) щавелевоуксусная, в) α -кетоглутаровая.

Напишите формулы соответствующих аминокислот, из которых были получены перечисленные кислоты.

№34. Аминокислоты, получающиеся при распаде белков под влиянием ферментов, подвергаются переаминированию при участии кофермента пиридоксальфосфата. Этот процесс идет главным образом за счет α -кетоглутаровой кислот. Образовавшаяся глутаминовая кислота дезаминируется, а выделившаяся при этом α -кетоглутаровая кислота снова вовлекается в реакцию переаминирования. Напишите уравнение реакции переаминирования с участием пиридоксальфосфата между L-аспарагиновой и α -кетоглутаровой кислотами.

№35. Напишите уравнение реакции переаминирования с участием пиридоксальфосфата между L-изолейцином и щавелевоуксусной кислотой.

№36. Напишите уравнение реакции переаминирования с участием пиридоксальфосфата между аспарагиновой и пировиноградной кислотами.

№37. L-аланин-2-оксоглутаратаминотрансфераза переносит аминогруппу: L-аланин + α -кетоглутаровая кислота $\rightarrow$ пировиноградная + α -глутаминовая кислота
Напишите уравнение этой реакции.

№38. L-Цистеин-3-оксоглутаратаминотрансфераза обуславливает обмен аминогруппы: L-цистеин + α -кетоглутаровая кислота $\rightarrow$ 3-меркаптопировиноградная кислота + D-глутамат
Напишите уравнение этой реакции.

№39. L-Тирозин-2-оксоглутаратаминотрансфераза обуславливает реакцию переаминирования между тирозином и α -кетоглутаровой кислотой:

L-тирозин + α -кетоглутаровая кислота $\rightarrow$ параоксифенилпировиноградная кислота + α -глутаминовая кислота. Напишите уравнение этой реакции.

№40. Глицинамидинотрансфераза переносит амидиновую группу аргинина на глицин: L-аргинин + глицин $\rightarrow$ L-орнитин + гуанидинацетат

Напишите уравнение реакции в соответствии с этой схемой.

№41. L-Аспартат дает разные продукты в зависимости от фермента, катализирующего процесс декарбоксилирования, аспартат- α -декарбоксилаза направляет реакцию так: L-аспартат $\rightarrow$ β -аланин + CO_2 Напишите уравнение этой реакции.

№42. Фермент аспартат- β -декарбоксилаза, отщепляя углекислый газ, приводит к образованию α -аланина. Напишите уравнение этого превращения.

№43. Под влиянием фермента валиндекарбоксилазы L-валин распадается на изобутиламин и углекислый газ. Напишите уравнение этой реакции с участием фосфопиридоксала.

№44. Действие фермента глутаматдекарбоксилазы на L-глутамат приводит к образованию 4-аминобутирата и углекислого газа. Напишите уравнение этой реакции с участием фосфопиридоксала.

№45. L-Гистидин, декарбоксилируясь под влиянием гистидиндекарбоксилазы, образует гистамин. Напишите уравнение этой реакции.

№46. Тирозин, катализируемый тирозиндекарбоксилазой, образует тирамин и углекислый газ. Напишите уравнение этой реакции.

№47. При спиртовом брожении под влиянием ферментов, содержащихся в дрожжах, из аминокислот в результате гидролиза аминогруппы и декарбоксилирования происходит образование сивушного масла — смеси спиртов: а) пропилового, б) изобутилового, в) изоамилового и г) вторичнобутилкарбинола. Напишите уравнения образования этих спиртов из соответствующих α -аминокислот.

№48. γ -Аминомасляная кислота обнаружена в мозговой ткани высших млекопитающих, она способствует процессам торможения в центральной нервной системе. Образуется γ -аминомасляная кислота (ГАМК) при декарбоксилировании глутаминовой кислоты. Напишите уравнение образования ГАМК.

№49. γ -Аминомасляная кислота (ГАМК) подвергается дезаминированию с образованием полуальдегида янтарной кислоты, из которого далее образуется янтарная кислота. Напишите уравнения реакций получения янтарной кислоты из глутаминовой.

№50. При каталитическом воздействии фермента малеинатизомеразы малеинат преобразуется в фумарат. Напишите их геометрические изомеры.

№51. В кишечнике под влиянием гнилостных бактерий происходит декарбоксилирование аминокислот с образованием аминов. В числе других получают: путресцин и кадаверин. Напишите уравнения реакций декарбоксилирования кислот, при которых образуются эти диаминны.

№52. При гниении белков в кишечнике из тирозина образуются ядовитые вещества крезол и фенол. Они обезвреживаются в печени в результате взаимодействия их с активным сульфатом или с глюкуроновой кислотой. Напишите уравнения реакций.

№53. Глицин, подвергаясь окислительному дезаминированию, образует глиоксиковую кислоту которая, вступая в реакцию переаминирования с глутаминовой кислотой, образует α -кетоглутаровую кислоту и глицин. Напишите уравнения этих реакций.

№54. Аланин получается из пировиноградной кислоты при переаминировании с глутаминовой кислотой. Напишите уравнение этой реакции.

№55. Серин служит источником этаноламина и холина - составных частей фосфатидов. Этаноламин получается при декарбоксилировании серина. Напишите уравнение реакции образования этаноламина из серина.

№56. Аланин может получиться при декарбоксилировании аспарагиновой кислоты. Напишите уравнение этой реакции.

№57. Аргинин под влиянием аргиназы гидролизует, образуя мочевины и орнитин. Напишите уравнение этой реакции.

№58. Глутаминовая и аспарагиновая кислоты амидируются, образуя соответственно глутамин и аспарагин. Это амидирование идет с использованием макроэргических фосфатных связей аденозинтрифосфорной кислоты. Напишите уравнения амидирования глутаминовой кислоты.

№59. Одним из видов превращения фенилаланина является окисление его с образованием тирозина. Из молекулы кислорода, участвующей в окислении, один атом идет на образование гидроксильной группы тирозина, другой окисляет восстановленный фермент. Напишите уравнение реакции превращения фенилаланина.

№60. Какие диаминны образуются в результате декарбоксилирования лизина, тирозина, гистидина и триптофана? Напишите уравнения реакций декарбоксилирования названных аминокислот и укажите ферменты, ускоряющие данные процессы.

№61. Приведите схему окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты и укажите фермент, ускоряющий этот процесс.

№62. Приведите уравнения реакций, характеризующие многообразие путей биосинтеза α -аланина. Назовите ферменты.

№63. Предложите вероятную схему образования орнитина из глутаминовой кислоты. Назовите

ферменты.

№64. Какое биологически активное вещество образуется в процессе превращения триптофана: а) кортикостерон; б) тироксин; в) серотонин; г) гистамин? Напишите уравнение. Назовите ферменты.

№65. При декарбоксилировании какой аминокислоты образуется γ -аминобутират: а) аспартата; б) глутамата; в) треонина; г) лейцина? Напишите уравнение реакции. Назовите фермент.

№66. Какая аминокислота образуется при окислении фенилаланина: а) серии; б) триптофан; в) аланин; г) тирозин? Напишите уравнение реакции. Назовите фермент.

№67. Какие аминокислоты являются акцепторами аммиака в момент его образования в клетке: а) аланин; б) глутамат; в) глицин; г) аспартат? Напишите уравнения реакций. Назовите ферменты.

Тема 14

МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

№1. При обработке продуктов гидролиза 1,655 г дезоксирибонуклеотида, содержащего 21,15 % азота по массе, избытком известковой воды выпало 0,775 г осадка. Установите структурную формулу дезоксирибонуклеотида и напишите уравнения реакции.

№2. При обработке продуктов гидролиза 4,83 г дезоксирибонуклеотида, содержащего 8,7 % азота по массе, избытком известковой воды выпало 2,325 г осадка. Установите структурную формулу дезоксирибонуклеотида и напишите уравнения реакции.

№3. При обработке продуктов гидролиза 6,14 г дезоксирибонуклеотида, содержащего 13,68 % азота по массе, избытком известковой воды выпало 3,10 г осадка. Установите структурную формулу дезоксирибонуклеотида и напишите уравнения реакции.

№4. Какая доля (в процентах) объема клетки *E. coli* приходится на рибосомы (их количество 15 000)? Диаметр рибосом *E. coli* составляет примерно 18 нм (условно можно принять, что они имеют сферическую форму).

№5. Рассчитайте концентрацию (моль/л) растворов при pH 7,0 и толщине слоя раствора 1,0 см, используя указанные выше значения молярного коэффициента поглощения: а) для раствора гуанина $A = 0,325$; б) для раствора тимина $A = 0,09$.

№6. Рассчитайте значение оптической плотности при $K = 260$ нм для водного раствора, содержащего аденин в концентрации $4,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л и урацил ($3,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л).

№7. Единичная молекула ДНК в хромосоме *E. coli* ($M_r = 2800 \cdot 10^3$) содержит около 4,5 млн мононуклеотидных единиц, длина каждой из них составляет примерно 0,34 нм. Вычислите общую длину молекулы ДНК.

№8. Вычислите среднее число нуклеотидных пар в расчете на один микрометр двойной спирали ДНК.

№9. Вычислите среднее число нуклеотидных пар в расчете на $1 \cdot 10^6$ единиц массы двойной спирали ДНК.

