

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

Методические указания
для обучающихся по организации и проведению лабораторных работ по
дисциплине «Биохимия»

Специальность 31.05.01 Лечебное дело

Введение

«Биохимия» является одной из основных дисциплин в медицинском образовании и изучает молекулярные основы процессов жизнедеятельности в организм человека в норме, механизмы развития и последствия патологических процессов.

Целью курса «Биохимия» является формирование компетенций, обеспечивающих способность оценивать морфофункциональные состояния организма человека для решения профессиональных задач.

Задачей курса «Биохимия» является изучение основных химических превращений с участием биокатализаторов, лежащих в основе жизнедеятельности, ознакомление с логикой происходящих в живых клетках процессов, их регуляцией.

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

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

СЕМЕСТР 3
ВВЕДЕНИЕ В БИОХИМИЮ. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ
АМИНОКИСЛОТ, ПЕПТИДОВ, ПРОСТЫХ И СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ.
БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ.
ПОРЯДОК РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ. ОБОРУДОВАНИЕ В
БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.

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

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

Правила работы с огнеопасными веществами

1. Опыты с легковоспламеняющимися веществами (эфир, петролейный эфир, ацетон, бензол и т.д.) необходимо проводить дальше от огня и включенных электроплиток. Нагревать легковоспламеняющиеся жидкости можно только на предварительно нагретой водяной бане, в колбе, снабженной водяным холодильником, вдали от нагревательных приборов.
2. Легковоспламеняющиеся вещества можно отгонять в приборе с водяным холодильником на водяной бане или роторных испарителях. Нельзя упаривать горючие жидкости в открытых сосудах.
3. Приборы, в которых содержатся легковоспламеняющиеся вещества, следует разбирать после того, как будут выключены газовые горелки, находящиеся поблизости.
4. Не выливать воспламеняющиеся вещества в канализацию, ведра и ящики для мусора во избежание пожара от случайно брошенной спички.
5. Нельзя проводить перегонку досуха, так как многие вещества образуют взрывоопасные перекиси при соприкосновении с воздухом.

Первая помощь при ожогах и отравлениях

1. При термических ожогах немедленно делают обильные примочки спиртовым раствором танина, этиловым спиртом или раствором перманганата калия.
2. При ожогах кислотами необходимо сразу же промыть пораженное место большим количеством воды, а затем 3%-ным раствором гидрокарбоната натрия и опять водой.
3. При ожогах едкими щелочами следует хорошо и обильно промыть пораженное место проточной водой, затем разбавленным раствором уксусной кислоты, а после этого опять большим количеством воды.
4. При попадании кислоты или щелочи в глаза следует сразу же их промыть. Для этого направляют небольшую струю воды то в один, то в другой глаз в течение 3-5 мин. Затем глаза необходимо промыть или раствором гидрокарбоната натрия (в случае кислоты), или раствором борной кислоты (в случае щелочи). После этого нужно немедленно обратиться к врачу.

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

Тушение местного пожара и горящей одежды

1. При возникновении пожара немедленно отключить газ и электроприборы по всей лаборатории. Быстро убрать все горючие вещества подальше от огня, а пламя быстро гасить огнетушителем, песком или при помощи противопожарного одеяла.
2. Если на ком-либо загорелась одежда, нужно пострадавшего повалить на пол и быстро покрыть войлочным одеялом.

ПОРЯДОК РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

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

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

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

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

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

6. Если в руководстве нет специального указания, какое количество вещества необходимо взять для проведения в пробирке того или иного опыта, предлагается брать сухое вещество в количестве, закрывающем дно пробирки, а раствор - не более $1/6$ объема пробирки. Следует иметь в виду, что при работе с малыми количествами вещества большинство операций (нагревание, охлаждение, фильтрование, высушивание и др.) требует значительно меньше труда и времени. Неизрасходованные реактивы нельзя

высыпать (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 использовании реактивами в химической лаборатории. Работать в лаборатории можно только в халате.

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

ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ

В практикуме по биохимии применяют следующую лабораторную посуду:

1. Колбы – круглодонные, плоскодонные, мерные (от 25 мл до 5,0 л),
2. Химические стаканы – различных объемов (чаще от 50 мл до 2,0 л),
3. Пробирки – цилиндрические и конические, 4. Цилиндры – от 10 мл до 2,0 л,
5. Мензурки – от 50 мл до 1,0 л.
6. Пипетки – емкостью от 0,1 мл до 100 мл – градуированные и пипетки Мора, автоматические, дозаторы.
7. Бюретки и микробюретки.
8. Промывалки.
9. Фарфоровые тигли.
10. Фарфоровые чашки.
11. Фарфоровые ступки.
12. Эксикаторы.
13. Воронки.
14. Посуда для взвешивания – часовые стекла, бюксы, тигли.
15. Стеклянные палочки, лопаточки, наконечники.

Зарисовать лабораторную посуду и записать ее назначение.

