

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

Методические указания
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине «ОБЩАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ»
для студентов специальности 30.05.01 «Медицинская биохимия»

Введение

Все процессы, происходящие в живом организме, тесно взаимосвязаны и зависят не только от внутренних, но и от внешних условий и от ферментов.

Цель дисциплины: изучение особенностей химического строения, физико-химических свойств и биологических функций ферментов; их значение для химического превращения веществ в живых организмах и формирования представлений о теоретических основах и основных методах энзимологии.

Задачи дисциплины: 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. сформировать целостное представления о значении энзимов в медицине.

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

Курс 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 медицины.

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.

ТЕМА 1. ВВЕДЕНИЕ В ЭНЗИМОЛОГИЮ

ПОРЯДОК РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ. ОФОРМЛЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОГО ЖУРНАЛА. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: освоить технику безопасности при работе в лаборатории, сформировать навыки ведения и оформления лабораторного журнала.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ:

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 с основными физическими и химическими свойствами используемых веществ, изучить теоретический материал, относящийся к разделу данной темы, 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 (выливать) 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.

ОФОРМЛЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОГО ЖУРНАЛА

Студент обязан вести лабораторный журнал, который является документом, отражающим всю его работу. На обложке или первой странице журнала должны быть написаны фамилия студента, его инициалы, номер группы, учебный год и название практикума.

Для ведения журнала берут общую тетрадь в клетку, в которой сразу же нумеруют все страницы. Первые 2 страницы оставляют для оглавления, которое составляют по ходу работы. Результаты всех измерений или других операций записывают в журнал, используя левые страницы; правые страницы оставляют для расчетов и записей. Запрещается делать записи на отдельных листках бумаги.

Оформление журнала производят только ручкой, лаконично, аккуратно, непосредственно после проведения опыта.

Запись должна содержать:

1. Дату выполнения работы.
2. Название темы и название опыта – записывается полное название, без сокращений.
3. Цель занятия.
4. Теоретические основы занятия.
5. Ход работы.
6. Рисунок или схему используемого прибора – иллюстрации размещаются сразу после ссылки на них в тексте.
7. Уравнения происходящих в опытах реакций.
8. Изменение окраски веществ, выделение газов и характер осадка – желательно оформлять результаты в виде таблицы или графика.

Таблицы по возможности должны быть простыми, чтобы пользователь мог легко уяснить значение помещенных в них данных. Таблицы должны следовать за ссылкой на них. Таблицы нумеруются последовательно в пределах всей работы арабскими цифрами. Перед номером таблицы ставится слово "Таблица". Ниже посередине название таблицы, при необходимости ниже таблицы даются примечания.

Графики строят на миллиметровой бумаге с точным обозначением величин на осях координат, и приводят их единицы измерения; графики снабжают заголовком, проставляют дату эксперимента и вклеивают в журнал.

9. Расчеты, проводимые при выполнении работы. Все физические величины нужно приводить в международной системе СИ. Значение переменных в математических выражениях символов должно быть разъяснено при первом их использовании. Значение каждого символа дают с новой строки в той последовательности, в какой они приведены в формуле. Первая строка расшифровки начинается со слова «где» без двоеточия после него, например:

$$y = a \times b,$$

где: y – выход продукта;
 a, b – постоянные коэффициенты.

10. Указания по технике безопасности – напоминают о правилах работы с веществами в вытяжном шкафу, правила работы с газовой горелкой, электрическими приборами и некоторыми веществами.

11. Выводы - необходимо делать к каждому опыту и всей работе в целом, в том числе и давать ответы на поставленные в занятии вопросы.

12. Литература – к каждому занятию дается основная и дополнительная литература для наиболее удобной работы студентов по изучаемой теме.

Записи в журнале выполняются без сокращения слов и терминов, кроме общепринятых.

Выполняемую работу обязательно записать в тетрадь с указанием номера, названия, цели работы, принципа метода, химизма происходящих реакций или процессов, схемы

исследования и полученных результатов. По результатам работы произвести расчет или оформить полученные данные по предложенной схеме и сделать вывод. Отчет о проведении работ проводится и подписывается преподавателем после каждого занятия.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ

1. Общие требования безопасности

Для обеспечения безопасности труда сотрудников биохимической лаборатории следует руководствоваться международными стандартами надлежащей лабораторной практики (GLP, Good Laboratory Practice), а также общегосударственными законами и ведомственными документами по технике безопасности при проведении работ в лаборатории.

Важным элементом обеспечения безопасных условий работы является правильная организация труда сотрудников лаборатории, рационализация работ.

Во время работы в лаборатории следует неукоснительно соблюдать правила техники безопасности.

Во время работы необходимо соблюдать правила личной гигиены.

Каждый работающий должен быть полностью информирован о требованиях по безопасности труда, принятых в лаборатории и о нахождении в рабочих помещениях средств противопожарной безопасности и аптечки первой помощи.

Для ознакомления с правилами безопасного проведения работ организуется регулярное проведение инструктажа сотрудников по технике безопасности. Результаты инструктажа заносятся в специальный журнал.

Курить в лаборатории запрещается.

Помещения лаборатории должны быть оборудованы специальными контейнерами для сбора мусора и производственных отходов. Утилизация отходов должна проводиться регулярно в соответствии со специальными требованиями по утилизации отходов.

Помещения лаборатории должны быть оборудованы местами хранения повседневной и спецодежды, индивидуальных средств защиты, а также специально выделенными местами для переодевания.

Все помещения лаборатории должны быть оборудованы аптечками для оказания первой (неотложной) помощи.

В каждой лаборатории должны быть хорошая вентиляция, горячий и холодный водопровод, проводка технического тока, канализация, установки для дистилляции воды.

В качестве спецодежды в лаборатории используются лабораторные халаты и перчатки.

Халаты должны быть достаточно длинными и застегиваться полностью, при этом быть закрытыми спереди. Рукава должны плотно охватывать запястья. Перчатки должны быть удобными и достаточно длинными.

Защита глаз обеспечивается защитными очками с противоударными стеклами и защитными масками различной конструкции.

В случае необходимости для защиты органов дыхания используют респираторы различного типа (в зависимости от степени опасности).

Одноразовые средства защиты должны удаляться сразу после загрязнения.

Все химические вещества (реактивы), используемые в биохимической лаборатории, подразделяются на **8 групп хранения** в зависимости от степени их опасности. Особенности правил безопасной работы с определенными реактивами и требования к их хранению зависят от отнесения вещества к той или иной группе хранения (см. таблицу 1).

Таблица 1 - Классификация химических реактивов в биохимической лаборатории

<i>Группа</i>	<i>Общие свойства</i>	<i>Перечень веществ</i>	<i>Условия хранения</i>
I	Взрывчатые вещества	нитроглицерин	
II	Вещества, выделяющие при взаимодействии с водой легковоспламеняющиеся	литий, натрий, кальций металлические; кальция карбид	В сейфе или в шкафу под замком

	газы		
III	Самовозгорающиеся вещества		
IV	Легковоспламеняющиеся жидкости (температура воспламенения ниже 61°C)	диэтиловый эфир, ацетон, этанол	В металлическом ящике или в специальной заводской укладке
V	Легковоспламеняющиеся твердые вещества	сера, фосфор красный	В сейфе или в шкафу под замком
VI	Окисляющие (воспламеняющие) реактивы	калия перманганат, азотная кислота (конц.), нитраты щелочных металлов	В шкафу под замком, отдельно от реактивов IV и V групп
VII	Вещества повышенной физиологической активности (ядовитые)	бром, аммиак, бария нитрат, свинца(II) оксид	В сейфе или в шкафу под замком
VIII	Малоопасные и безопасные вещества	натрия хлорид, сахароза, магния сульфат	нет особых условий хранения

Не допускается совместное хранение химических веществ (реактивов), способных к активному взаимодействию друг с другом.

Ядовитые и сильнодействующие вещества (включая лекарственные препараты списков А и Б) следует хранить в сейфе или специальном шкафу под замком и пломбой.

Вся посуда, содержащая реактивы и готовые реагенты, должна быть маркирована соответствующими этикетками.

Хранить химические вещества (материалы) и готовые реагенты в таре без этикеток или с надписями сделанными стеклографом на стекле, запрещается. Если этикетка утеряна, а идентифицировать содержимое не представляется возможным, содержимое подлежит уничтожению в соответствии с требованиями правил утилизации химических веществ (материалов).

Сосуды с химическими веществами, обладающими потенциально опасными свойствами, должны в обязательном порядке содержать маркировку в соответствии с требованиями ГОСТ:

легковоспламеняющиеся вещества

взрывоопасные вещества материалы.

едкие вещества.

ядовитые вещества.

2. Требования безопасности перед началом работ

Не рекомендуется работать в лаборатории в одиночку, поскольку при несчастном случае некому будет оказать помощь пострадавшему и ликвидировать последствия возможной аварии.

Перед началом работ необходимо проверить исправность оборудования, вентиляции, газовой сети, водопровода, системы электропитания. В случае выявления неисправностей, создающих повышенную опасность, работу в лаборатории запрещается проводить до их устранения.

3. Требования безопасности во время работы

Во время работы следует соблюдать порядок, чистоту и аккуратность, чтобы максимально избежать воздействия вредных и потенциально опасных факторов.

Работы в лаборатории должны проводиться в спецодежде, а при необходимости – с использованием соответствующих индивидуальных средств защиты.

Запрещается пробовать на вкус любые реактивы и расходные материалы, пить, есть и курить в лаборатории за пределами специально отведенных для этого мест.

Пить и есть в лаборатории разрешается только в специально отведенных местах (в отдельном помещении), при этом принимать пищу и напитки в спецодежде запрещается.

Недопустимо превышение длительности рабочего дня над рекомендованными пределами, поскольку это приводит к ухудшению внимания сотрудников и существенно повышает риск производственных аварий.

Все работы можно проводить только в чистой посуде, не содержащей даже следовых количеств предыдущей анализируемой пробы или каких-либо реагентов. Использованная посуда должна сразу после проведения анализов мыться или складываться в специально отведенном месте для грязной посуды во избежание её повторного использования.

Во время нагревания жидких и твердых веществ в пробирках и колбах нельзя направлять их отверстия на себя или других людей. Нельзя заглядывать сверху в открыто нагреваемые сосуды во избежание возможных травм при выбросе горячей массы из сосуда.

При эксплуатации приборов и аппаратов следует руководствоваться инструкциями и правилами, изложенными в их техническом паспорте и руководстве по эксплуатации.

В процессе эксплуатации аппаратуры должна быть исключена возможность её падения. Запрещается прикасаться к движущимся и вращающимся частям используемого оборудования.

Все электрические приборы должны быть заземлены, если отсутствие заземления не предусмотрено их конструкцией. По возможности следует избегать использования удлинителей.

Электроплитки, муфельные печи и иные электронагревательные приборы должны быть размещены на термоизолирующем материале.

Недопустимо оставлять во включенном состоянии без присмотра электронагревательные приборы, за исключением тех, что по своему назначению и конструкции предназначены для круглосуточной работы.