№10. Вычислите среднюю длину (в нанометрах) и среднюю молекулярную массу генов, координирующих: а) тРНК (90 мононуклеотидных остатков); б) рибонуклеазу (124 аминокислотных остатка); в) миозин (1800 аминокислотных остатков).

№11. Вычислите массу (в граммах) двойной спирали ДНК, имеющей длину, равную расстоянию от Земли до Луны (384 000 км).

№12. Сравните длину гена с длиной кодируемой этим геном полипептидной цепи, содержащей 150 аминокислотных остатков и находящейся в α -спиральной конфигурации.

№13. Валиновая тРНК из дрожжей, первичная структура которой расшифрована А.А. Баевым и его сотрудниками, содержит 77 нуклеотидных остатков в молекуле.

Акцепторный конец этой тРНК биспирализован в наибольшей степени - 7 пар нуклеотидов. В антикодоновой петле заспириализовано 5 пар нуклеотидов. «Псевдоуридиновая» петля также имеет 5 пар нуклеотидов, соединенных водородными связями. В «дигидроуридиновой» петле биспирализованная часть содержит 3 пары нуклеотидных остатков. Рассчитайте в процентах долю нуклеотидных остатков, находящихся в биспирализованных областях молекулы и

поддерживающих вторичную структуру дрожжевой валиновой тРНК.

№14. Определите отношение А/Т, Г/Ц, (А + Т)/(Г + Ц) во вновь образованном полинуклеотидном фрагменте после однократной репликации олигонуклеотида состава АЦАТАЦГАТ, если в качестве затравки использованы все четыре дезоксинуклеозидтрифосфата.

№15. Рассчитайте нуклеотидный состав участка двухцепочечной ДНК, если в мРНК содержание аденина, цитозина, гуанина и урацила составляет 21, 25, 24 и 30 % соответственно.

№2516 Рассчитайте объем молекулы ДНК (в кубических нанометрах) с молекулярной массой 500 000, если она имеет форму цилиндра.

№17. АТФ может быть получен из других макроэргических соединений, называемых АТФ-генерирующими веществами, например: а) креатинфосфат + АДФ → АТФ + креатин; б) фосфоэнолпировиноградная кислота + АДФ → АТФ + пировиноградная кислота; в) 1,3-дифосфоглицериновая кислота + АДФ → АТФ + 3-фосфоглицериновая кислота. Напишите уравнения этих реакций.

№18. Рассчитайте число нуклеотидных пар в отрезке двойной спирали ДНК длиной 1 мкм, находящейся: а) в А-форме и б) в В-форме.

№19. В-форма кристаллической ДНК устойчива в условиях 97%-ной относительной влажности. Если влажность понизить до 76%, то происходит резкий переход В-формы ДНК в А-форму. Вычислите, на какую величину (мкм) изменится длина фрагмента ДНК, относительная молекулярная масса которого равна 1000000, если из В-формы он перейдет в А-форму.

№21. Рассчитайте среднюю длину (мм) двухцепочечных молекул ДНК, находящихся в одной клетке у различных представителей животного мира, если известно количество нуклеотидных пар (в млн.) в составе клеточной ДНК: а) млекопитающие - 5500; б) амфибии - 6500; в) рыбы - 2000; г) птицы - 2000; д) ракообразные - 2800; е) моллюски - 1100; ж) губки - 100; з) грибы - 20; и) бактерии - 2.

№22. Клетка печени крысы содержит $9,1 \cdot 10^{12}$ г ДНК. Допуская, что вся ДНК равномерно распределена между 42 хромосомами и существует в каждой хромосоме в виде единой молекулы, рассчитайте длину двухцепочечной ДНК, находящейся в одной хромосоме, принимая значение постоянной Авогадро равным $6 \cdot 10^{23}$ моль.

№23. Относительная молекулярная масса фрагмента ДНК равна 500000. Рассчитайте объем фрагмента молекулы ДНК при условии, что она имеет форму цилиндра.

№24. В составе рибосомы кишечной палочки содержится по одной молекуле 23S, 16S и 5S РНК. Рассчитайте процентное соотношение трех видов РНК в рибосоме кишечной палочки.

№25. Валиновая тРНК из дрожжей, первичная структура которой расшифрована А. А. Баевым и его сотрудниками, содержит 77 нуклеотидных остатков в молекуле.

Акцепторный конец этой тРНК биспирализован в наибольшей степени - 7 пар нуклеотидов. В антикодоновой петле в спирализованной области находятся 5 пар нуклеотидов, сочетающихся водородными связями. В дигидроуридиновой петле биспирализованная часть включает 3 пары нуклеотидных остатков. Рассчитайте в процентах долю нуклеотидных остатков, находящихся в биспирализованных областях молекулы и поддерживающих вторичную структуру дрожжевой валиновой тРНК.

№26. Рассчитайте коэффициент молярной экстинкции аденина, если раствор, содержащий 500 мкг аденина в 100 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия, имеет оптическую плотность 0,458 при 262 нм (ширина кюветы равна 1 см). Относительная молекулярная масса аденина 135.

№27. Водный раствор, содержащий 57,8 мг/л натриевой соли УТФ, имеет оптическую плотность 1,014 при 262 нм (рН 7,0). Вычислите коэффициент молярной экстинкции указанного вещества в этих условиях. Относительная молекулярная масса натриевой соли УТФ равна 586.

№28 Коэффициент молярной экстинкции аденина в 0,1 н. растворе соляной кислоты при 262,5 нм равен $13,4 \cdot 10^3$ л/моль/см. Вычислите значение оптической плотности раствора аденина, содержащего 5 мкг основания в 1 мл раствора. Относительная молекулярная масса аденина равна 135.

№29. Укажите соединения, которые образуются в результате действия на олигорибонуклеотиды ЦфУфАфЦфАфГфУфГ и фГфУфАфГфАфАфЦфУфГ:

а) фосфодиэстеразы змеиного яда; б) панкреатической РНКазы; в) РНКазы Т 1; г) РНКазы Т 2; д) разбавленного раствора щелочи.

№30. Укажите соединения, которые образуются в результате действия на олигодезоксирибонуклеотиды фТфГфАфЦфАфТфЦфГфА и ТфАфГфГфЦфТфЦф: а) фосфодиэстеразы змеиного яда; б) ДНКазы I и фосфодиэстеразы из селезенки; в) ДНКазы II и диэстеразы змеиного яда; г) разбавленного раствора щелочи.

№31. Укажите роль 5-фосфорибозил-1-пирофосфата в биосинтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов и напишите уравнения соответствующих реакций.

№32. При обработке продуктов гидролиза 3,63 г рибонуклеотида, содержащего 19,28 % азота по массе, избытком известковой воды выпало 1,55 г осадка. Установите структурную формулу рибонуклеотида и напишите уравнения реакции.

Тема 15

МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ

№1. К 20 мл раствора овальбумина добавили 1 мл раствор панкреатина. Смесь инкубировали в течение 2 ч. Для количественного определения аминного азота методом формольного титрования взяли 10 мл инкубационной смеси. На титрование ушло 8,5 мл раствора КОН (0,05 моль/л), за вычетом контроля (1 мл такого раствора КОН соответствует 0,7 мг азота). Рассчитайте количество аминного азота, которое образуется в реакционной смеси за 1 ч инкубации.

№2. Определите минимальную молекулярную массу гемоглобина свиньи, если концентрация Fe 0,4 %, S 0,48 %.

№3. Под действием трансаминазы мышц крыс в реакции между α -кетоглутаратом и аланином за один час образовалось 110 мг глутамата. Какое количество глутамата образуется за два часа под действием трансаминазы печени, активность которой к аланину в пять раз выше, чем у трансаминазы мышц?

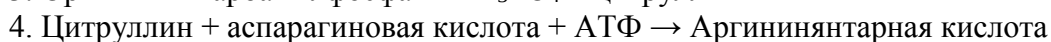
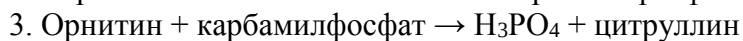
№4. К 20 мл раствора овальбумина добавили 1 мл раствор панкреатина. Смесь инкубировали в течение 2 ч. Для количественного определения аминного азота методом формольного титрования взяли 10 мл инкубационной смеси. На титрование ушло 8,5 мл раствора КОН (0,05 моль/л), за вычетом контроля (1 мл такого раствора КОН соответствует 0,7 мг азота). Рассчитайте количество аминного азота, которое образуется в реакционной смеси за 1 ч инкубации.

№5. Аммиак, получающийся в процессе дезаминирования аминокислот, удаляется из организма в виде аммонийных солей, а также участвует в образовании мочевины по так называемому орнитиновому циклу.

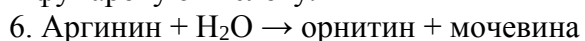
Механизм реакций орнитинового цикла следующий:



Для синтеза одной молекулы карбаминовой кислоты используется энергия макроэргической связи АТФ.



5. Аргининянтарная кислота расщепляется под влиянием фермента аргининсукциназы на аргинин и фумаровую кислоту.



Напишите полные уравнения этих реакций, просуммируйте все эти реакции, проследите, как образовались две группы NH_2 , входящие в состав молекулы мочевины.