Брать в руки сосуды с любыми веществами и реагентами следует одной рукой за горлышко, а другой – аккуратно поддерживая сосуд снизу за дно.

Никакие вещества в лаборатории нельзя пробовать на вкус.

Нюхать вещества можно, лишь осторожно направляя на себя пары или газы легким движением руки, но ни в коем случае не наклоняясь к сосуду и не вдыхая пары (газы) полной грудью.

Пролитые жидкие вещества (реагенты), обладающие опасными свойствами, следует немедленно нейтрализовать, посуду тщательно обезвредить и очистить, запачканную одежду – обезвредить и передать в стирку.

При использовании для дозирования жидких реактивов пипеток категорически запрещается затягивать реактивы в пипетки ртом.

Категорически запрещается уже отмеренные реактивы сливать (высыпать) обратно в сосуды, из которых их отмеряли.

Легковоспламеняющиеся вещества запрещается помещать в термостат.

При работе с едкими веществами необходимо пользоваться индивидуальными средствами защиты (перчатки, защитные очки).

Запрещается приливать воду к кислоте.

При работе с едкими и летучими веществами запрещается пользоваться контактными линзами.

При пролитии едких веществ следует немедленно засыпать пролитое вещество сухим песком, удалить его и тщательно промыть место разлива водой.

Запрещается выливать ртуть в канализацию, для сбора ртути следует использовать стеклянную толстостенную банку с водой, закрывающуюся резиновой пробкой. Пролитую ртуть собирают с помощью стеклянной ловушки с резиновой грушей, а её мельчайшие капельки – ветошью, смоченной 0,1% раствором KMnO_4 , слегка подкисленным HCl . После

этого поверхность обрабатывают 20% водным раствором FeCl_3 и промывают водой.

Запрещается выливать в раковины концентрированные растворы щелочей и кислот, органические растворители, легковоспламеняющиеся, горючие и взрывоопасные вещества, щелочные металлы. Все указанные отходы должны обязательно собираться в специальные ёмкости.

4. Требование безопасности в аварийных ситуациях

В каждом помещении необходимо иметь средства противопожарной защиты. Необходимый минимум первичных средств пожаротушения:

- Пенные огнетушители типа ОХП-10, ОХВП-10, порошковые огнетушители типа ОП-1, ОП-2Б
- Закрывающийся крышкой ящик с сухим просеянным песком вместимостью не менее $0,05 \text{ м}^3$, укомплектованный совком вместимостью не менее 2 кг песка. Вместо ящика песок можно размещать в металлических сосудах вместимостью по 4–6 кг.
- Накидки из огнезащитной ткани (1,2 x 0,5 м).

Загорания в помещениях лаборатории необходимо немедленно ликвидировать, при этом:

- Легковоспламеняющиеся и горючие жидкости, электропроводку и оборудование, находящееся под напряжением, следует гасить только песком, огнезащитной тканью или порошковыми огнетушителями.
- Обесточенные электропроводку и приборы можно гасить водой.
- Загорание в вытяжном шкафу ликвидируется первичными средствами пожаротушения только после отключения вентилятора.

Во всех помещениях лаборатории должны быть размещены планы (схемы) эвакуации сотрудников при возникновении пожара и иных чрезвычайных ситуаций, требующих немедленно покинуть помещение.

Недопустимо загромождать проходы и выходы помещений лаборатории, поскольку это может привести к повышенному риску для сотрудников при необходимости срочно покинуть помещение.

5. Требование безопасности по окончании работы

По окончании работ необходимо проверить отключение электроприборов, закрытие газовых и водопроводных кранов.

Все химические вещества, представляющие опасность должны быть убраны в места их постоянного хранения.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Порядок работы в лаборатории.
2. Оформление лабораторного журнала.
3. Техника безопасности при работе в лаборатории.
4. Определение предмета энзимологии и ее задачи.
5. Значение работ отечественных ученых в развитии энзимологии.
6. Значение работ зарубежных ученых в развитии энзимологии.
7. Биологическая роль ферментов.
8. Применение ферментов.
9. Последние достижения в изучении ферментов.
10. Связь энзимологии с другими науками.

ТЕМА 2. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить свойства ферментов, определить оптимальную температуру действия ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ:

Скорость ферментативной реакции зависит от температуры. Оптимальным считается то

значение ее, при котором реакция протекает с максимальной скоростью. Повышение температуры сверх оптимальной приводит к уменьшению, а затем прекращению действия фермента, что связано с денатурацией. Инактивация ферментов высокой температурой необратима, используется в пищевой промышленности для консервирования многих продуктов растительного и животного происхождения.

1. ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТЬ α -АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ

Ферменты термоллабильны, т.е. чувствительны к высокой температуре. Свойство ферментов инактивироваться при кипячении можно показать на примере α -амилазы слюны.

Материалы исследования и реактивы: 1% раствора крахмала, раствор Люголя, реактивы для реакции Троммера.

Приборы и посуда: пробирки, спиртовки.

Ход работы

В пробирку отливают около 2 мл разбавленной слюны и кипятят в течение 2-3 мин (следя за тем, чтобы образующаяся пена также прогревалась), после чего охлаждают. В две пробирки наливают по 10 капель 1% раствора крахмала. В одну из них добавляют 10 капель разбавленной слюны, в другую – 10 капель разбавленной слюны, предварительно прокипяченной и остуженной.

Содержимое обеих пробирок перемешивают и ставят в термостат при 37°C на 10 мин. После действия фермента на субстрат из каждой пробирки отбирают по 3-5 капель жидкости в заранее заготовленные пробирки с 1-2 каплями раствора Люголя. Проба из пробирки с не прокипяченной слюной окрашивания с йодом не дает. Проба из пробирки с предварительно прокипяченной слюной дает с йодом синее окрашивание.

С оставшейся жидкостью в обеих пробирках производят реакцию Троммера. Она положительна там, где была не прокипяченная слюна, и отрицательна в случае действия на крахмал предварительно прокипяченной слюной. Полученные данные занести в таблицу 1.

Таблица 1 – Термоллабильность амилазы

Фермент	Субстрат	Наличие крахмала в гидролизате	Реакция Троммера
α -амилаза			
Прокипяченная амилаза			

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Скорость химической реакции повышается в 2-4 раза при повышении температуры на 10°C. Однако из-за белковой природы фермента повышение температуры приведет к тепловой денатурации молекул фермента.

Материалы исследования и реактивы: 0,5% раствора крахмала, лед, раствор Люголя.

Приборы и посуда: пробирки, термостат, водяная баня, спиртовка, стакан.

Ход работы

В пробирки 1-4 вносят по десять капель 0,5% раствора крахмала. В пробирки 5-8 вносят по 10 капель разведенной в 10 раз слюны.

Пробирки 1 и 5 помещают на 10 мин в лед. Пробирки 2 и 6 оставляют при комнатной температуре, пробирки 3 и 7 ставят в термостат при температуре 37°C, пробирки 4 и 8 – в кипящую воду.

Через 10 мин сливают вместе (попарно) содержимое пробирок, тщательно перемешивают и оставляют стоять 10 мин.

Затем из каждой пробирки отбирают несколько капель жидкости и проделывают на стекле реакцию с йодом. Если окраска получается синей, оставляют раствор еще на 10 мин и после этого повторяют реакцию с йодом на стекле до появления оранжевой окраски.

Полученные результаты занести в таблицу 2.

Таблица 2 - Определение оптимальной температуры действия ферментов

Номер пробирок	Температура, °C	Окраска с йодом, мин		
		1	10	20
1 и 5	0			

2 и 6	20			
3 и 7	37			
4 и 8	100			

3. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ПЕПСИНА

Пепсин (от греч. *pépsis* – пищеварение) вырабатывается слизистой желудка в виде неактивного предшественника – пепсиногена, который превращается в пепсин под влиянием HCl. Это эндопептидаза, расщепляющая центральные пептидные связи в молекулах белков с образованием более простых пептидов и свободных аминокислот. С наибольшей скоростью пепсин гидролизует пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами – тирозином и фенилаланином, однако, в отличие от др. протеолитических ферментов – трипсина и химотрипсина – строгой специфичностью не обладает. Кристаллический пепсин обладает большой каталитической активностью – 1 г его растворяет за два часа 50000 г сваренного яичного белка.

Материалы исследования и реактивы: молочноацетатная смесь, желудочный сок.

Приборы и посуда: пробирки, водяная баня.

Ход работы

В четыре пробирки наливают по 2 мл молочноацетатной смеси. Первую пробирку помещают в кипящую водяную баню; вторую – в водяную баню при 40°C; третью – оставляют при комнатной температуре; четвертую – в лед. Через 10 мин, когда содержимое примет необходимую температуру, во все пробирки добавляют по 0,1 мл желудочного сока, быстро перемешивают и оставляют в тех же условиях. Наблюдая за моментом появления на стенках пробирок первых сгустков казеина, образующегося из казеиногена под действием пепсина, отмечают оптимальную температуру действия данного фермента.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Материалы исследования и реактивы: капустный сок, гидрохинон, лед, пероксида водорода.

Приборы и посуда: пробирки, банка с теплой водой, банка с горячей водой.

Ход работы

Натрите капустную кочерыжку на терке, сок отожмите через марлю и разбавьте водой в 10-20 раз. Пронумеруйте пробирки и налейте в пробирки 1, 2, 3 и 4 по 1 мл разбавленного капустного сока, а затем добавьте гидрохинон на кончике ножа. В пробирки 5 и 6 вместо сока налейте по 1 мл воды и тоже насыпьте гидрохинон. А затем расставьте пробирки следующим образом: 1 – в банку со снегом или льдом; 2 – в банку с теплой водой (40°C); 3 – в банку с горячей водой (60°C); 4 – оставьте на столе при комнатной температуре; 5 – в банку с кипящей водой; 6 – оставьте при комнатной температуре.

Через 5 мин после начала опыта во все пробирки, начиная с более холодных, влейте по пять капель пероксида водорода. Смесь осторожно взболтайте и заметьте время начала реакции. Еще через 5 мин выньте пробирки из банок и запишите результаты опыта в виде таблицы.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТИ ДЕГИДРАЗ ДРОЖЖЕЙ

Дегидразы – группа ферментов, отнимающих водород от окисляемого органического вещества в промежуточных реакциях гликолиза, брожения, дыхания и при неких других окислительно-восстановительных процессах в организме.

Материалы исследования и реактивы: суспензия из свежих дрожжей, суспензия прокипяченных дрожжей, метиленовый синий.

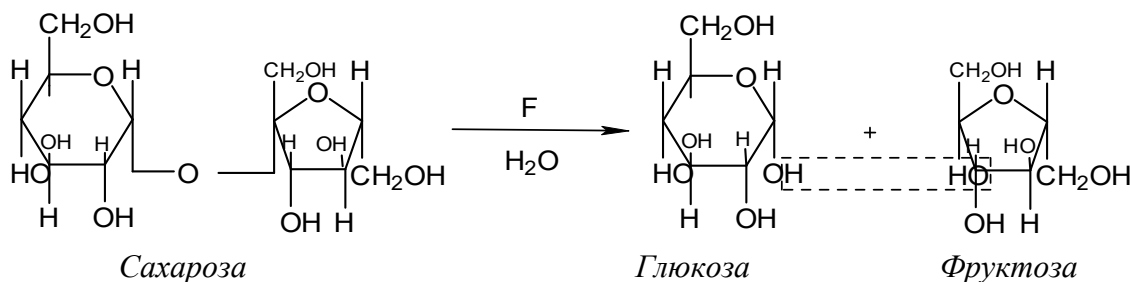
Приборы и посуда: пробирки, термостат.

Ход работы

В первую пробирку помещают суспензию из свежих дрожжей, а во вторую – суспензию прокипяченных дрожжей (на 5% растворе сахарозы) по 3 мл. Добавить в каждую по 2-3 капли метиленовой сини и поставить в термостат при 37°C на 10 мин. Объясните, почему изменяется окраска, и в какой пробирке. Поясните механизм действия фермента.

6. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТИ ИНВЕРТАЗЫ

Инвертазу обычно получают из дрожжей.



Материалы исследования и реактивы: пивные или прессованные дрожжи, песок, вода, 5% NaOH, 1% сахароза, Фелинговая жидкость.

Приборы и посуда: воронка, бумажный фильтр, термостат.

Ход работы

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

Берут четыре пробирки, в первые две приливают по 1 мл инвертазы, 2 мл 5% раствора NaOH и нагревают до кипения. В две другие приливают по 1 мл инвертазы. Затем во все четыре пробирки приливают по 5 мл 1% раствора сахарозы. Третью и четвертую пробирки ставят на 15 мин в термостат при 37°C. По истечении указанного времени в них 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.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Термолабильность ферментов.
2. Назовите оптимальные температуры для ферментов животного, растительного и микробного происхождения.
3. Как влияет снижение температуры, от оптимальной до 0°C и ниже, на скорость ферментативной реакции. Чем можно объяснить это влияние?
4. Как определить оптимальную температуру действия ферментов?
5. Постройте график зависимости ферментативной активности в зависимости от влияния температуры.
6. Ускоряется ли реакция окисления при повышении температуры без добавления фермента?
7. Можно ли сказать, что ферменты лучше действуют при охлаждении?
8. Почему пищевые продукты дольше сохраняются в холодильнике? Для чего кипятят молоко?
9. Почему теплокровные животные – млекопитающие и птицы – наиболее развитые и жизнеспособные животные на Земле?

ТЕМА 3. ОБЩИЕ СВОЙСТВА И СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить влияние pH среды на активность ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ:

Ферменты, подобно всем белковым молекулам несут заряженные группы. Общий заряд белковой молекулы зависит от pH среды. Зависимость скорости ферментативной реакции от величины pH носит колоколообразный характер. Основное количество ферментов проявляют максимальную активность в узком диапазоне pH – оптимум pH. Для большинства из них оптимум pH 7,4, однако для пепсина – 1-1,5, для трипсина – 8,6. При очень низких и очень высоких значениях pH ферменты денатурируют.

1. ВЛИЯНИЕ pH НА АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНА

Для определения влияния pH на активность трипсина проводят расщепление казеина

трипсином при различных значениях pH реакционной смеси. В ходе реакции увеличивается количество аминокислот, которые определяют методом формолового титрования. Источником фермента служит обезжиренный и высушенный препарат поджелудочной железы – панкреатин, содержащий ряд ферментов, в том числе и активный трипсин.

Материалы исследования и реактивы: казеин 0,1н NaOH, 0,5% раствора Na₂CO₃, 0,1н раствора NaOH, 0,5% раствора NaHCO₃, 0,1н раствора NaOH, лед, панкреатин, 5% раствора ТХУ, 1% раствора фенолфталеина.

Приборы и посуда: колбы, термостат, фильтр, пробирки.

Ход работы

Готовят 3 навески казеина по 100 мг и 3 навески панкреатина по 30 мг. В три колбы наливают растворы с различными значениями pH: а) 5 мл 0,1 н NaOH; б) смесь 5 мл 0,5% раствора Na₂CO₃ и 0,15 мл 0,1 н раствора NaOH; в) смесь 5 мл 0,5% раствора NaHCO₃ и 0,15 мл 0,1 н раствора NaOH.

В каждую колбу вносят по 100 мг казеина; тщательно размешивают палочкой и быстро измеряют pH с помощью универсальной индикаторной бумаги. Затем в каждую вносят по 30 мг панкреатина и проводят инкубацию в течение 25 мин при комнатной температуре, время от времени перемешивая реакционную смесь.

Перед окончанием инкубации проверяют pH смесей и ставят колбы в ледяную воду для прекращения реакции. К охлажденным пробам добавляют по 5 мл 5% раствора ТХУ для осаждения белков. Через 5 мин отфильтровывают осадок, фильтрат анализируют вместе с контрольной пробой.

Контролем служат пробы с 5 мл 0,1 н NaOH и казеином, в которые до добавления панкреатина приливают 5 мл охлажденного 5% раствора ТХУ. После удаления осадка фильтрат контрольных проб обрабатывают так же, как и опытные пробы.

Нейтрализация и титрование. Из содержимого каждой колбочки отбирают в другие колбочки по 5 мл трихлоруксусного фильтрата, добавляют к нему по 5 капель 1% раствора фенолфталеина и 5-10 капель 0,1н NaOH до получения отчетливой розовой окраски раствора. После этого осторожно, по каплям, добавляют, встряхивая после каждой капли, 0,1н HCl до слабо-розовой окраски.

К нейтрализованным пробам приливают по 2 мл 20% раствора формальдегида. Содержимое колб перемешивают и титруют 0,025 н раствором щелочи.

Расчет активности. Активность трипсина может быть выражена количеством миллиграммов аминного азота, нарастающего за время инкубации:

$$A = (B - B_0) \cdot 0,35,$$

где A – активность трипсина;

B – объем 0,025 н раствора щелочи, пошедший на титрование опытной пробы, мл;

B₀ – объем 0,025 н раствора щелочи, пошедший на титрование контрольной пробы, мл;

0,35 – количество азота, эквивалентное 1 мл 0,025 н раствора щелочи, мг.

Вычисляют средние величины активности трипсина по данным титрования и строят график зависимости активности трипсина от pH: для этого на оси абсцисс откладывают значения pH, а на оси ординат – величины активности трипсина. Сделать вывод об оптимуме pH трипсина.

2. ЗАВИСИМОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ОТ РЕАКЦИИ СРЕДЫ

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

Влияние pH 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.

Материалы исследования и реактивы: Na_2HPO_3 , лимонная кислота, слюна, крахмал, раствор Люголя, раствор йода, лед.

Приборы и посуда: термостат, пробирки, предметное стекло.

Ход работы

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

Таблица 1 – Приготовление буферных растворов

№	pH	Объем 0,2 М раствора Na_2HPO_3 , мл	Объем 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°C на 10 мин. После чего из пробирки 3 отбирают несколько капель жидкости и на стекле смешивают с раствором Люголя. Если получается синее окрашивание, то реакцию с йодом повторяют каждые 5 мин до тех пор, пока не будет красного или оранжевого окрашивания, которое указывает на близкий конец гидролиза. Через 2-3 мин 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 степень распада крахмала. Результаты занести в таблицу 2.

Таблица 2 – 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		

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.

3. ВЛИЯНИЕ pH НА АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ СОЛОДА

Материалы исследования и реактивы: буферные растворы, H_3BO_3 , CH_3COOH , NaOH , 1% раствора крахмала.

Приборы и посуда: пробирки.

Ход работы

Нумеруют 5 пробирок и в каждую вносят по 4 мл буферного раствора со следующими значениями pH: 2,87; 4,10; 5,33; 6,59; и 7,96 или близкими к каждому из этих значений. Буферные растворы нужных значений pH готовят смешением раствора № 1 и раствора № 2 в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – Составление буферных растворов для амилазы солода

Раствор, мл		pH
№ 1	№ 2	
100,0	17,5	2,86

100,0	25,0	4,10
100,0	37,5	5,33
100,0	47,5	6,59
100,0	60,0	7,96

Раствор № 1 с pH 1,81: в колбе вместимостью 1 л растворяют 0,04 моль H_3BO_3 , 0,04 моль H_3PO_4 , 0,04 моль CH_3COOH .

Раствор № 2: представляет собой раствор с концентрацией NaOH 0,2 М. Во все пробирки добавляют по 2 мл 1% раствора крахмала и по 0,5 мл вытяжки из солода. Содержимое перемешивают и в дальнейшем поступают точно так же, как описано ранее. Результат оформить в виде таблицы 4. Зависимость активности амилазы от pH среды представить графически, откладывая по оси абсцисс значение pH среды, при котором проводился гидролиз крахмала, а по оси ординат – время в минутах, необходимое для гидролиза крахмала до стадии эритродекстрина. Сделать вывод, при каком значении pH оптимум действия фермента.

Таблица 4 – Влияние pH на активность амилазы солода

Показатели	Номера пробирок				
	1	2	3	4	5
pH	2,87	4,10	5,33	6,59	7,96
Окраска с йодом					

4. ВЛИЯНИЕ СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ

Материалы исследования и реактивы: картофель, 5% раствора NaOH и 5% HCl, 3% H_2O_2 .

Приборы и посуда: пинцет, чашки Петри, Лакмусовая бумага.

Ход работы

Три кусочка картофеля по 1 см³ немного раздробить пинцетом, положить в чашки Петри. Лакмусовой бумагой определить pH сока картофеля, 5% раствора NaOH и 5% HCl.

На первый наносим несколько капель 3% H_2O_2 . Наблюдаем образование газа. На второй капнем 5% NaOH, ждем 1 мин и затем капнем H_2O_2 . Что наблюдаем? Третий обрабатывается несколькими каплями 5% HCl и H_2O_2 , также как второй – NaOH.

Результаты сравниваются в соответствии с показателями pH. Сделать выводы. Аналогичный опыт проделать с кусочками сырого мяса.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каково оптимальное значение pH среды для ферментативной активности ферментов?
2. Как определить изменение активности амилазы под влиянием pH? Характеристика оптимальных pH и её параметры для амилазы слюны.
3. Каковы физико-химические основы влияния оптимальной pH на активность ферментов?
4. Каковы физико-химические основы влияния на активность ферментов сдвига pH от зоны оптимума в любую сторону?
5. Практическое применение знаний о влиянии pH на скорость ферментативных реакций и процессов.
6. Нарисуйте графики зависимости активности ферментов от pH среды.

ТЕМА 4. НОМЕНКЛАТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить ферменты различных классов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ:

Оксидоредуктазы катализируют реакции биологического окисления и восстановления, т. е. реакции, связанные с процессами дыхания, гликолиза и брожения; активность некоторых дегидрогеназ в сыворотке крови служит дополнительным диагностическим тестом при ряде заболеваний.

1. ОБНАРУЖЕНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ МОЛОКА

Материалы исследования и реактивы: молоко, вода, раствор формальдегида, раствор метиленового синего, масло.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, водяная баня.