№6. К 10 мл раствора желатина добавили 1 мл раствора панкреатина, инкубировали в течение 1 ч и взяли для определения аминного азота 5 мл реакционной смеси. Работу вели медным методом Поле и Стивенса. Общий объем раствора после всех обработок составил 25 мл. На титрование

взяли 10 мл фильтрата, затратив при этом 2,52 мл 0,01 и. раствора гипосульфита (за вычетом контроля). Зная, что 1 мл раствора гипосульфита соответствует 0,28 мг азота, рассчитайте количество α -аминного азота в реакционной смеси после инкубации.

№7. Как установлено при помощи изотопной метки, источником всех атомов азота тема гемоглобина является глицин. Рассчитайте количество глицина, необходимое для биосинтеза простетических групп гемоглобина, содержащегося в 100 мл крови, если известно, что концентрация пигмента в крови равна 0,077%.

№8. Цистеиндесульфгидразная реакция при помощи фермента, выделенного из печени, почек и поджелудочной железы млекопитающих и представляющего собой полифункциональный пиридоксальфосфатпротеин, осуществляется с цистином, цистеином, гомоцистеином и цистатионином. По данным опытов с применением ^{35}S она выражается в случае цистеина следующим уравнением: $\text{цистеин} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{пируват} + \text{H}_2\text{S} + \text{NH}_3$

Определите массу образовавшихся аммиака и сероводорода, если известно, что распаду подверглось 242 мг цистеина, причем реакция остановилась после выделения сероводорода в количестве, равном 45 % от теоретического выхода.

№9. Суточная потребность человека в L-триптофана составляет 1,00 г. Рассчитайте массу серотонина, образовавшегося из суточной дозы триптофана у здоровых и страдающих злокачественным новообразованием людей, если установлено, что в первом случае на это расходуется лишь 1% триптофана, содержащегося в пище, а во втором - 60%.

№10. Скорость включения аминокислот в альдолазу у животных в 1,8 раза выше, чем при включении в фосфорилазу. Определите, сколько радиоактивного аланина включается в тот и другой фермент через 12 ч после инъекции, если установлено, что в течение 1 ч в альдолазу включается 12 мкг аланина.

№11. В течение 1 ч под действием оксидазы L-аминокислот из яда гремучей змеи 102 мг триптофана превратилось в соответствующую кетокислоту. Определите количество пировиноградной кислоты, высвобождающейся из аланина, инкубированного с ферментом в течение 1 ч, если известно, что активность оксидазы L-аминокислот яда гремучей змеи по отношению к аланину в 205 раз ниже, чем к триптофану.

№12. Синтетические полирибонуклеотиды, использованные М. Ниренбергом и другими для расшифровки качественного состава кодонов, получали с помощью фермента полинуклеотидфосфорилазы, используя высокие исходные концентрации нуклеозиддифосфатов, например УДФ и АДФ. При этом в сополимере УА возможно возникновение четырех типов триплетов, составленных из ЗУ, 2УА, У2А и 3А, соотношение которых в полинуклеотиде зависит от соотношения УДФ и АДФ в исходной смеси. Рассчитайте вероятность встречаемости триплетов УУА, УАА и ААА относительно триплета УУУ, частота встречаемости которого принимается за 100, при содержании УДФ и АДФ в исходной реакционной смеси 0,83 и 0,166 моль соответственно.

№13. Рассчитайте относительное содержание триплетов УУГ, УГГ и ГГГ в УГ-матрице, полученной при помощи полинуклеотидфосфорилазы, к триpletу УУУ, частота встречаемости которого принимается за 100, при содержании УДФ и ГДФ в исходной смеси, равном 0,75 и 0,25 моль соответственно.

№14. Рассчитайте долю триплетов УУЦ, УЦЦ и ЦЦЦ относительно триплета УУУ, частота встречаемости которого принимается за 100, при содержании УДФ и ЦДФ в исходной смеси, равном 0,80 и 0,20 моль соответственно.

№15. Рассчитайте число нуклеотидных остатков в РНК вируса - сателлита вируса некроза табака и ее относительную молекулярную массу, если известно, что число аминокислотных остатков в белковой субъединице, синтез которой кодируется этой РНК, равно 400.

№16. Качественный состав кодонов расшифровывают с помощью синтетических полирибонуклеотидных матриц. При этом исходят из совпадения относительного содержания тех или иных возможных триплетов в них и реально наблюдаемого уровня включения аминокислот в

бесклеточной системе белкового синтеза с такими матрицами в качестве мРНК, выраженного в процентах по отношению к уровню включения аминокислоты, кодируемой сочетанием наиболее часто встречающегося в матрице триплета. Определите качественный состав триплета, кодирующего тирозин, если в упомянутых условиях на поли-УА-матрице с соотношением У : А = 5 : 1 включение тирозина составило 19% от включения фенилаланина.

№17. Синтетический сополимер УГ с соотношением У : Г = 1 : 4 в бесклеточной системе белкового синтеза стимулирует включение валина с частотой 23%. Определите качественный состав кодона валина.

№18. Фиброин шелка тутового шелкопряда содержит 43,6% глицина, 29,7% аланина, 16,2% серина и 12,8% тирозина. На основании содержания аминокислот в данном белке И. Сузуки и Д. Браун в 1972 г. рассчитали нуклеотидный состав иРНК, являющейся матрицей для биосинтеза фиброина. Анализ содержания нуклеотидов в составе выделенной из шелкоотделительной железы иРНК, кодирующей биосинтез фиброина, полностью подтвердил предсказанные значения. Исходя из приведенных выше данных по аминокислотному составу фиброина шелка и пользуясь таблицей кода белкового синтеза, вычислите содержание гуаниловых нуклеотидов в иРНК для биосинтеза фиброина шелка.

№19. При исследовании синтеза гемоглобина в ретикулоцитах кролика было показано, что рибосомы объединяются на иРНК в полисомы, каждая из которых содержит 6 рибосом. Белковые субъединицы молекулы гемоглобина типа α представлены полипептидной цепью из 141 аминокислотного остатка, α - из 146. Рассчитайте количество нуклеотидных звеньев иРНК, приходящихся на одну рибосому в полисомах, где идет биосинтез α и β полипептидных цепей субъединиц гемоглобина.

№20. Лас-оперон кишечной палочки кодирует первичную структуру трех энзимов, связанных с усвоением и обменом β -галактозидов и, в частности, лактозы. Цистрон первого энзима - β -галактозидазы имеет размер 1,26 мкм; цистрон второго энзима - пермеазы (катализирует проникновение лактозы внутрь клетки из среды культивирования) и цистрон третьего энзима - тиогалактозидтрансацилазы (осуществляет превращения образующейся галактозы) характеризуются протяженностью по 0,30 мкм. Зоны промотора и оператора в сумме составляют 0,14 мкм. Рассчитайте относительные молекулярные массы Лас-оперона кишечной палочки и кодируемых им белков.

№21. В лаборатории Ф. Липимана расшифрован мультиэнзимный механизм биосинтеза пептидов без участия рибосом и мРНК. Выяснено, что активирование аминокислот при этом на первом этапе приводит к возникновению аминокислот-аминоацил-аденилата, а на втором - тиюэфиров по HS-группам белков, составляющих мультиэнзимный комплекс. Составьте схему реакции активирования аминокислот при мультиэнзимном механизме биосинтеза белка.

Тема 16, 17

ВОДНО-МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН

Вопросы

№1. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б; Б > А; А = Б.

А. Содержание внутриклеточной воды в организме. Б. Содержание внеклеточной воды в организме.

№2. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б; Б > А; А = Б.

А. Масса эндогенной воды, образующейся при полном окислении 100 г жира. Б. Масса эндогенной воды, образующейся при полном окислении 100 г углеводов.

№3. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б; Б > А; А = Б.

А. Число молекул воды, приходящееся на одну белковую молекулу в клетке. Б. Число молекул

воды, приходящееся на одну молекулу липидов в клетке.

№4. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Содержание фосфора в нуклеиновых кислотах. Б. Содержание фосфора в гликопротеинах.

№5. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Число атомов железа в молекуле гемоглобина. Б. Число атомов железа в молекуле миоглобина.

№6. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Активность рибонуклеазы в присутствии ионов Ca^{2+} . Б. Активность рибонуклеазы в присутствии ионов Zn^{2+} .

№7. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Содержание фосфата кальция в костной ткани. Б. Содержание фосфата магния в костной ткани

Тема 18 **ГОРМОНЫ**

№1. Химическая природа гормонов. Кто из ученых занимался изучением гормонов. Применение гормонов.

№2. Принцип действия гормонов. Характеристика гормонов по классам.

№3. Стероидные гормоны. Примеры, значение.

№4. Пептидные гормоны. Примеры, значение.

№5. Прочие гормоны. Примеры, значение.

№6. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б; Б > А; А = Б.

А. Содержание гидроксильных групп в молекуле кортикостерона. Б. Содержание гидроксильных групп в молекуле альдостерона.

№7. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Содержание спиртовых групп в молекуле альдостерона. Б. Содержание спиртовых групп в молекуле гидрокортизона.

№8. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Число аминокислотных остатков в составе молекулы окситоцина. Б. Число аминокислотных остатков в составе молекулы вазопрессина.

№9. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Количество аминокислотных остатков в молекуле гастриксина. Б. Количество аминокислотных остатков в молекуле глюкагона.

№10. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Количество аминокислотных остатков в субъединице молекулы инсулина. Б. Количество аминокислотных остатков в молекуле паратгормона.