Ход работы

Пронумеруйте шесть пробирок. В пробирки 1 и 2 налейте по 5 мл свежего некипяченого молока, а в пробирку 3 - такое же количество холодного кипяченого молока. Воду в водяной бане нагрейте до 37°C. Во все три пробирки добавьте по 0,5 мл (около 50 капель) раствора формальдегида и по 5 капель раствора метиленового синего. Смесь станет голубой. В каждый флакон налейте немного масла, чтобы образовался тонкий изолирующий слой на поверхности, и поставьте пробирки 1 и 3 на водяную баню.

Пробирку 2 оставьте при комнатной температуре. Заметьте время начала реакции и наблюдайте за изменением окраски растворов. Результаты нужно записать в тетрадь.

2. ОБНАРУЖЕНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ДРОЖЖАХ

Материалы исследования и реактивы: прессованные дрожжи, вода, сахарный песок, краситель.

Приборы и посуда: пластмассовая или алюминиевая ложка, пипетка, пробирки, ватный тампон на палочке, водяная баня.

Ход работы

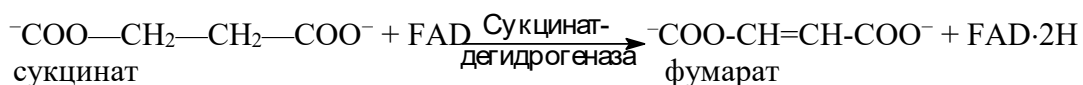
Кусочек прессованных дрожжей разотрите на блюде с двумя чайными ложками кипяченой воды. Растирать лучше пластмассовой или алюминиевой ложкой. Когда смесь станет однородной, внесите ее чистой пипеткой в две пробирки. Их надо предварительно вымыть с мылом ватным тампоном на палочке, промыть водой и высушить. Другой пипеткой добавьте в обе пробирки немного масла.

Пробирку 1 поставьте на пять минут в кастрюлю с кипящей водой и охладите до комнатной температуры. В обе пробирки добавьте по щепотке сахарного песка и осторожно взболтайте, чтобы сахар растворился. Третьей пипеткой введите в обе пробирки по 10-15 капель раствора красителя. Наблюдайте за окраской раствора.

Опыт можно несколько усложнить, для этого понадобится больше пробирок. Попробуйте изменять температуру раствора, брать разные количества дрожжей и сахарного песка. Сделайте выводы.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

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



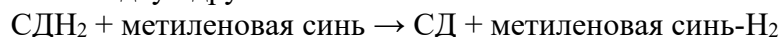
Материалы исследования и реактивы: мышечная кашица, 3% раствор янтарной кислоты, 10% NaOH, дистиллированная вода, 3% яблочная кислота, 0,02% раствора метиленовой сини.

Приборы и посуда: термостат, пробирки, штатив.

Ход работы

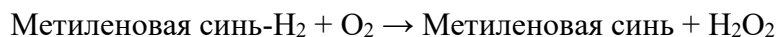
В 3 пронумерованных пробирки помещают 3-4 мл мышечной кашицы и добавляют в первую – 1 мл 3% раствора янтарной кислоты, нейтрализованной по лакмусу 10% раствором NaOH; во вторую – 1 мл дистиллированной воды; в третью – 1 мл 3% яблочной кислоты.

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°C. 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.



4. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ ЦИТРАТНОГО 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.

Материалы исследования и реактивы: мышечная кашица, цитрат натрия, сукцинат натрия, сульфосалициловая кислота, раствор метиленовой сини, вазелинового масла.

Приборы и посуда: термостат или водяная баня.

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.

5. ОТКРЫТИЕ АЛЬДЕГИДОКСИДАЗЫ МОЛОКА

Альдегидоксидаза относится к классу оксидоредуктаз. Окисляемыми субстратами, на которые действуют оксидоредуктазы, могут быть спиртовая группа (-ОН), альдегидная (-СНО), кетонная (-СО), этильная (-CH₂-CH₂-) и др., а также восстановленные формы пиридиновых коферментов – никотинамид-адениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) и др.

Материалы исследования и реактивы: молоко, 0,4% формалина, вода, 0,01% раствора метиленового синего, вазелинового масла.

Приборы и посуда: водяная баня, пробирки, штатив, термостат.

Ход работы

В три пробирки наливают по 5мл свежего молока. Одну пробирку кипятят в течение 2-3 мин и остужают (1 пробирка). В первую и вторую пробирки наливают по 1 мл 0,4% раствора формалина, а в третью – 1 мл воды. Во все три пробирки приливают по 1 мл 0,01% раствора метиленового синего.

Содержимое пробирок хорошо перемешивают и заливают в каждую по 3-4 капли вазелинового масла для предохранения жидкости от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробирки помещают в водяную баню при температуре до 40°C. Через 15-30 мин в одной из них происходит обесцвечивание жидкости. В какой и почему? Почему не происходит обесцвечивание в двух других? Сделайте вывод.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Сохраняет ли фермент свою активность в кипяченом молоке?
2. При какой температуре раствор обесцвечивается быстрее?
3. Что произойдет, если продуть через обесцвеченный раствор воздух?
4. Восстанавливается ли краситель в присутствии прокипяченной кашицы из мяса? Нужна

ли для этой реакции янтарная кислота?

5. Сходно ли поведение ферментов из тканей при высокой температуре?
6. Приведите примеры реакций, катализируемых дегидрогеназами.
7. Назовите ферменты, катализирующие окисление этилового спирта, пировиноградной, яблочной, янтарной, щавелево-уксусной кислот.
8. Раскройте механизм действия дегидрогеназ.

ТЕМА 5. ТЕОРИИ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ И МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить специфичность действия ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ:

Специфичность действия ферментов – это способность катализировать одну или несколько близких реакций, преобразовывать одно вещество или один вид связей. Специфичность ферментов бывает нескольких видов: абсолютная, относительная (групповая), стереохимическая.

1. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты специфичны в отношении как типа катализируемых реакций, так и субстратов, на которые они действуют. Так, амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов, не оказывая действия на белки. Сычужный фермент воздействует на казеин молока, но не влияет на полисахариды и т. д.

Материалы исследования и реактивы: 1% раствор крахмала, молоко, слюна, разбавленная в 5–10 раз, 0,1% раствор йода в 0,2% растворе йодида калия, 1% раствор сычужного фермента.

Приборы и посуда: пробирки, водяная баня, пипетки емкостью 1 и 5 мл.

Ход работы

Берут четыре пробирки, нумеруют их. В пробирки 1 и 2 наливают по 5 мл раствора крахмала, а в пробирки 3 и 4 – по 5 мл молока. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 1 мл разбавленной слюны, а в пробирки 2 и 4 – по 1 мл раствора сычужного фермента. Все 4 пробирки на 10–15 мин ставят в водяную баню с температурой 37–40 °С. По истечении указанного времени наблюдают произошедшие изменения в пробирках с молоком, а расщепление крахмала проверяют добавлением в пробирки 2–3 капель раствора йода в йодиде калия. Полученные результаты заносят в таблицу 1.

Таблица 1 – Определение специфичности ферментов

Субстраты и ферменты	Номера пробирок			
	1	2	3	4
Крахмал	+	+	-	-
Казеин молока	-	-	+	+
Амилаза	+	-	+	-
Сычужный фермент	-	+	-	+
Изменение цвета				

Объясните результаты опыта.

2. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ АМИЛАЗЫ

Фермент амилаза катализирует гидролитическое расщепление крахмала. Промежуточными продуктами могут быть декстрины. Степень гидролиза крахмала можно контролировать по цветной реакции с йодом. Крахмал дает с йодом синее окрашивание, декстрины окрашиваются йодом в разные цвета (фиолетовый, красно-бурый), а конечные продукты (мальтоза или глюкоза) с йодом окраски не дают. Второй контрольной пробой может быть реакция Троммера, указывающая на наличие свободных альдегидных групп (в

глюкозе). В крахмале свободных альдегидных групп нет (проба Троммера отрицательна).

Материалы исследования и реактивы: 0,5% раствора крахмала, 0,5% раствора сахарозы, реактивы для реакции Троммера, 30% NaOH, 7% раствора CuSO₄, раствор Люголя.

Приборы и посуда: Пробирки, термостат, пипетки, спиртовки.

Ход работы

В одну пробирку наливают 10 капель 0,5% раствора крахмала, в другую – 10 капель 0,5% раствора сахарозы. В обе пробирки вносят по 5 капель слюны, разведенной в 5 раз. Содержимое пробирок перемешивают и ставят на 10 мин в термостат при 40°C. Затем содержимое пробирок с крахмалом делят на две части. После этого в пробирке с сахарозой и в одной из пробирок с крахмалом проводят качественную реакцию Троммера и убеждаются в том, что произошло расщепление только крахмала, но не сахарозы.

К 5 каплям содержимого пробирок добавляют 5 капель 30% NaOH и несколько капель 7% раствора CuSO₄ до появления исчезающей мути гидроокиси меди Cu(OH)₂. При нагревании до кипения выпадает желтый осадок CuOH или красный осадок закиси меди Cu₂O.

В другой пробирке с крахмалом, чтобы подтвердить его расщепление, ставят реакцию с йодом. В этом случае раствор не приобретет синей окраски. К 2-3 мл раствора крахмала приливают 1 каплю раствора Люголя; жидкость окрашивается в синий цвет, исчезающий при нагревании и появляющийся при охлаждении.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ САХАРАЗЫ

Сахаразу – фермент, расщепляющий дисахарид сахарозу на глюкозу и фруктозу, можно легко получить из дрожжей. Ее действие обнаруживается по появлению в инкубационной среде свободной глюкозы, дающей положительную качественную реакцию Троммера. Сахароза этой реакции не дает, так как полуацетальный гидроксил в ее глюкозном остатке участвует в соединении с глюкозой. Для исследования специфичности действия ферментов удобно пользоваться сахарозой, содержащейся в вытяжке из дрожжей.

Материалы исследования и реактивы: раствор Люголя, реактивы для реакции Троммера, 0,5% раствора сахарозы, 0,5% раствора крахмала.

Приборы и посуда: фарфоровая ступка, пробирки, воронка, фильтровальная бумага.

Ход работы

0,5 г дрожжей растирают в фарфоровой ступке. Добавляют 3 мл воды и растирают дрожжи с водой; при этом сахараза переходит в раствор. Смесь фильтруют через небольшой складчатый фильтр, полученный фильтрат служит источником сахаразы.

В одну пробирку наливают 10 капель 0,5% раствора сахарозы; в другую – 10 капель 0,5% раствора крахмала и в обе пробирки вносят по 5 капель дрожжевого фильтрата, содержащего сахаразу. Обе пробирки ставят на 10 мин в термостат при 40°C, после чего в обеих пробирках проводят реакцию Троммера и убеждаются в том, что расщепляется только сахароза, но не крахмал. В пробирке с крахмалом проводят цветную реакцию с раствором Люголя. Результаты работы записывают в таблицу 2.

Таблица 2 – Определение специфичности действия амилазы и сахаразы

Фермент	Субстрат	Контрольные реакции (+ или –)	
		Реакция на крахмал	Реакция Троммера
Амилаза слюны	Крахмал		
Сахараза дрожжей	-"-		
Амилаза слюны	Сахароза		
Сахараза дрожжей	-"-		

4. ГРУППОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ САХАРАЗЫ

Сахараза специфична по отношению к фруктозной части сахарозы и рафинозы. Расщеплению подвергается бетта-гликозидная связь, расположенная ближе к фруктозной части данных молекул. Продукты ферментативного гидролиза сахарозы и рафинозы дают положительную реакцию с реактивом Фелинга.

Материалы исследования и реактивы: 1% раствор сахарозы, 1% раствор раффинозы, реактив Фелинга.

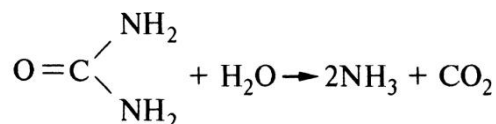
Приборы и посуда: пробирки, термостат, спиртовки.

Ход работы

В две пробирки наливают по 1 мл препарата сахарозы, в одну добавляют 2 мл 1% раствора сахарозы, в другую 2 мл 1% раствора раффинозы. Обе пробирки ставят на 10 мин в термостат при 38°C, после чего в обеих пробирках проводят реакцию с реактивом Фелинга, перемешивают и нагревают до кипения. В обеих пробирках образуется красный осадок оксида меди.

5. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ УРЕАЗЫ

Метод основан на том, что уреаза катализирует расщепление мочевины на CO₂ и аммиак. Появление аммиака обнаруживается фенолфталеином.



Материалы исследования и реактивы: р-р мочевины, соевая мука, раствора фенолфталеина,

Приборы и посуда: пробирки, пипетки.

Ход работы

В одну пробирку наливают 1 мл раствора мочевины, в другую – 1 мл раствора тиомочевины. В обе пробирки добавляют либо 10 мг соевой муки, либо 1 мл 2% экстракта из соевой муки. В каждую пробирку добавляют по 2-3 капли раствора фенолфталеина и содержимое обеих пробирок встряхивают.

Таблица 3 – Определение специфичности действия уреазы

№ пробы	Препарат уреазы, мл	Раствор мочевины, мл	Раствор тиомочевины, мл	Раствор фенолфталеина	Результат реакции с фенолфталеином
1	10	1	—	2-3 капли	
2	10	—	1	2-3 капли	

Пробирки оставляют стоять на столе при комнатной температуре и через несколько минут наблюдают появление розовой окраски в пробирке с мочевиной и отсутствие окраски в пробирке с тиомочевиной. Результаты работы записывают в таблицу 3.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Характеристика специфичности действия ферментов.
2. Чем обусловлена специфичность действия каждого фермента?
3. Методы изучения специфичности ферментов
4. Виды специфичности ферментов
5. Напишите уравнения реакций абсолютной специфичности действия ферментов.
6. Напишите уравнения реакций групповой специфичности действия ферментов.
7. Напишите уравнения реакций стереоспецифичности действия ферментов.

ТЕМА 6. КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить влияние ингибиторов на активность ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ:

Ингибиторы ферментов – это вещества, вызывающие частичное (обратимое) или полное торможение реакций, катализируемых ферментами. Также существуют антиферменты (антиэнзимы или антизимы), представляющие собой белки (или полипептиды), действующие как ингибиторы ферментов. К подобным веществам относятся, например, ингибитор трипсина, обнаруженный в соевых бобах, и сывороточный ингибитор трипсина. Изучение антиферментов помогло синтезировать новые лечебные средства, обладающие антиферментными свойствами, например эзерин, прозерин, фокурит (диакарб),

трасилол и др.

Иногда ингибитор является составным компонентом предшественника фермента (например, пепсина), или входит в состав сложных комплексов ферментов (например, в состав протеинкиназы и протеинфосфатазы, катализирующих процессы фосфорилирования-дефосфорилирования в живых организмах).

1. ИНГИБИРОВАНИЕ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ

Из ингибиторов ферментов известны соли синильной кислоты, угнетающие некоторые «геминные» ферменты, монойодуксусная кислота, приостанавливающая спиртовое и молочнокислое брожение, фосфорорганические соединения, необратимо инактивирующие ряд эстераз и др.

Материалы исследования и реактивы: вода, 1% раствора NaCl, CuSO₄, слюна, крахмал, раствор йода.

Приборы и посуда: пробирки, штатив.

Ход работы

Слюну разбавляют в 5 раз. Берут три пробирки. В первую наливают 1 мл воды, во вторую – 0,3 мл воды и 0,2 мл 1% раствора NaCl, в третью – 0,8 мл воды и 0,2 мл 1% раствора CuSO₄.

Во все пробирки добавляют по 1 мл раствора слюны. Содержимое перемешивают и добавляют по 0,5 мл крахмала.

Снова перемешивают и ставят в термостат при температуре 37°C на 5 мин. Затем все пробирки одновременно охлаждают в стакане со льдом.

Во все пробирки добавляют раствор йода. По окраске судят о скорости гидролиза крахмала. Результаты работы заносят в таблицу 1 и делают выводы.

Таблица 1 – Активирование и ингибирование фермента

№	Добавленное вещество	Окраска после добавления йода	Вывод
1	Вода		
2	NaCl		
3	CuSO ₄		

2. ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ НА ДЕГИДРОГЕНАЗНЫЙ КОМПЛЕКС КАРТОФЕЛЯ

Материалы исследования и реактивы: картофель, йодид натрия, хлорат калия.

Приборы и посуда: нож, доска.

Ход работы

Делают 4 среза на картофелине. Первый срез оставляют для контроля, второй посыпают хлоридом натрия, третий – йодидом натрия, четвертый – хлоратом калия. Через 20 мин срезы трех половинок темнеют, а один остается без изменения. Сделайте выводы.

3. ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА ТРАСИЛОЛОМ

Трасилол – полипептид, выделенный из околоушных желез крупного рогатого скота. Является ингибитором ряда протеолитических ферментов – трипсина, фибринолизина, химотрипсина. Используется для лечения острого и хронического панкреатита, панкреонекроза.

Материалы исследования и реактивы: 1% раствор казеина; раствор трипсина (4% в 0,005 н. HCl); трасилол (аптечный препарат); 10% раствор трихлоруксусной кислоты; 3% раствор желатина; 0,5н раствор NaOH; Фосфатный буфер с pH=7,8; реактив Фолина.

Приборы и посуда: пробирки; пипетки на 1, 2 и 5 мл; термостат.

Ход работы

1. Гидролиз казеина. В ряд пробирок вносят по 1 мл раствора казеина, 1,5 мл фосфатного буфера и по 0,5 мл раствора трипсина, содержимое пробирок тщательно перемешивают. Затем в первую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую пробирку 1 мл трасилола, в третью пробирку 0,5 мл трасилола и 0,5 мл воды, в

четвертую пробирку 0,25 мл трасилола и 0,75 мл воды, в пятую пробирку (контрольная проба) добавляют 3 мл раствора ТХУ.

Все пробы тщательно перемешивают и инкубируют в термостате при 37°C в течение 20 мин. Затем в пробирки 1-4 добавляют по 3 мл 10% раствора ТХУ, перемешивают и через 10 мин все пробы фильтруют через маленькие воронки с бумажными фильтрами в сухие пробирки. Фильтрат должен быть совершенно прозрачен.

2. Определение степени гидролиза белка. Готовят 5 пробирок, в каждую наливают по 5 мл раствора гидроксида натрия, 2,5 мл соответствующего фильтрата и 0,5 мл реактива Фолина. Все пробирки перемешивают и выдерживают 30 мин. Оптическую плотность опытных растворов определяют по отношению к контрольному на фотоколориметре при длине волны 656-670 нм.

Задание:

1. Изучить гидролиз казеина трипсином в присутствии ингибитора трасилола.
2. Определить при какой концентрации трасилола активность фермента снижается в 2 раза, сделать выводы по проделанной работе.

4. ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ – ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

Взаимодействие ионов металлов с белками лежит в основе использования молока как противоядия при отравлении тяжелыми металлами.

Материалы исследования и реактивы: амилаза, 1% раствора крахмала, 1% раствора $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, молоко, вода, 1% йода.

Приборы и посуда: пробирки.

Ход работы

В опытную пробирку наливают по 1 мл раствора амилазы, 1% раствора крахмала, 1% раствора $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ и молока. В контрольную пробирку наливают вместо молока воду. Пробирки встряхивают и выдерживают 20 мин при температуре 30°C. Добавляют в обе пробирки по 1 капле 1% йода. В обеих пробирках есть ионы Pb^{2+} , инактивирующие амилазу. Но в присутствии молока активность амилазы сохраняется, о чем свидетельствует отсутствие синего окрашивания раствора при добавлении йода.

5. 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.

Материалы исследования и реактивы: Навеска свежей мышцы, сукцинат, вода, малонат, 1% раствора метиленового синего, вазелиновое масло.

Приборы и посуда: марля, пробирки, стеклянная палочка, водяная баня, штатив.

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 таблице 2.

Таблица 2 – 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		

Во все пробирки добавляют по 2-3 капли 1% раствора метиленового синего и после перемешивания по 3-4 капли вазелинового масла. Пробирки ставят на водяную баню,

нагретую до 40°C. Через 3-5 мин наблюдается изменение окраски в пробирках.

Полученные результаты внести в таблицу 2.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие вещества называются ингибиторами ферментов?
2. Перечислите виды ингибирования ферментов.
3. Дайте определение необратимому ингибированию ферментов.
4. Приведите пример веществ, являющихся необратимыми ингибиторами энзимов.
5. Приведите примеры применения необратимого ингибирования ферментов в медицине.
6. Дайте определение обратимому ингибированию ферментов.
7. Перечислите виды обратимых ингибиторов.
8. Дайте определение конкурентному ингибированию энзимов.
9. Приведите примеры веществ, являющихся конкурентными ингибиторами.
10. Нарисуйте график Михаэлиса-Ментен для конкурентного ингибирования.
11. Как изменяется константа Михаэлиса и максимальная скорость ферментативной реакции при конкурентном ингибировании? Объясните причину таких изменений.
12. Нарисуйте график Лайнуивера-Берка для конкурентного ингибирования.
13. Приведите примеры действия лекарственных веществ как конкурентных ингибиторов.
14. Дайте характеристику неконкурентным ингибиторам ферментов.
15. Как изменяется константа Михаэлиса и максимальная скорость ферментативной реакции при неконкурентном ингибировании? Объясните причину таких изменений.
16. Нарисуйте график Михаэлиса-Ментен для неконкурентного ингибирования.
17. Нарисуйте график Лайнуивера-Берка для неконкурентного ингибирования.
18. Приведите примеры веществ, являющихся неконкурентными ингибиторами.
19. Применение ингибиторов в энзимологии и медицине.
20. Ретроингибирование.

ТЕМА 7. ИНГИБИТОРЫ И АКТИВАТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить влияние активаторов на активность ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ:

Скорость ферментативной реакции, как и активность фермента, в значительной степени определяется присутствием в среде активаторов. Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции указывают разнообразные вещества органической и неорганической природы. Например, соляная кислота активирует действие пепсина желудочного сока.

1. ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ НА АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ

Материалы исследования и реактивы: дистиллированная вода, 0,05 н раствора HCl, 0,05 н раствора CH₃COOH, 0,1 н раствора NaOH, 1% раствора NaCl, раствор крахмала, раствор слюны, раствор Люголя.

Приборы и посуда: пробирки, термостат при 37°C, стеклянная пластинка, стеклянная палочка.

Ход работы

Пронумеровать 5 пробирок. В первую пробирку налить 1 мл дистиллированной воды, во вторую – 1 мл 0,05 н раствора HCl, в третью – 1 мл 0,05 н раствора CH₃COOH, в четвертую – 1 мл 0,1 н раствора NaOH и в пятую – 1 мл 1% раствора NaCl. Во все пробирки добавить по 5 мл раствора крахмала (стараясь это сделать одновременно) и затем по 5 мл раствора слюны. Все пробирки поместить в термостат при 37°C.

Через каждые 2 мин исследуют жидкость из каждой пробы на реакцию с йодом. Для этого на стеклянную пластинку, помещенную на белую поверхность, наносят стеклянной палочкой каплю раствора Люголя и добавляют к ним стеклянной палочкой, отдельной для каждой пробы, каплю жидкости из каждой пробирки.

Повторяют взятие проб до тех пор, пока не обнаруживается прекращение изменения окраски (от синей к фиолетовой и от красной к желтой) в пробах жидкости. Отмечают время,

пошедшее на образование декстринов в смесях с разными добавленными электролитами.

В выводах по работе необходимо отметить влияние на скорость гидролиза различных электролитов, добавленных к крахмалу. Скорость гидролиза крахмала в каждом случае сравнивают с первой пробой, являющейся контрольной ко всем остальным.

Для наглядности удобно суммировать полученные результаты в таблице 1, отмечая в ней окраску с йодом различных проб.

Таблица 1 – Влияние электролитов на активность амилазы

Состав пробы	Время инкубации, мин						
	0	2	4	6	8	10	12
Слюна + дистиллированная вода + крахмал							
Слюна + раствор соляной кислоты + крахмал							
Слюна + раствор уксусной кислоты + крахмал							
Слюна + раствор едкого натра + крахмал							
Слюна + раствор хлористого натрия + крахмал							

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ

Специфичность каталазы в отношении к субстрату-восстановителю невелика, поэтому она может катализировать не только разложение H_2O_2 , но и окисление низших спиртов. Расщепляя H_2O_2 , каталаза играет защитную роль. Она обезвреживает ядовитое вещество (пероксид водорода), которое непрерывно образуется в клетке в процессе жизнедеятельности. Активность фермента очень высока: при $0^\circ C$ – 1 молекула катализатора разлагает за 1 секунду до 40000 молекул H_2O_2 .

Материалы исследования и реактивы: картофель, HCl ; раствор этилендиаминтетраацетата, H_2O_2

Приборы и посуда: пробирки.

Ход работы

Приготовить экстракт картофеля. Разлить его в 4 пробирки по 1 мл и провести опыт в соответствии со следующей схемой.

Довести до кипения и охладить; добавить 10 капель HCl ; добавить 15 капель раствора этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА); добавить 1 мл H_2O_2 . Отметить все изменения и оформить результаты в виде таблицы 2.

Таблица 2 – Определение влияния веществ на активность каталазы

Реагенты	Наблюдения	Уравнения реакции
HCl		
ЭДТА		
H_2O_2		

3. ДЕЙСТВИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА НА АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ

Формальдегид – высокореакционноспособное карбонильное соединение, способное реагировать с белками, разрушая их структуру. В этом заключается его токсическое действие на организм человека.

Материалы исследования и реактивы: крахмал, амилаза, 5% формальдегида, вода, 1% раствора Люголя.

Приборы и посуда: пробирки, термостат.

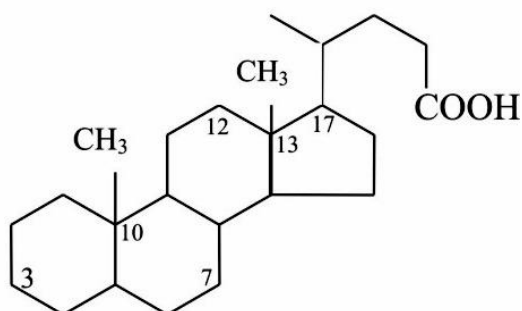
Ход работы

В опытную пробирку приливают по 1 мл растворов крахмала, амилазы и 5% формальдегида. В контрольную пробирку приливают по 1 мл раствора крахмала, амилазы и воды. Выдерживают 20 мин при $30^\circ C$. Затем в обе пробирки добавляют по 1 капле 1% раствора Люголя. Синее окрашивание в пробирке с формальдегидом свидетельствует об

инактивации амилазы.

4. ВЛИЯНИЕ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ

Для действия липазы на жир необходимо присутствие желчных кислот образующихся в печени. Они вызывают эмульгирование жиров, приводящее к увеличению поверхности соприкосновения жира с липазой. По химической природе желчные кислоты являются производными холановой кислоты.



Холановая кислота

В качестве источника липазы используют вытяжку из поджелудочной железы или препарат панкреатина. Жирные кислоты обнаруживаются титрованием щелочью.

Опыт предусматривает три варианта воздействия на жир: 1) липазой без желчи, 2) липазой вместе с желчными кислотами, 3) желчью без липазы.

Материалы исследования и реактивы: масло, 1% раствора фенолфталеина 10% раствора NaOH, 0,1 н. раствор NaOH

Приборы и посуда: пробирки, бюретки.

Ход работы

В колбочку наливают 10 мл масла, приливают 2 капли 1% раствора фенолфталеина и 4 капли 10% раствора NaOH (избегать избытка), после чего при тщательном перемешивании содержимого колбы осторожно добавляют 0,1 н. раствор NaOH до слабо-розовой окраски.

Из нейтрализованного раствора готовят в конических колбах опытные пробы по схеме, представленной в таблице 3.

Таблица 3 – Приготовление опытных проб

№	Испытуемый образец, мл	Панкреатин, мг	Желчь, мл	Вода, мл
1	5	100	—	1
2	5	100	1	—
3	5	—	1	—

Данные фиксируют в таблице 4.

Таблица 4 – Гидролиз триглицеридов

t, мин. V0,01н NaOH, мл	0	10	20	30	40	50
Опытная проба без желчи						
Опытная проба с желчью						

Пробы тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре.

Через 15 мин от начала инкубации пробы титруют из бюретки 0,1 н раствором NaOH до слабо-розовой окраски, после чего вновь оставляют при комнатной температуре. Количество израсходованной щелочи фиксируют в таблице 4.

Титрование проб повторяют через 15, 30, 45 и 60 мин от начала инкубации. Каждый раз оттитровывается то количество жирных кислот, которое освобождается из жира при его гидролизе липазой за данный отрезок времени (15 мин).

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

$$X = \frac{2 - экв_{COOH-групп} \cdot 0,1 \cdot A \cdot 100}{5},$$

где 0,1 – нормальность раствора NaOH;

A – количество 0,1 н. раствора NaOH, израсходованного на титрование 5 мл масла за все время инкубации (сумма всех титрований), мл;

5 – количество масла в титруемой пробе, мл.

5. СРАВНЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ И ФЕРМЕНТОВ

Главное отличие ферментов от катализаторов неорганической природы состоит в исключительно высокой каталитической активности и ярко выраженной специфичности действия в условиях нормальной температуры, pH и давления.

Материалы исследования и реактивы: 1% раствора крахмала, 10% раствора H₂SO₄, вытяжка из солода .

Приборы и посуда: пробирки, термостат, водяная баня.

Ход работы

В пять пробирок наливают по 3 мл 1% раствора крахмала. В первую и пятую добавляют по 1 мл воды, во вторую – 1 мл вытяжки из солода, в третью и четвертую – по 1 мл 10% раствора H₂SO₄.

Таблица 5 – Сравнение действия катализаторов и ферментов

№ пробы	Субстрат, 2 мл	Катализатор, 1 мл	Температура, °С	После инкубации	
				Проба с р-м Люголя	Проба Троммера
1	Крахмал	Вода	37-38		
2	Крахмал	Амилаза	37-38		
3	Крахмал	Кислота	37-38		
4	Крахмал	Кислота	100		
5	Крахмал	Вода	100		

Содержимое перемешивают и первые три пробирки ставят в термостат при 37-38°С, а четвертую и пятую – в кипящую водяную баню. Через 20 мин пробирки из термостата и водяной бани убирают, горячие охлаждают до комнатной температуры и в каждой проводят пробы с йодом и пробу Троммера. Расщепление крахмала шло в тех пробирках, где содержимое окрашено в желтые, красные и фиолетовые тона.

Записывают окраску содержимого каждой пробирки и на основании полученных результатов делают вывод о том, какие из исследованных веществ являются катализаторами и при какой температуре происходит их каталитическое действие. Результаты опыта заносят в таблицу 5.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение аллостерической регуляции активности ферментов.
2. Какой уровень структурной организации характерен для аллостерических ферментов?
3. Объясните механизм регуляции активности ферментов по типу аллостерической модификации. Обратимо ли действие аллостерических модуляторов?
4. Какие регуляторные ферменты называются гомотропными?
5. Нарисуйте схему регуляции активности фермента по принципу прямой положительной связи.
6. Какие регуляторные ферменты называются гетеротропными?

7. Нарисуйте схему регуляции активности фермента по принципу обратной отрицательной связи.
8. Какие регуляторные ферменты называются гомогетеротропными?
9. Нарисуйте график зависимости между концентраций субстрата и скоростью реакции, катализируемой регуляторным ферментом.
10. Как называются этапы метаболических путей, катализируемых регуляторными ферментами?
11. Механизм регуляции активности ферментов по типу химической модификации.
12. Перечислите соединения, которые могут быть активаторами ферментов.
13. Назовите возможные механизмы активирующего действия ионов металлов на ферменты.
14. Механизм активации ферментов частичным протеолизом.
15. Приведите примеры ферментов, активация которых идет частичным протеолизом.
16. Какое биологическое значение имеет биосинтез протеолитических ферментов в виде зимогенов?

ТЕМА 8. ЭНЗИМОПАТИИ

Цели работы

- Ознакомиться с классификацией и примерами энзимопатий.
- Изучить методы диагностики энзимопатий, включая определение активности ферментов и молекулярно-генетические исследования.
- Провести экспериментальное исследование, демонстрирующее принципы нарушения ферментативных процессов (например, влияние различных факторов на активность ферментов).
- Научиться интерпретировать результаты лабораторных тестов в контексте энзимопатий.

Теоретическая часть

Классификация энзимопатий:

- **Первичные (наследственные)** — вызваны генетически обусловленной недостаточностью одного или нескольких ферментов. Примеры:
 - альбинизм (дефицит тирозиназы);
 - гликогеноз I типа (дефицит глюкозо-6-фосфатазы);
 - фенилкетонурия (дефицит фенилаланингидроксилазы);
 - галактоземия (нарушение превращения галактозы в глюкозу из-за дефицита GALT). rep.bsmu.by +2
- **Вторичные (приобретённые)** — являются следствием патологических процессов, сопровождающихся нарушением активности ферментов. Примеры: энзимопатии при панкреатите, гепатите, алиментарные нарушения.