№11. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Содержание йода в тироксине. Б. Содержание йода в йодтиронине.

№12. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: А > Б, Б > А; А = Б.

А. Число двойных связей в молекуле простагландина А. Б. Число двойных связей в молекуле простагландина Е.

Тема 19 ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Вопросы

№1. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$; $B > A$; $A = B$.

А. Число молекул ацетил-КоА, образующихся в процессе окисления молекулы глюкозы в аэробных условиях. Б. Число молекул ацетил-КоА, образующихся при окислении бутирил-КоА.

№2. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Число молекул АТФ, образующихся сопряжено с реакцией:



Б. Число молекул АТФ, образующихся сопряжено с реакцией:



№3. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Число молекул АТФ, образующихся при полном окислении ацетата. Б. Число молекул АТФ, образующихся при полном окислении пирувата.

№4. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Число молекул АТФ, образующихся при окислении двух молекул глюкозы до ацетил-КоА. Б. Число молекул АТФ, образующихся при β -окислении одной молекулы пальмитиновой кислоты до ацетил-КоА.

№5. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Величина изменения свободной энергии α -глицерофосфата в реакции гидролиза. Б. Величина изменения свободной энергии фосфоенолпирувата в реакции гидролиза.

№6. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.

А. Энзиматическая активность фермента. Б. Энзиматическая активность зимогена.

№7. Составьте суммарные уравнения реакций превращения:

а) глицерина в аланин при условии, что образующийся пируват подвергается восстановительному аминированию; б) α -глицерофосфата в этанол и оксид углерода (IV).

№8. Составьте суммарное уравнение реакций превращения глюкозы в 5-фосфорибозил-1-пирофосфат, необходимый для биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

№9. Составьте суммарное уравнение реакций превращения глицерина в глюкозо-6-фосфат.

№10. Составьте суммарные уравнения реакций синтеза de novo: а) ИМФ; б) УМФ.

№11. Напишите суммарное уравнение реакций синтеза лецитина из холина, глицерина, ацил-КоА, АТФ и ЦТФ.

№12. Составьте схему и суммарное уравнение реакций синтеза лактозы из глюкозы.

№13. Составьте суммарные уравнения реакций биосинтеза: а) стеариновой кислоты из ацетил-КоА; б) пальмитиновой кислоты из глюкозы.

№14. Составьте суммарное уравнение реакций синтеза УТФ из оксида углерода (IV), аммиака, АТФ, рибозо-5-фосфата и фумаровой кислоты. Рассчитайте количество глюкозы (в молях), необходимое в аэробных условиях для энергетического обеспечения синтеза 1 моль УТФ.

№15. Составьте схему и напишите суммарное уравнение реакций превращения аланина в глюкозу.

№16. Составьте схемы синтеза серина из 3-фосфоглицериновой кислоты при условии, что превращение последовательно идет двумя путями с участием следующих ферментов: а) фосфатазы, глицератдегидрогеназы, аминотрансферазы; б) 3-фосфоглицератдегидрогеназы, аминотрансферазы, фосфатазы.

№17. Ключевым метаболитом цикла ди- и трикарбоновых кислот является щавелевоуксусная кислота. Назовите четыре исходных соединения, из которых возникает ЦУК (два из них - аминокислоты).

№18. Составьте уравнения следующих реакций:

а) окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты; б) восстановительного карбоксилирования пировиноградной кислоты. Назовите продукты реакции.

№19. Существует ряд функционально значимых динуклеотидов, содержащих в своем составе адениловую кислоту. Назовите эти динуклеотиды.

№20. Составьте схему превращения высшей жирной кислоты в аланин.

№21. Составьте схему превращения: а) глутаминовой кислоты в аспарагиновую кислоту; б) аспарагиновой кислоты в глутаминовую кислоту.

Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)

Перечень основной литературы

1. Любимова Н.В., Бабкина И.В.; Тимофеев Ю.С. Проведение биохимических исследований – учебник. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2024. – 256 с.
2. Базовый курс биохимии // Под ред. А.И. Глухова, А.Е. Губаревой. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 584 с.
3. Лелевич, С. В. Клиническая биохимия: — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 304 с. — ISBN 978-5-8114-5146-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133476>

Перечень дополнительной литературы

1. Клиническая лабораторная диагностика: сборник ситуационных задач: учебное пособие / Е. Г. Бутолин, В. Г. Иванов, М. В. Терещенко, В. В. Максимова. — 2-е изд. стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2024. — 108 с. — ISBN 978-5-507-47622-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/398480>
2. Биохимия: учебное пособие / А. В. Стрыгин, Б. Е. Толкачев, А. М. Доценко, Е. И. Морковин. — Волгоград : ВолгГМУ, 2022. — 132 с. — ISBN 978-5-9652-0820-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/338252>
3. Клиническая биохимия: учебное пособие / Т. П. Бондарь, К. С. Светлицкий, Н. И. Ковалевич [и др.]. — Ставрополь: СтГМУ, 2020. — 204 с. — ISBN 978-5-89822-635-0. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/216803>
4. Биохимические исследования в клинической практике: Руководство для врачей / А.А. Кишкун. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2014. — 528 с.: ил.
5. Основы биохимического анализа: лабораторный практикум : учебное пособие / составители О. С. Котлярова, С. М. Чыдым. — Новосибирск : НГАУ, 2020. — 77 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/257708>
6. Лелевич, С. В. Теория и практика лабораторных биохимических исследований : учебное пособие для спо / С. В. Лелевич. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 304 с. — ISBN 978-5-507-50169-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/414779>
7. Сборник ситуационных задач по клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / О. С. Абрамовских, И. В. Батигова, И. А. Лаптева [и др.]. — Челябинск : ЮУГМУ, 2023. — 101 с. — ISBN 978-5-94507-261-9. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/442340>
8. Карпенко, Л. Ю. Биологическая химия : учебное пособие / Л. Ю. Карпенко, А. А. Бахта, А. И. Козицына. — Санкт-Петербург : СПбГУВМ, 2022. — 228 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/366575>

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
для обучающихся по организации и проведению курсовых работ
по дисциплине «ОБЩАЯ БИОХИМИЯ»
для студентов специальности 30.05.01 Медицинская биохимия

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Выполнение курсовой работы (курсового проектирования) представляет собой *самостоятельное* решение студентом под руководством преподавателя частной специальной задачи исследования в рамках изучаемой дисциплины.

Курсовая работа является одним из основных видов учебных занятий и формой контроля учебной работы студентов. Курсовые работы выполняются в пределах часов, отводимых на изучение дисциплин. Организуются на заключительном этапе освоения конкретной дисциплины, в ходе которого студенты учатся применять полученные знания и умения при решении комплексных задач своей профессиональной сферы.

Основной целью выполнения курсовой работы является развитие мышления, творческих способностей студента, привитие ему навыков самостоятельной работы, связанной с поиском, систематизацией и обобщением существующей научной и учебной литературы. Студенты приобретают умения анализировать и критически оценивать исследуемый научный и практический материал, проектировать и осуществлять собственные разработки, апробировать результаты своей работы при решении производственных задач, делать выводы, оценивать эффективность результатов.

Написание курсовой работы преследует решение следующих **задач**:

1. Углубление и закрепление теоретических знаний студентов по дисциплине.
2. Приобщение студентов к научно-исследовательской работе путем поиска, подборки, обобщения, а также критического изложения материалов учебной, научной и методической литературы.
3. Развитие навыков самостоятельной и практической работы по выбранной теме.
4. Выработка рекомендаций по результатам проведенного исследования и их апробация в конкретной организации. Подготовка студента к написанию выпускной квалификационной работы (дипломной работы), прохождению преддипломной практики.

Написание курсовой работы играет большую роль в профессиональной подготовке будущего специалиста, позволяет ему приобщиться к новейшим достижениям науки и практики, формирует исследовательский подход к оценке явлений и фактов, развивает у самого студента многие ценные личностные качества (прежде всего такие, как целеустремленность, чувство ответственности, инициативность и др.).

Курсовая работа должна быть написана логически последовательно, литературным языком научного стиля изложения. Следует помнить, что материал должен излагаться обобщенно и кратко, без подробного пересказа отдельных первоисточников. Нужно помнить, что для написания курсовой работы выделяют только те аспекты, которые представляют интерес и взаимосвязаны с ее целью. Таким образом, формулировки должны быть краткими, четкими и конкретными, аргументация – убедительной.

В курсовой работе должно быть соблюдено единство стиля изложения, обеспечена орфографическая, синтаксическая и стилистическая грамотность в соответствии с нормами современного русского языка.

2. ПОРЯДОК ОРГАНИЗАЦИИ КУРСОВЫХ РАБОТ

2.1. Выбор темы курсовой работы

Студентам предоставляется право выбора темы курсовой работы в пределах тематики, определяемой соответствующим преподавателем.

Тематика курсовых работ рассматривается и принимается соответствующими предметными (цикловыми) комиссиями и утверждается заместителем директора колледжа.

Количество предлагаемых тем должно превышать количество студентов (не менее, чем на 5%) с целью предоставления им более широкого выбора, учета индивидуальных склонностей и интересов.

Студент может избрать и иную тему для написания курсовой работы, которая в таком случае должна быть заранее согласована с преподавателем.

Тема курсовой работы может быть связана с программой производственной (профессиональной) практики студента, с видом и местом их профессиональной деятельности.

Если студент в установленные сроки не избрал тему курсовой работы, преподаватель вправе определить ее по собственному усмотрению.

Конкретная тематика курсовых работ должна отвечать следующим *требованиям*:

- соответствие задачам подготовки специалистов по конкретной специальности (требования Федерального государственного образовательного стандарта);
- актуальность темы, соответствие современному уровню развития науки и практики;
- приобщение студентов к исследовательской деятельности, самостоятельному получению знаний;
- учет разнообразных интересов студентов в изучаемой области.

2.2. Организация работы и консультации

На период организации курсовой работы за студентом закрепляется руководитель из числа преподавателей колледжа.

Руководитель координирует и направляет деятельность студента по написанию курсовой работы, проводя индивидуальное консультирование или групповые занятия-консультации на занятиях по дисциплине (дисциплинам) курсового проектирования.

Консультации проводятся за счет объема времени, отведенного в учебном плане на курсовое проектирование по конкретной дисциплине (дисциплинам). Преподаватель может проконсультироваться о количестве этих часов с методистом или заместителем директора по учебной работе колледжа.

В ходе проведения консультаций научный руководитель контролирует и корректирует все основные виды деятельности студента: сбор, обработка и подготовка необходимого информационного материала; организация методической, опытно-экспериментальной и исследовательской работы; анализ и обобщение материала, а также написание и оформление курсовой работы.

2.3. Этапы написания курсовой работы

Процесс написания курсовой работы включает последовательность определенных этапов, которые проходит студент самостоятельно и под руководством преподавателя.

1. Составление *календарного плана*, согласованного с руководителем, в котором определяются сроки, этапы, методы и ход написания курсовой работы. Определяются ключевые вопросы, подлежащие изучению, которые составят основу содержания глав и параграфов курсовой работы.

2. Подбор, изучение и *анализ литературы* по исследуемой теме, включая нормативно-правовые акты и электронные ресурсы, поиск фактического материала. В процессе подбора литературы студенту полезно создавать собственную картотеку или электронную базу данных литературных источников. Целесообразно использовать наиболее актуальные научные источники по теме курсовой работы, изданные за последние 5 лет.

3. Написание текста *теоретической части* курсовой работы.

4. Планирование и организация *практической части* работы посредством методов: наблюдения, беседы, тестирования, анкетирования, эксперимента, опытной работы, изучения продуктов деятельности по исследуемой теме, анализа теоретического и экспериментального материала, обобщения практических исследований.

5. *Анализ полученных результатов*, их интерпретация и формулирование выводов.

6. *Оформление* текста курсовой работы и подготовка к защите.

2.4. Сроки выполнения

Все этапы организации курсовой работы и сроки должны быть продуманы преподавателем заранее. Преподаватель представляет для утверждения в учебную часть колледжа тематику курсовых работ (по крайней мере, за месяц до начала выполнения курсового проектирования).

Курсовая работа должна быть сдана в сроки, устанавливаемые колледжем, с которыми можно ознакомиться на информационном стенде или сайте колледжа.

2.5. Оформление и рецензия на курсовую работу

Подготовленная и оформленная в соответствии с предъявляемыми требованиями курсовая работа помещается в папку и представляется в установленные сроки руководителю с целью ее проверки и рецензирования (не позднее 3-х дней до установленного срока завершения выполнения курсовой работы).

Проверку выполненной курсовой работы и написание рецензии преподаватель осуществляет *вне расписания учебных занятий*.

2.6. Защита и оценка

Завершающим этапом деятельности студента по написанию курсовой работы является подготовка к ее защите. Защита курсовой работы проводится за счет объема времени, предусмотренного на курсовое проектирование в рамках изучения дисциплины.

Дата защиты соответствует последнему дню курсового проектирования в соответствии с утвержденным графиком.

Если курсовая работа не сдается в установленный срок или студент не является на защиту, это приравнивается к неявке на экзамен. Студенты, не сдавшие без уважительных причин курсовую работу в срок, считаются имеющими академическую задолженность.

Защита курсовой работы проходит в открытой форме с возможностью ее посещения преподавателями колледжа, куратором группы, представителями администрации.

Процедура защиты включает:

1. *Доклад* студента по содержанию курсовой работы. Время доклада 5-7 минут. Планируется кратко в форме тезисов и включает общую характеристику работы, состояние проблемы, результаты практической и опытно- экспериментальной работы, выводы и предложения, перспективы исследования. Главная цель доклада: познакомить слушателей со своей курсовой работой и ответить на вопрос, что было сделано самим студентом в каждой из частей исследования для достижения поставленной цели. При

необходимости доклад сопровождается демонстрацией мультимедиа- презентации, плакатов и других демонстрационных материалов.

2. *Вопросы* к студенту по теме курсовой работы со стороны присутствующих и ответы на них.

3. Выступление *научного руководителя* о ходе и качестве выполнения работы.

4. Выставление дифференцированной *оценки* («отлично», «хорошо», «удовлетворительно», «неудовлетворительно») за курсовую работу по итогам ее защиты.

При организации обучения с применением дистанционных образовательных технологий студенты сдают курсовую работу в электронном виде в формате .docx согласно графику учебного процесса и в печатном варианте.

Курсовая работа считается прошедшей проверку с использованием системы Антиплагиат и заслуживает положительной оценки, если она содержит не менее 51% оригинального текста.

Критерии оценки курсовой работы:

«Отлично» выставляется за курсовую работу, в которой:

1. Всесторонне и глубоко разработана тема на основе анализа широкого круга источников информации. Дано убедительное теоретическое обоснование актуальности темы.

2. Показано применение научных методик в работе над объектом исследования, обобщен собственный опыт, иллюстрируемый различными наглядными материалами, правильно выполнены все расчеты.

3. Присутствует самостоятельность суждений и аргументация выводов, даны конкретные и обоснованные практические рекомендации.

4. Работа оформлена в соответствии со всеми требованиями.

5. Все этапы выполнены в срок.

«Хорошо» выставляется в случае, если нарушено одно из вышеизложенных требований, например, в случае ошибок в расчетах, выводах, но при условии достаточно полной, глубокой и самостоятельной проработки темы.

«Удовлетворительно» ставится за работу, если:

1. Библиография ограничена, проработаны только самые основные источники, без привлечения которых работа вообще не могла бы быть выполнена.

2. Содержание темы раскрыто в основном правильно.

3. Недостаточно полно обобщен собственный опыт работы.

4. Оформление работы правильное.

5. Большая часть работы выполнена в срок.

«Неудовлетворительно» ставится за работу, если:

1. Отсутствует анализ различных источников по теме. Содержание работы не раскрыто, не достигнута цель.

2. Отсутствует или слабо разработана практическая составляющая работы.

3. Допущено множество значительных ошибок в расчетах и оформлении.

4. Большая часть работы выполнена не в установленные сроки.

При получении неудовлетворительной оценки студент повторно выполняет работу по новой теме или перерабатывает прежнюю.

2.7. Хранение курсовых работ

Выполненная курсовая работа после ее защиты не выдается студенту на руки, а передается в архив, где хранится в течение трех лет. Лучшие курсовые работы, представляющие учебно-методическую ценность, могут быть использованы в качестве учебных пособий в методическом кабинете колледжа.

3. СТРУКТУРА КУРСОВОЙ РАБОТЫ

Курсовая работа имеет стандартную структуру, т.е. состоит из нескольких взаимосвязанных частей текста. Этими частями являются:

титульный лист, оглавление, введение, основная часть работы (представлена теоретической и одной-двумя практическими главами), заключение, список литературы и приложения (если в них есть необходимость).

В среднем, объем основного текста курсовой работы составляет 20-25 страниц (страницы приложений не учитываются).

3.1. Титульный лист

Титульный лист считается первой страницей курсовой работы, но номер на нем не ставится.

Титульный лист должен включать в себя наименование министерства и учебного заведения, полное название работы и дисциплины, фамилию, имя, отчество автора с указанием курса и специальности, фамилию, имя, отчество научного руководителя, его должность, ученую степень (звание), место и год написания работы, информацию о дате защиты и оценке работы.

Пример оформления титульного листа курсовой работы приведен в приложении 2.

3.2. Оглавление

Заголовки оглавления должны точно повторять заголовки в тексте. Последнее слово заголовка в оглавлении соединяют отточием с соответствующим ему номером страницы, выровненным по правому краю.

Главы, параграфы, пункты и подпункты нумеруются арабскими цифрами и отделяются точкой.

Структура и нумерация глав, параграфов, пунктов и подпунктов:

ГЛАВА 1. НАЗВАНИЕ ПЕРВОЙ ГЛАВЫ

1.1. Первый параграф первой главы

1.1.1. Первый пункт первого параграфа

1.1.1.1. Первый подпункт первого пункта

1.1.1.2. Второй подпункт первого пункта

1.2. Второй параграф первой главы и так далее

Такие структурные элементы курсовой работы, как введение, заключение, список литературы не нумеруются.

Курсовая работа может состоять из двух или трех глав в зависимости от целей конкретного исследования в рамках изучаемой дисциплины. Объем глав курсовой работы должен быть приблизительно равным между собой.