Механизмы нарушений:

- мутация гена, кодирующего фермент;
- синтез дефектного фермента с изменённой активностью;
- накопление промежуточных продуктов обмена;
- дефицит необходимых веществ. grsmu.by +1

Методы диагностики:

- определение активности ферментов в биологических жидкостях (кровь, моча); grsmu.by +1
- спектрофотометрия, хроматография для анализа продуктов реакции;
- молекулярно-генетические методы (ПЦР, ДНК-зонды) для выявления мутаций; rep.bsmu.by +1
- исследование изоферментов и их распределения в тканях.

Практическая часть

Пример эксперимента: влияние ингибиторов на активность ферментов

Цель: продемонстрировать, как внешние факторы (ингибиторы) влияют на активность ферментов.

Материалы и реактивы:

- амилаза (фермент);
- крахмал (субстрат);
- раствор Люголя (для детекции крахмала);
- формальдегид (ингибитор);
- пробирки, термостат.

Ход работы:

- В опытную пробирку добавить 1 мл раствора крахмала, 1 мл амилазы и 1 мл 5% формальдегида.
- В контрольную пробирку добавить 1 мл крахмала, 1 мл амилазы и 1 мл дистиллированной воды.
- Выдержать пробирки 20 минут при 30 °С.
- Добавить в каждую пробирку по 1 капле раствора Люголя.
- Оценить результаты: синее окрашивание в пробирке с формальдегидом свидетельствует об инактивации амилазы.

Оформление работы:

- Заполнить таблицу с результатами:

Пробирка	Условия	Окраска с йодом	Вывод
Опытная	Амилаза + крахмал + формальдегид	Синяя	Инактивация фермента
Контрольная	Амилаза + крахмал + вода	Отсутствие окраски	Нормальная активность

- Сделать вывод о влиянии ингибитора на ферментативную реакцию.

Дополнительные задания

- Исследовать влияние температуры или pH на активность фермента (например, пепсина).
- Провести качественный тест на определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД) в эритроцитах (метод может включать использование флюоресцирующих реагентов).
- Рассчитать активность фермента по данным спектрофотометрии, используя коэффициент молярной экстинкции.

ТЕМА 9. ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить активность ферментов желудочно-кишечного тракта.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ:

Большинство пищеварительных ферментов относится к классу гидролаз.

Пепсин – протеолитический фермент класса гидролаз, вырабатываемый главными клетками слизистой оболочки желудка, осуществляет расщепление белков пищи до пептидов. Пепсин вырабатывается слизистой желудка в виде неактивного предшественника - пепсиногена, который превращается в пепсин под влиянием HCl.

Эластаза – вырабатывается поджелудочной железой животных и человека; катализирует расщепление пептидных связей в белках, главным образом между остатками нейтральных аминокислот. Фермент активен в отношении эластина. Выделяется в форме неактивной проэластазы, которая под действием фермента трипсина превращается в эластазу. Обнаружена у некоторых бактерий.

Трипсин – фермент класса гидролаз, расщепляющий пептиды и белки; обладает также эстеразной (гидролиз сложных эфиров) активностью. Трипсин отличается высокой специфичностью и избирательно гидролизует пептидные связи, образованные основными аминокислотами – лизином и аргинином. Трипсин обладает противовоспалительным и противоотечным действием (при внутривенном и внутримышечном введении); способен избирательно расщеплять ткани, подвергшиеся некрозу. В медицине трипсин применяют для

лечения ран, ожогов, тромбозов и др., часто в сочетании с др. ферментами и антибиотиками.

Химотрипсин – фермент, расщепляющий белки и пептиды; содержится в секрете поджелудочной железы животных и человека. Вместе с трипсином участвует в расщеплении белков пищи в тонком кишечнике. Синтезируется в клетках поджелудочной железы в виде профермента химотрипсиногена, который под действием трипсина превращается в кишечнике в активный химотрипсин.

1. ИССЛЕДОВАНИЕ РАБОТЫ ПЕПСИНА

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

Материалы исследования и реактивы: желудочный сок, дистиллированная вода, порошок углекислого кальция, 0,2% соляная кислота, молоко.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, термостат.

Ход работы

Берут 4 пробирки. В 1-ю наливают 2 мл желудочного сока. Во 2-ю – 1 мл желудочного сока, 1 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 – 2 мл прокипяченного желудочного сока.

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

Результаты занести в таблицу 1.

Таблица 1 – 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.

Материалы исследования и реактивы: желудочный сок, 0,1% раствор пепсина в 0,2% соляной кислоте, 0,4% раствор NaOH, 0,2% раствор HCl.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, термостат.

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 подщелоченных 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 мин 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 2.

Таблица 2 – 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. ДЕЙСТВИЕ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА НА БЕЛОК

Материалы исследования и реактивы: желудочного сока, вода, белок.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, водяная баня, лед.

Ход работы

Пронумеровать 4 пробирки. В каждую из них налить по 1 мл желудочного сока. Желудочный сок в пробирке №2 предварительно нагреть до кипения и охладить, в пробирке №3 – нейтрализовать 0,5% раствором NaOH (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°C; №4 – в стакан со льдом.

Через каждые 8-10 мин содержимое пробирок взбалтывать.

Через 30 мин отметить, какие изменения произошли с белком.

Результаты наблюдения записать в таблицу 3.

Таблица 3 – Действие желудочного сока на белок

№	Содержимое пробирки	Температура, °C	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.

4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕПСИНА В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ ПО ПЯТНИЦКОМУ

В основе метода лежит способность пепсина в желудочном соке створаживать белок – казеиноген. Створаживание молочно-ацетатной смеси при pH 4,9 и температуре 25°C пепсином происходит строго параллельно его способности переваривать белки. За единицу активности пепсина принимают то его количество, которое при указанных условиях створаживает 5 мл молочно-ацетатной смеси за 60 сек (эта условная единица соответствует 0,010 г. кристаллического пепсина). Желудочный сок человека в норме содержит в 1 мл 40-60 ед. пепсина.

При ахилии пепсин в желудочном соке может полностью отсутствовать, а при язвенной болезни желудка количество пепсина резко увеличено.

Материалы исследования и реактивы: Ацетатный буфер с pH 4,9; молочно-ацетатная смесь; хлористоводородная кислота, 2 н. раствор; стандартный раствор пепсина, Желудочный сок или раствор пепсина.

Приборы и посуда: Термостат; водяная баня; секундомер; микропипетки вместимостью 0,1 мл; термометр.

Ход работы

На дно пробирки с помощью микропипетки приливают 0,1 мл желудочного сока, а в другую пробирку наливают 5 мл молочно-ацетатной смеси. Помещают обе пробирки в водяную баню, нагретую до 25°C на 5 мин. Быстро приливают молочно-ацетатную смесь в пробирку с испытуемым желудочным соком и одновременно включают секундомер, пробирку встряхивают. Момент приливания смеси отмечают по секундомеру. Пробирку со смесью держат в водяной бане, наклоняют ее и следят за появлением на ее стенках первых хлопьев казеина. В момент их появления секундомер останавливают и записывают время створаживания смеси в секундах.

Расчет. Для расчета активности пепсина в 1 мл желудочного сока делят число 60 на количество найденных секунд, и таким путем находят количество единиц пепсина в 0,1 мл желудочного сока, а умножая на 10 – в 1 мл. Например: створаживание смеси произошло за 15 сек, следовательно, в 0,1 мл желудочного сока будет 4 единицы пепсина ($60:15 = 4,0$ единицы), а в 1 мл – 40 единиц, или 0,40 мг кристаллического пепсина ($40 \cdot 0,010 = 0,4$ мг).

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (по Кубелько)

Материалы исследования и реактивы: дистиллированная вода, вытяжка поджелудочной железы, раствор казеина, уксусно-спиртовой раствор.

Приборы и посуда: пробирки, штатив.

Ход работы

Реактивы смешивают в количествах, указанных в таблице 4.

Пробирки со смесью выдерживают при 37°C 30 мин, после чего охлаждают под струей холодной воды и затем в каждую из пробирок добавляют 0,5 мл уксусно-спиртового раствора. Активность исчисляется в так называемых казеиновых числах по формуле:

$$КЧ = \frac{1250}{A \cdot B},$$

где А – объем испытуемого вещества железы, взятого для приготовления 500 мл вытяжки, мл;

В – объем вытяжки, находящейся в первой прозрачной пробирке, мл.

Таблица 4 – Определение активности поджелудочной железы по Кубелько

№	Дист. вода, мл	Вытяжка подж. жел., мл	Раствор казеина, мл
1	0,9	0,1	5,0
2	0,8	0,2	5,0
3	0,7	0,3	5,0
4	0,6	0,4	5,0
5	0,5	0,5	5,0
6	0,4	0,6	5,0

7	0,3	0,7	5,0
8	0,2	0,8	5,0
9	0,1	0,9	5,0
10	-	0,1	5,0

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (по Фульд-Гроссу)

Материалы исследования и реактивы: раствор казеина, ацетатная смесь.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, водяная баня.

Ход работы

Реагенты смешивают в количествах, указанных в таблице 5.

Во все пробирки наливают по 5 мл раствора казеина и, смешав, ставят на водяную баню при 40°C на 30 мин.

Затем пробирки вынимают, добавляют в каждую по 0,5 мл ацетатной смеси. Последняя прозрачная пробирка считается предельной.

Таблица 5 – Определение активности поджелудочной железы

Пробирки	Вытяжка поджелудочной железы, мл	Объем H ₂ O _{дист} , мл
1	5	-
2	4	1
3	3,2	1,8
4	2,5	2,5
5	2,0	3,0
6	1,5	3,5
7	1,0	4,0
8	0,5	4,5
9	0,25	4,75
10	0,15	4,85
11	0,1	4,9

Для определения активности ферментов железы число 50 делят на объем вытяжки, содержащейся в пробирке. Стандартным является препарат, отвечающий активности 25 единиц (5 пробирка).

7. ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА ФЕРМЕНТАМИ ЖКТ

Различные ферменты в разной степени гидролизуют крахмал.

Материалы исследования и реактивы: 0,5% раствора крахмала, вода, желудочный сок, вытяжка из поджелудочной железы.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, стекло, термостат.

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°C. Через каждые 5 мин проводить йодную пробу. Через 30 мин с содержимым трех пробирок проделать пробу Фелинга. Результаты занести в таблицу 6.

Таблица 6 – Гидролиз крахмала

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

8. 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 $pH=8-8,7$.

Материалы исследования и реактивы: раствор трипсина, соляная кислота, фибрин.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, водяная баня.

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.

9. 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.

Материалы исследования и реактивы: 0,1% раствора крахмала, вытяжки поджелудочной железы, 10% раствора гидроксида натрия, 2% раствора сульфата меди.

Приборы и посуда: пробирки, штатив.

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 мин 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.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какова роль энтеропептидаз и экзопептидаз ЖКТ?
2. Проферменты ферментов ЖКТ.
3. Какие ферменты ЖКТ вам известны? На что они действуют?
4. Как можно обнаружить фермент в биологическом материале?
5. Химическая природа протеолитических ферментов, их строение и структура.
6. Модели фермент-субстратного взаимодействия.
7. Гидролиз белков. Протеолитические ферменты желудочного сока.
8. Состав желудочного сока. Роль соляной кислоты в переваривании белков.
9. Проферменты. Активирование проферментов. Пепсиноген.
10. Применение пепсина.

ТЕМА 10. ЭНЗИМОТЕРАПИЯ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность препаратов на основе ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В норме активность амилазы сыворотки, определенная амилокластическим методом, составляет 15–30 г/(ч·л). Источником сывороточной амилазы служит поджелудочная железа

и слюнные железы. У здорового человека количество слюнной и панкреатической амилазы примерно одинаково. Возрастание активности амилазы крови (гиперамилаземия) наблюдается при остром панкреатите, когда она повышается в 10–30 раз, достигая максимума через 24 ч после начала заболевания, а затем постепенно приходит к норме на 2–6 день. При хронических панкреатитах гиперамилаземия умеренная. Она встречается также при поражении слюнных желез. Гиперамилаземия отмечается при недостатке внешнесекреторной функции поджелудочной железы, заболеваниях печени (гепатит, цирроз, интоксикации), расстройствах питания (токсические диспепсии), сахарном диабете.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ В ТАБЛЕТКАХ «ХОЛЕНЗИМ»

Определение амилалитической активности амилазы необходимо для установления качества соответствующих ферментных препаратов (панкреатин, ораза, панзинорм, панкреурмен, дигестал, трифермент, холензим, фесталидр.), для наблюдения за процедурой получения очистки ферментов. Холензим содержит высушенные порошки поджелудочной железы и слизистых оболочек, а также сухую желчь убойного скота. Препарат содержит ферменты амилазу и трипсин.

Материалы и реактивы: фосфатный буфер с pH 6,8; 1 % раствор хлорида натрия; 1 % раствор крахмала; 0,5 н раствор соляной кислоты; раствор йода в калия иодиде, таблетки препарата «Холензим».

Приборы и посуда: фарфоровая ступка с пестиком, центрифужные пробирки, центрифуга, термостат, колбы, пипетки, спектрофотометр, холодильник.

Ход работы

Навеску массой 0,1 г таблеток препарата тщательно растирают в ступке с 0,5 мл фосфатного буфера pH 6,8, ополаскивая пестик и ступку 9,5 мл фосфатного буфера, содержимое переносят в центрифужную пробирку вместимостью 10 мл, оставляют в холодильнике на 30 мин.

Затем содержимое перемешивают и центрифугируют в течение 5 мин при 6000 об/мин.

Надосадочную жидкость отбирают осторожно пипеткой и хранят в холодильнике. Полученный раствор с концентрацией препарата, равной 10 мг/мл, разводят 1 % раствором хлорида натрия до концентрации 4 мг/мл.

В опытную и контрольную пробирки вносят по 2 мл 1 % раствора растворимого крахмала и по 1 мл фосфатного буфера pH 6,8, и ставят их в термостат на 5 мин при 37 °С. Затем в опытную пробирку приливают 1 мл раствора препарата и инкубируют ещё 10 мин. После чего в опытную пробирку прибавляют ещё 4 мл 0,5 н раствора соляной кислоты. В контрольную пробирку вносят 4 мл 0,5 н раствора соляной кислоты и 1 мл раствора препарата. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и отбирают по 1 мл в мерные колбы вместимостью 100 мл, в которые было предварительно налито по 2 мл 0,5 н раствора соляной кислоты. В колбу приливают 80–90 мл воды и 2 мл рабочего раствора йода. Растворы доводят водой до метки, после чего их перемешивают и колориметрируют на спектрофотометре при длине волны 580 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Активность амилазы в таблетке (X, ед) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D_k - D_0}{D_k} \cdot \frac{20}{C} \cdot \frac{B}{10}$$

где: D_k, D₀ – оптическая плотность растворов в контрольных и опытных пробирках; B – средняя масса таблетки, мг; C – количество препарата в пробе, мг; 10 – время инкубации, мин; 20 – количество крахмала, внесённого в опытную и контрольную пробирки, мг.

За единицу активности принимают количество препарата, которое расщепляет 1 мг крахмала в течение 1 мин.

Активность амилазы в одной таблетке должна быть не менее 50 ЕД.

2. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ГИДРОЛИЗА ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПАНКРЕАТИЧЕСКУЮ ЛИПАЗУ

Гидролиз липидов удобно наблюдать с использованием липазы панкреатического сока.

В качестве субстрата можно использовать молоко, липиды которого, находясь в эмульгированном состоянии, быстро расщепляется на глицерин и жирные кислоты, которые можно оттитровать щелочью.

Определение активности липазы применяется в клинической практике после взятия кишечного сока с помощью зонда для установления причины патологии переваривания липидов.

Метод исследования активности липазы необходим для контроля качества лекарственных препаратов: «Панкреатин», «Фестал», «Панзинорм», «Микразим» и др.

Метод основан на титриметрическом определении с помощью гидроксида натрия с индикатором фенолфталеином жирных кислот, освобождающихся из триацилглицеринов молока в процессе их гидролиза панкреатической липазой в присутствии и в отсутствии желчи.

Материалы и реактивы: молоко; желчь; 0,1 М раствор гидроксида натрия; 0,5 % раствор в 76 % этаноле фенолфталеина, панкреатин, свежеприготовленный 5 % раствор на 1 % растворе гидрокарбоната натрия pH 8,0, желчь.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, фильтр, цилиндр, колбы, термостат, пипетки, пипетатор, капельницы, бюретка.

Ход работы

В три пронумерованные пробирки отбирают по 5 мл молока и добавляют: в №1 – 1 мл воды; в №2 – 1 мл раствора панкреатина; №3 – 1 мл раствора панкреатина + 5 капель желчи.

Помещают пробы с молоком на 15–20 мин в термостат при 37 °С. После инкубации в пронумерованные стаканчики для титрования отбирают по 3 мл инкубационной смеси, добавляют по 10 мл дистиллированной воды из бюретки и по 2 капли спиртового раствора фенолфталеина. Хорошо перемешивают и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления слабо-розовой окраски жидкости. Записывают объемы гидроксида натрия, пошедшие на титрование проб.

Пробы № 1, № 2, № 3 вновь ставят в термостат при 37 °С на 10–15 мин. В процессе гидролитического расщепления жира происходит образование жирных кислот, которые оттитровывают затем 0,1 н раствором NaOH.

Сравнивают объемы 0,1 н щелочи, пошедшие на титрование всех трех пробы откладывая их по времени, вычерчивают кривые титрования.

Изобразить графически динамику расщепления жира липазой для каждой пробы, откладывая на оси абсцисс время в минутах, а на оси ординат количество 0,1 н раствора NaOH (в мл), израсходованного на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данное время.

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.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие препараты на основе ферментов вам известны, примеры и назначение.
2. Какие ферменты содержат препараты Холензим и Вобэнзим? Показания к их применению.
3. Влияние лекарственных средств на активность ферментов.
4. Химическая модификация ферментов. Виды ферментных препаратов.
5. Прикладная энзимология, основные направления развития и области практического использования ферментов.

Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины

Перечень основной литературы:

1. Андрусенко, С.Ф. Общая и медицинская энзимология : учебник / С.Ф. Андрусенко. — Москва : КНОРУС, 2023. — 242 с.
2. Базовый курс биохимии // Под ред. А.И. Глухова, А.Е. Губаревой. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 584 с.
3. Федорин, Д. Н. Ферменты: структура, свойства, классификация / Д. Н. Федорин, Н. В. Селиванова, А. Т. Епринцев. — Воронеж : ВГУ, 2020. — 113 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/433136>

Перечень основной литературы:

1. Рогожин, В. В. Энзимология. Практикум : учебное пособие для вузов / В. В. Рогожин, Т. В. Рогожина. — Санкт-Петербург : Лань, 2026. — 340 с. — ISBN 978-5-507-51488-5. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/450725>
2. Брещенко, Е. Е. Биохимия: биологически активные вещества. Витамины, ферменты, гормоны : учебное пособие для вузов / Е. Е. Брещенко, К. И. Мелконян ; под редакцией И. М. Быков. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 136 с. — ISBN 978-5-507-47791-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/419102>
3. Основы энзимологии : учебное пособие / С. Н. Афонина, И. В. Карнаухова, Е. Н. Лебедева [и др.] ; под редакцией А. В. Сгибнева. — Оренбург : ОрГМУ, 2022. — 97 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/340538>
4. Аветисов, А. К. Прикладной катализ : учебник / А. К. Аветисов, Л. Г. Брук ; под редакцией О. Н. Темкина. — Санкт-Петербург : Лань, 2020. — 200 с. — ISBN 978-5-8114-3854-9. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/126902>
5. 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>
6. 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>
7. 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>
8. 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>
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 И МЕДИЦИНСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ»

для студентов специальности

30.05.01 «Медицинская биохимия»

Введение

Для современного специалиста важно формирование системных фундаментальных знаний, умений и навыков по 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.

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
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

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 процессы 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 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

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 выноситься 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

Перечень основной литературы:

1. Андрусенко, С.Ф. Общая и медицинская энзимология : учебник / С.Ф. Андрусенко. — Москва : КНОРУС, 2023. — 242 с.
2. Базовый курс биохимии // Под ред. А.И. Глухова, А.Е. Губаревой. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 584 с.
3. Федорин, Д. Н. Ферменты: структура, свойства, классификация / Д. Н. Федорин, Н. В. Селиванова, А. Т. Епринцев. — Воронеж : ВГУ, 2020. — 113 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/433136>

Перечень основной литературы:

1. Рогожин, В. В. Энзимология. Практикум : учебное пособие для вузов / В. В. Рогожин, Т. В. Рогожина. — Санкт-Петербург : Лань, 2026. — 340 с. — ISBN 978-5-507-51488-5. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/450725>
2. Брещенко, Е. Е. Биохимия: биологически активные вещества. Витамины, ферменты, гормоны : учебное пособие для вузов / Е. Е. Брещенко, К. И. Мелконян ; под редакцией И. М. Быков. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 136 с. — ISBN 978-5-507-47791-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/419102>
3. Основы энзимологии : учебное пособие / С. Н. Афонина, И. В. Карнаухова, Е. Н. Лебедева [и др.] ; под редакцией А. В. Сгибнева. — Оренбург : ОрГМУ, 2022. — 97 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/340538>
4. Аветисов, А. К. Прикладной катализ : учебник / А. К. Аветисов, Л. Г. Брук ; под редакцией О. Н. Темкина. — Санкт-Петербург : Лань, 2020. — 200 с. — ISBN 978-5-8114-3854-9. —

- Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/126902>
5. Биохимия: учебное пособие / А. В. Стрыгин, Б. Е. Толкачев, А. М. Доценко, Е. И. Морковин. — Волгоград : ВолГМУ, 2022. — 132 с. — ISBN 978-5-9652-0820-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/338252>
6. 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>
7. 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>
8. 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>
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>