Каждая глава имеет, как правило, два-три параграфа, которые могут подразделяться на пункты и подпункты. Количество пунктов и подпунктов определяется особенностями содержания и изложения конкретной темы, но желательно, чтобы оно не превышало трех.

Основные правила оформления заголовков:

- Заголовки начинаются с прописной (заглавной) буквы, выравниваются по центру страницы и выделяются полужирным начертанием.

- Заголовки основных структурных элементов курсовой работы, как в основном тексте, так и в оглавлении (**ВВЕДЕНИЕ, НАЗВАНИЯ ГЛАВ, ЗАКЛЮЧЕНИЕ, ИНФОРМАЦИОННЫЕ ИСТОЧНИКИ, ПРИЛОЖЕНИЯ**) рекомендуется печатать полностью прописными буквами.

- Переносы слов, курсив и подчеркивание в заголовках не допускаются.
- Точка в конце любого заголовка не ставится.
- Если заголовок состоит из нескольких предложений, их разделяют точкой.
- Каждая глава курсовой работы начинается с новой страницы. Это же правило относится к другим основным структурным частям работы: введению, заключению, информационным источникам, приложениям.

- Расстояние между заголовком главы и заголовком последующего параграфа составляет 1 пустую строку.

- Расстояние между последней строкой текущего параграфа или пункта и заголовком последующего составляет 1 пустую строку.

- Перед первой строкой текста, следующего за заголовком параграфа (пункта, подпункта), устанавливается интервал 1 пустую строку.

Организация отступов между заголовками и текстом:

ГЛАВА 2. НАЗВАНИЕ ВТОРОЙ ГЛАВЫ

2.1. Первый параграф второй главы

1 пустая строка

Текст первого параграфа второй главы.

1 пустая строка

2.2. Второй параграф второй главы

..... и так далее

3.3.

Введение

Во введении:

- дается общая характеристика рассматриваемой в работе темы;
- обосновывается актуальность работы и основные проблемы для выбора темы;
- формулируются цель и задачи исследования;
- необходимо также определить теоретическую и методическую основу курсовой работы.

Объем введения составляет 1-3 страницы.

Актуальность отвечает на вопрос о том, почему именно сейчас необходимо данное исследование, указывает важность рассматриваемого вопроса в настоящее время.

Под *целью* понимается конечный ожидаемый результат, достижение которого преследуется при выполнении курсовой работы.

Задачи – это этапы работы, последовательным выполнением которых студент достигает поставленную цель. Оптимальным считается наличие 3-х задач.

3.4.

Основная часть

Основная часть курсовой работы излагается последовательно в соответствии с ее содержанием. Все параграфы курсовой работы должны быть логически связаны между собой и в своей совокупности раскрывать ее тему. После каждого параграфа следует формулировать *краткие выводы*.

В основной части курсовой работы раскрываются выдвинутые теоретические и практические положения, рассматриваются имеющиеся точки зрения по данной проблеме, излагается и обосновывается позиция автора по данному вопросу; раскрываются особенности решения данной проблемы на практике, осуществляются конкретные практические мероприятия и разработки, формулируются рекомендации, обосновываются тенденции развития; выполняются расчеты и даются прогнозные оценки.

Структура основной части курсовой работы представлена двумя или тремя главами в зависимости от специфики конкретной дисциплины, цели и концепции исследования. Если курсовая работа содержит две главы, то условно их можно назвать теоретической и практической. Если планируется три главы, то одна из них теоретическая, а две другие носят практико-ориентированный характер и могут условно быть названы аналитической и практической (опытно-экспериментальной) главами.

Первая глава носит в основном общетеоретический характер и является результатом работы студента над литературными источниками, отражающими отечественный и зарубежный опыт, который отвечает цели и задачам курсовой работы. В данной части работы студент должен показать умения критически подходить к рассмотрению проблемы, вытекающей из целей и задач курсовой работы, обобщать, анализировать и систематизировать собранный материал, раскрывать проблемы рассматриваемого вопроса. Таким образом, эта глава служит теоретическим обоснованием будущих разработок, предложений и обобщений соответствующих проблем.

Первая глава может содержать:

1. Определения, основные понятия, сформулированные на основе анализа учебной и научной литературы.
2. Сведения по историческим аспектам исследуемой темы.
3. Критический обзор и анализ правовой и нормативной литературы по теме с акцентированием внимания на нерешенных, противоречивых вопросах.
4. Основные теоретические положения и выводы в результате анализа источников информации.

5. Иллюстрации, цифровые, статистические данные.

Практическая часть курсовой работы может быть представлена одной или двумя главами.

Вторая глава имеет аналитический характер. В ней проводится анализ различных показателей, в том числе экономических, которые рассматриваются в курсовой работе. Написание второй главы осуществляется с применением современных методов и моделей, включая компьютерные технологии с использованием пакетов прикладных программ.

Вторая глава может содержать:

1. Анализ источников, необходимых для проведения практической части исследования.
2. Раскрытие конкретных методов решения той или иной проблемы.
3. Приведение цифрового материала и аналитических таблиц.
4. Планирование проводимого практического исследования. В большинстве случаев предполагается рассмотрение вопросов применительно к условиям России и конкретных организаций. В таких случаях необходимо дать характеристику базового предприятия, согласованную с темой работы.

При написании второй главы студент не должен ограничиваться констатацией фактов, ему необходимо выявить тенденции развития объекта, вскрыть недостатки и анализировать причины, их обусловившие, наметить пути их возможного устранения.

Проведенный в данной главе анализ исследуемой проблемы с учетом теоретического опыта служит базой для разработки конкретных предложений и проведения опытно-экспериментальной работы. От полноты и качества выполнения этого анализа зависит обоснованность выводов работы.

В третьей главе студент может разрабатывать предложения по проблемам совершенствования экономических и иных процессов (в зависимости от изучаемой дисциплины), этапы разрешения этих проблем в конкретном направлении, предлагает рекомендации по улучшению каких-либо характеристик, показателей, проводит опытно-экспериментальную работу и т.д. Здесь важным является аргументация и обоснованность предлагаемых решений, которые должны носить реальный характер.

Таким образом, третья глава может содержать:

1. Предложения возможных вариантов решений проблемных ситуаций.
2. Описание мероприятий и организация практических разработок, направленных на улучшение каких-либо показателей.
3. Описание порядка внедрения собственных разработок и предложений, проведение опытно-экспериментальной работы на примере конкретной организации с оформлением результатов работы.
4. Анализ результатов, полученных в ходе практической части работы, их интерпретация и выводы.

3.5. Заключение

В заключении содержатся итоги работы, важнейшие выводы, к которым пришел автор, указывается их практическая значимость и возможность внедрения результатов работы, дальнейшие перспективы исследования темы. Выводы должны соответствовать задачам курсовой работы. Студент отвечает на вопрос, что им было предпринято для достижения цели и к каким фактическим результатам это привело. Формулируются рекомендации по использованию результатов исследования в организациях или собственной профессиональной деятельности.

Объем заключения составляет 1-3 страницы.

3.6. Информационные источники

Любое использование информации из различных источников должно сопровождаться

ссылками на эти источники с указаниями авторов или учреждений их разработавших. В курсовых работах список литературы и других источников обычно содержит 15-30 наименований в зависимости от специфики изучаемой дисциплины.

При указании автора в тексте работы его инициалы должны стоять перед фамилией (исключение – список литературы и сноски) и не отрываться от фамилии при переносах (для этого в программе Microsoft Word: после инициалов нажать [Ctrl+Shift+Пробел]).

Список информационных источников как структурный элемент курсовой работы оформляется в конце работы перед приложениями (если они есть) и называется «Информационные источники».

Источники нумеруются и располагаются по алфавиту фамилий авторов, а при их отсутствии – по названию источника.

Источники в списке располагаются по следующим блокам, расположенным один за другим, со сквозной нумерацией.

Нормативные документы одного уровня располагаются в алфавитном порядке. При описании нормативно-правовых и официальных документов обязательно указываются название документа, вид, принимающий орган, дату принятия и номер. Затем указывается источник опубликования. В Российской Федерации официальными источниками опубликования документов считаются Российская газета и Собрание Законодательства РФ.

1. Статистические источники (официальные сборники, сообщения, обзоры) оформляются в хронологическом порядке.

Далее оформляются в алфавитном порядке:

2. Учебники, учебные пособия, монографии.

3. Материалы периодической печати (статьи в журналах, газетах).

4. Электронные ресурсы (материалы интернет-сайтов и компакт-дисков).

5. Специальные виды нормативно-технических документов по стандарту
Все неопубликованные тексты, материалы лекций по учебным дисциплинам в библиографический список не включаются.

Образцы библиографического описания источников:

Оформление ссылок может осуществляться двумя путями: в виде сноски на текущей странице и непосредственно ссылкой путем приведения номера согласно списку использованных источников.

Сноски используются для приведения цитат, перевода иноязычного текста, других комментариев, связанных с основным текстом.

- Сноски нумеруются в пределах текущей страницы посредством проставления верхнего индекса сразу после завершения цитаты или после слова, требующего пояснений. Следует соблюдать общепринятые правила цитирования, заключая цитаты в кавычки.

- Текст сноски располагается в конце страницы шрифтом 12 размера через 1 интервал (в рабочей зоне) и отделяется от основного текста линией длиной 50 мм, проведенной в левой части страницы.

- Если описание сноски является библиографическим описанием источника, то необходимо указать номер страницы.

- Не рекомендуется приводить более трех сносок на одной странице.

Пример оформления сносок внизу страницы:

Ссылки бывают двух видов:

1. Внутритекстовые – ссылки на части текста в пределах курсовой работы, включая таблицы, рисунки и приложения.

Примеры: «... в соответствии с параграфом 2.2.»; «... расчеты, приведенные в приложении 1» (на рис. 1.1.; на с. 28; по формуле (3); в табл. 2.4.).

2. Затекстовые–ссылки на источники списка литературы курсовой работы.

Ссылки на источники списка литературы указывают непосредственно в тексте в квадратных скобках. Указывается номер цитируемого источника, затем через запятую могут указываться номера страниц.

Примеры:

Если речь идет о книге одного автора, ссылку указывают следующим образом: «В.И. Подольский [18] считает, что...»

Если ссылаются на определенные страницы литературного источника или делается цитирование, то пишется номер источника и указывается номер страницы: «В своей монографии Л.В. Сотникова [11, с. 44] пишет: «...»».

При ссылке на многотомное издание указывается также и номер тома, например:[22, т. 1, с. 75-76].

Если оформляется ссылка на несколько работ одного автора или на работы нескольких авторов, то в скобках указываются номера этих работ: «Ряд авторов [14, 17, 19]считают...».

3.7. Приложения

Материал, дополняющий текст документа, помещается в приложениях. Приложением может быть, например, разнообразный графический материал, таблица большого формата, расчеты, дополнительные описания, схемы и т.д.

- Приложения помещаются в конце курсовой работы после списка литературы.
- Приложения располагают в порядке ссылок на них в тексте документа.
- Посередине страницы пишется прописными буквами полужирным начертанием слово «ПРИЛОЖЕНИЯ», после которого через одну пустую строку размещается первое приложение.

- Каждое приложение следует начинать с новой страницы с указанием в правом верхнем углу полужирным начертанием слова «Приложение» и его номера арабскими цифрами, например «Приложение 2» (без знака N и точки после цифры). Если приложение единственное во всей работе, то оно не нумеруется.

- Каждое приложение должно иметь тематический заголовок, который пишут под строкой с его номером и выравнивают по центру страницы.

- Если приложение занимает более одной страницы, то на его последней странице справа сверху пишут, например, «Окончание прил.2», а на промежуточной «Продолжение прил. 2».

- Приложения должны иметь общую с основной частью документа сквозную нумерацию страниц.

- Связь основного текста с приложениями осуществляется через ссылки, которые оформляются в круглых скобках по форме: «(см. приложение 1)» или «... представлено в приложении 1».

4. ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ КУРСОВОЙ РАБОТЫ

4.1. Оформление текста

Правила оформления курсовых работ составлены в соответствии с общими требованиями к оформлению текстовых документов по ГОСТ 7.32- 2001, ГОСТ 2.105-95 ЕСКД, общими требованиями и правилами составления библиографического описания по ГОСТ 7.82-2001, ГОСТ 7.1-2003.

Курсовая работа печатается с использованием компьютера и принтера на одной стороне листа белой бумаги одного сорта. Формат листов– А4 (210×297 мм). Рекомендуются использовать текстовый редактор MicrosoftWord.

Требования к установке атрибутов текста:

- Тип шрифта: TimesNewRoman, для заголовков допустимо применение

шрифта Arial.

- Размер шрифта: 14.
- Междустрочный интервал: 1,5 пункта.
- Для акцентирования внимания на определенных терминах, важных моментах, специфических особенностях, содержащихся в основном тексте работы, можно использовать различные начертания шрифтов (полужирный, курсив).
- Размер левого поля страницы – 30 мм, правого – 10 мм, верхнего и нижнего – по 20 мм. Таким образом, одна страница должна содержать примерно 30 строк.
- Основной текст выравнивается по ширине страницы, заголовки – по центру.
- Отступ первой строки абзацев основного текста («красная строка») – 1,25 см (можно установить на линейке текстового редактора, либо в настройках абзаца).
- Рекомендуется контролировать правильность написания отдельных слов и предложений, используя встроенную в текстовый редактор автоматическую систему проверки орфографии и грамматики.

Кавычки и цитаты

В документах, содержащих текст на русском языке, всегда используют только «угловые кавычки».

При оформлении цитат необходимо придерживаться следующих правил:

- Если цитата полностью воспроизводит предложение цитируемого текста, то она начинается с прописной (заглавной) буквы.
- Если в цитату вошла только часть предложения цитируемого источника, то либо в начале, либо в конце текста цитаты ставится многоточие.

Дефис и тире

Различают дефис и тире. Дефис (короткая черта) используется для разделения частей сложных слов (все-таки, по-другому). Дефис никогда не отделяется пробелами. От дефиса отличается знак тире – знак препинания, используемый в предложениях. Тире всегда отделяется пробелами, но не переносится так, чтобы с него начиналась новая строка.

Пробелы

Пробел используется для отделения единиц измерения от числа (120 м), для разделения порядков в больших числах (10 000 км), при этом следует следить, чтобы не возникало переносов.

- Пробелом не отделяются от чисел знаки процентов и градусов, показатели степени (99%, 40°, x²).
- Не ставится пробел перед закрывающей и после открывающей скобок.
- После знака N пробел следует ставить.
- Не следует отступать красную строку пробелами (в Microsoft Word воспользуйтесь соответствующим параметром форматирования абзаца).
- После любого знака препинания ставится пробел.

Перечисления

Встречающиеся в тексте перечисления необходимо оформлять следующим образом.

- Если перечисления состоят из отдельных слов или словосочетаний, то они пишутся в строчку и оформляются с помощью нумерации арабскими цифрами или латинскими буквами и запятыми.

4.2.

Нумерация страниц

- Номера страниц проставляются внизу страницы посередине арабскими цифрами без каких-либо других символов.

- На первой странице (титульном листе) номер не ставится.
- Приложения должны иметь общую с основной частью документа сквозную нумерацию страниц.
- Шрифт, используемый для нумерации, должен быть того же типа, что и у основного текста.
- Размер шрифта чисел нумерации должен быть меньше, чем у основного текста.

4.3. Оформление рисунков, таблиц, формул

Рисунки в курсовой работе могут быть представлены в виде чертежей, схем, графиков, диаграмм, фотографий и иных графических изображений, которые призваны иллюстрировать описываемые в тексте объекты, явления и процессы.

- Рисунки в тексте нумеруются арабскими цифрами сквозной нумерацией (по мере появления во всем тексте работы). При этом первая цифра указывает на номер главы, а вторая на порядковый номер рисунка по мере его появления в тексте. Например, рис. 2.4. – четвертый рисунок второй главы.

- Рисунок размещается в тексте после первого упоминания о нем.
- Рисунки выравниваются по центру страницы.
- На следующей строке после рисунка находится его наименование (подрисуночная надпись), которое также выравнивается по центру страницы и оформляется курсивом 12 размера. Надпись начинается со слова «Рис.», далее следует номер рисунка без символа N. Точка в конце подрисуночной надписи не ставится.

- Единственный рисунок во всей работе не нумеруется и слово «Рис.» перед его названием не пишется.

- На все рисунки документа должны быть приведены ссылки в тексте.

Пример: Отраслевая структура ВРП представлена на рис. 2.4.

- Следующий после рисунка текст начинают печатать, пропустив одну пустую строку после подрисуночной надписи.

• Рисунок
Рис. 2.4. Название рисунка

Таблицы применяют для повышения наглядности, удобства сравнения каких-либо показателей и систематизации материала.

Нумерация

- Таблицы в тексте нумеруются арабскими цифрами сквозной нумерацией. При этом первая цифра указывает на номер главы, а вторая на порядковый номер таблицы по мере ее появления в тексте. Например, Таблица 1.3 – третья таблица первой главы.

- Нумерация таблиц в приложениях осуществляется в пределах каждого приложения.

- Единственная таблица во всей работе не нумеруется.

Размещение в тексте

- На все таблицы документа должны быть приведены ссылки в тексте. Указывается полный номер таблицы, само слово «таблица» пишут в сокращенном виде.

Пример:

Анализируя данные о ВВП (табл. 1.3), можно прийти к следующим выводам.

Можно сослаться и на отдельные части таблицы.

Пример:

Строка	2	табл.	1.3	показывает	соотношение
				рассматриваемых	показателей.

- Сама таблица размещается в тексте после первого упоминания о ней.
- Над правым верхним углом таблицы помещается надпись с номером (например, Таблица 1.3) без знака N перед номером и точки после него.
- Заголовок таблицы располагается по центру страницы на следующей строке после надписи «Таблица 1». Точка в конце заголовка не ставится, переносы не допускаются.
- Следующий после таблицы текст начинают печатать, пропустив одну пустую строку.

Оформление таблицы

- Таблица имеет выравнивание по центру страницы.
- Таблица состоит из строк и столбцов. Столбцы и, иногда, строки имеют заголовки. На пересечении строк и столбцов находятся ячейки. Заголовки столбцов выравниваются по центру и для наглядности могут выделяться полужирным начертанием. Заголовки строк обычно выровнены по левому краю.
- Значения ячеек таблицы, составляющие ее основное содержимое, рекомендуется выравнивать по центру.
- В таблице следует употреблять только общепринятые сокращения.
- Не следует оставлять какие-либо ячейки таблицы пустыми, даже если для них нет данных. В таких случаях нужно ставить в ячейке символ «—». *Перенос таблицы*
- Для переноса таблицы на новую страницу необходимо добавить в нее строку с номерами столбцов (после строки заголовков).
- На новой странице заголовок таблицы не повторяется. В правом верхнем углу указывается, например, «Продолжение табл. 1.3» (если таблица не завершится на данной странице) или «Окончание табл. 1.3» (если таблица заканчивается на данной странице).
- Вместо заголовков столбцов таблицу на новой странице следует начать со строки с нумерацией столбцов.

Формулы

- Уравнения и формулы следует выделять из текста в отдельную строку.
- Выше и ниже каждой формулы или уравнения должно быть оставлено не менее одной свободной строки.
- Если формула не уместится в одну строку, то она должна быть перенесена после знака равенства (=) или после знаков плюс (+), минус (–), умножения (×), деления (:), или других математических знаков, причем знак в начале следующей строки повторяют.
- Пояснение значений символов и числовых коэффициентов следует приводить непосредственно перед или под формулой в той же последовательности, в которой они даны.
- Формулы следует нумеровать порядковой нумерацией в пределах всей работы арабскими цифрами в круглых скобках на той же, что и формула строке в крайнем правом положении.

4.4. Использование числительных, знаков, сокращений

Числительные

Количественные числительные записываются:

- 1) цифрами, если они являются многозначными (23 человека, и т.д.);
 - 2) прописью, если они выражаются одним словом (десять автомобилей, четыре слова).
- В качестве разделителя десятичных знаков в числительных предназначена запятая.

- При невозможности выразить числовое значение в виде десятичной дроби допускается записывать его в виде простой дроби в одну строчку через косую черту (5/32).
- Если при числительном даются в сокращенном обозначении единицы измерения, то такое числительное записывается цифрой, даже если оно однозначное (5 л, 28 кг, 10 000 руб.).
- Порядковые числительные имеют падежные окончания (7-й, 25-й, 250-й). Исключение составляют числительные, которые стоят после существительного, к которому относятся (на рис. 9, в табл. 6).
- При количественных числительных не пишется падежных окончаний, если они сопровождаются существительными (не хватает 15 рублей).
- При записи римскими цифрами порядковые числительные падежных окончаний не имеют (XX век).
- При перечислении нескольких порядковых числительных падежное окончание ставится только один раз (капитаны 1 и 2-го рангов).
- При перечислении однородных чисел (величин и отношений) сокращенное обозначение единицы измерения ставится только после последней цифры (1,50; 1,75; 2,00 м). Следует учесть, что перечисляемые десятичные дроби отделяются знаком «;».
- Если в тексте документа приводят диапазон числовых значений величины, выраженных в одной и той же единице измерения, то обозначение этой единицы измерения указывается после последнего числового значения диапазона (от 1 до 5 мм; от плюс 10 до минус 40°C).

Знаки

В тексте документа, за исключением формул, таблиц и рисунков, не допускается:

- применять математический знак минус («-») перед отрицательными значениями величин (следует писать слово «минус»);
- применять без числовых значений математические знаки («>» (больше), «<» (меньше), «=» (равно), « $\square$ » (больше или равно), « $\square$ » (меньше или равно), « $\square$ » (не равно), а также знаки № (номер), % (процент).

Сокращения

При многократном упоминании словосочетаний, касающихся профессиональной сферы, возможно использование аббревиатур в качестве сокращений. При первом упоминании словосочетание должно быть приведено полным, а рядом в скобках указывается вариант сокращенного названия. При последующих упоминаниях можно употреблять только аббревиатуру. Например, «... необходимо начислить НДС (налог на доходы физических лиц)».

В остальных случаях следует использовать только общепринятые сокращения, такие как:

- и другие – и др.; и так далее – и т.д.; и тому подобное – и т.п.; и прочее – и пр.;
- то есть – т.е.; смотри – см.;
- сокращения физических и других величин (кг; м; л; руб.);
- год – г; годы – гг; век – в.; века – вв.

Пример титульного листа курсовой работы

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Медико-биологический факультет

КУРСОВАЯ РАБОТА
по дисциплине

«НАЗВАНИЕ»

на тему «НАЗВАНИЕ»

Выполнил:

студент _ курса гр. _____ специальности «_____»
ФИО

Руководитель:

Звание, должность
ФИО

Дата защиты _____

Оценка _____

Подпись руководителя _____

Подпись студента _____

Ставрополь, 202_

Перечень примерных тем курсовых работ

1. Белки и аминокислоты

Стереохимия и амфотерность аминокислот.

Характеристика и биологическая роль пептидов.

Методы очистки и идентификации белков.

Простые и сложные белки: сравнительная характеристика.

2. Ферменты

Кинетика ферментативных реакций: каталитические параметры.

Влияние pH и температуры на скорость ферментативных реакций.

Активация и ингибирование ферментов: типы ингибиторов.

Изоферменты: множественные формы и их биологическая роль.

Инженерная энзимология: применение ферментов в медицине и промышленности.

3. Нуклеиновые кислоты и генетика

Структура и функции ДНК: формы двойной спирали, принцип комплементарности.

Типы РНК: строение, свойства и функции (мРНК, рРНК, тРНК).

Биосинтез нуклеиновых кислот: нарушения и мутации.

Генная инженерия: проблемы и перспективы развития.

Методы изучения структуры и функций нуклеиновых кислот.

Рекомбинантная ДНК: технологии получения и применения.

4. Углеводы

Производные моносахаридов: кислоты, гликозиды, аминосахара.

Гетерогликаны и протеогликаны: классификация и биологическая роль.

5. Липиды

Жирные кислоты: насыщенные и ненасыщенные, их биологическая роль.

Фосфолипиды и гликолипиды: структура и функции в мембранах.

Стероиды: холестерол, желчные кислоты, стероидные гормоны.

Эйкозаноиды: принципы химического строения и функции.

6. Витамины и коферменты

Коферментные формы витаминов: биохимическая роль.

Авитаминозы - биохимические основы и последствия.

Гипервитаминозы: биохимические основы и последствия.

7. Специальные и прикладные темы

Биохимия мышечной деятельности: энергетические процессы и метаболиты.

Биохимические основы питания: баланс белков, жиров и углеводов.

Биохимические маркеры заболеваний: диагностика и мониторинг.

Биотехнологические методы в биохимии: ПЦР, секвенирование, масс-спектрометрия.

Биохимия старения: молекулярные механизмы и маркеры.

Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)

Перечень основной литературы

1. Любимова Н.В., Бабкина И.В.; Тимофеев Ю.С. Проведение биохимических исследований – учебник. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2024. – 256 с.
2. Базовый курс биохимии // Под ред. А.И. Глухова, А.Е. Губаревой. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 584 с.
3. Лелевич, С. В. Клиническая биохимия: — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 304 с. — ISBN 978-5-8114-5146-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133476>

Перечень дополнительной литературы

1. Клиническая лабораторная диагностика: сборник ситуационных задач: учебное пособие / Е. Г. Бутолин, В. Г. Иванов, М. В. Терещенко, В. В. Максимова. — 2-е изд. стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2024. — 108 с. — ISBN 978-5-507-47622-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/398480>
2. Биохимия: учебное пособие / А. В. Стрыгин, Б. Е. Толкачев, А. М. Доценко, Е. И. Морковин. — Волгоград : ВолгГМУ, 2022. — 132 с. — ISBN 978-5-9652-0820-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/338252>
3. Клиническая биохимия: учебное пособие / Т. П. Бондарь, К. С. Светлицкий, Н. И. Ковалевич [и др.]. — Ставрополь: СтГМУ, 2020. — 204 с. — ISBN 978-5-89822-635-0. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/216803>
4. Биохимические исследования в клинической практике: Руководство для врачей / А.А. Кишкун. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2014. — 528 с.: ил.
5. Основы биохимического анализа: лабораторный практикум : учебное пособие / составители О. С. Котлярова, С. М. Чыдым. — Новосибирск : НГАУ, 2020. — 77 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/257708>
6. Лелевич, С. В. Теория и практика лабораторных биохимических исследований : учебное пособие для спо / С. В. Лелевич. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 304 с. — ISBN 978-5-507-50169-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/414779>
7. Сборник ситуационных задач по клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / О. С. Абрамовских, И. В. Батигова, И. А. Лаптева [и др.]. — Челябинск : ЮУГМУ, 2023. — 101 с. — ISBN 978-5-94507-261-9. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/442340>
8. Карпенко, Л. Ю. Биологическая химия : учебное пособие / Л. Ю. Карпенко, А. А. Бахта, А. И. Козицына. — Санкт-Петербург : СПбГУВМ, 2022. — 228 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/366575>
9. Кузнецов, О. Е. Лабораторные исследования в клинике : учебное пособие для спо / О. Е. Кузнецов, С. А. Ляликов. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 500 с. — ISBN 978-5-507-51527-1. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/422633>
10. Лабораторный практикум по биохимии для студентов лечебного и педиатрического факультетов : учебное пособие / О. Л. Носарева, Е. А. Степовая, Е. В. Шахристова, Л. В. Спирина. — 3-е изд., доп. и испр. — Томск : СибГМУ, 2023. — 165 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/369047>