Мытье лабораторной посуды

1. Посуду после выполнения лабораторного анализа необходимо промыть в проточной водопроводной воде.

2. Затем тщательно промыть с помощью ершей.

3. Замочить на 1–2 часа в хромовой смеси («хромпик»). Можно использовать синтетические моющие средства, не содержащие биодобавок.

4. Ополоскать от моющего средства с помощью проточной водопроводной воды: 10 раз при использовании хромовой смеси и 15 раз – при использовании синтетических моющих средств.

5. Прополоскать в проточной дистиллированной воде 3 раза,

6. Чистую посуду высушить в сушильном шкафу при температуре 150–180°C.

Сухую посуду (колбы, стаканы) закрыть фильтровальной бумагой либо поставить в шкаф или на стол вверх дном. Пробирки сложить в чистые коробки или ящики столов,

выложенные чистой фильтровальной бумагой. Сверху их также следует прикрыть фильтровальной бумагой от пыли и грязи.

Лабораторное оборудование

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

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

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

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

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

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

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

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

Бюкс, в который перенесли воду, закрыть крышкой и снова взвесить. Вес воды в объеме пипетки находят по разности двух взвешиваний. Процедуру определения емкости

пипетки проводят трижды, используя для этого три отдельные сухие емкости, и берут среднее арифметическое из 3-х взвешиваний.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

исследований пользуются единицами моль в секунду на литр – моль/(с·л) или чаще миллимоль в час на литр – ммоль/(ч·л).

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1. АМИНОКИСЛОТЫ, СВОЙСТВА, КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ. БЕЛКИ, СВОЙСТВА БЕЛКОВ

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

Ознакомиться с реакциями осаждения белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

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

1) практически необратимые реакции осаждения, при которых белки претерпевают глубокие изменения и не могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе: в этом случае имеет место денатурация белка; к необратимым реакциям относятся осаждение белка солями тяжелых металлов, алкалоидными реактивами, минеральными, органическими кислотами и осаждение при нагревании;

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

БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ (РЕАКЦИЯ ПИОТРОВСКОГО)

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

Белки дают сине-фиолетовое окрашивание; продукты их гидролиза – красную или розовую окраску. Биуретовая реакция обусловлена присутствием в молекуле или двух — $\text{CO}-\text{NH}$ -групп или одной — $\text{CO}-\text{NH}$ -группы или — CH_2-NH - групп, связанных непосредственно между собой или посредством атома углерода или азота. Биуретовую реакцию дают пептиды, содержащие минимум три остатка аминокислот.

ОБНАРУЖЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ *Ход работы*

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

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

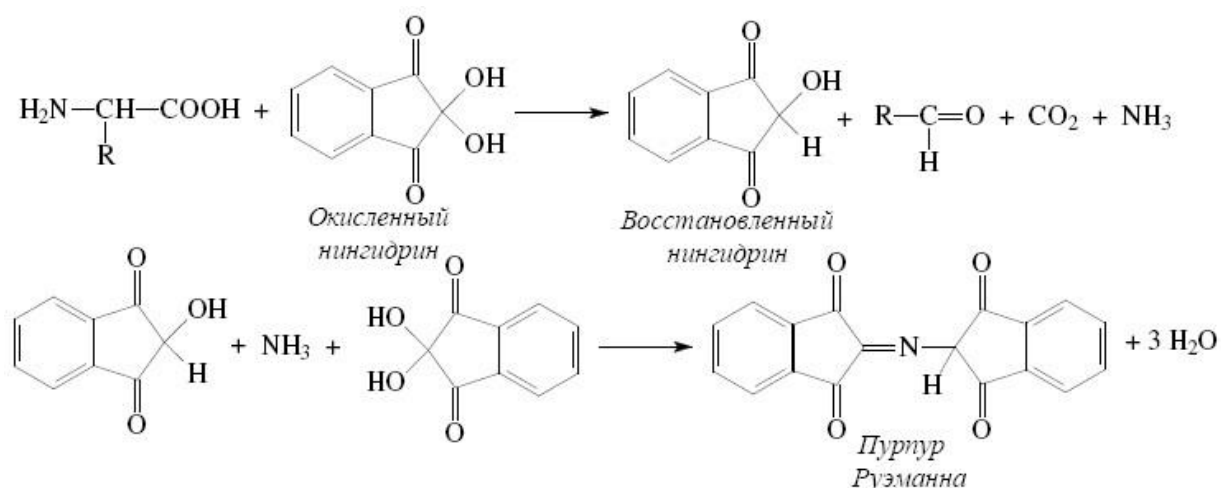
Результаты всех реакций вносят в табл.

Таблица Биуретовая реакция на белки и аминокислоты

Исследуемый материал	Окраска продукта	Реагирующая группа
Вода		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		
Аминокислота		

НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (РЕАКЦИЯ РУЭМАННА)

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



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

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

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

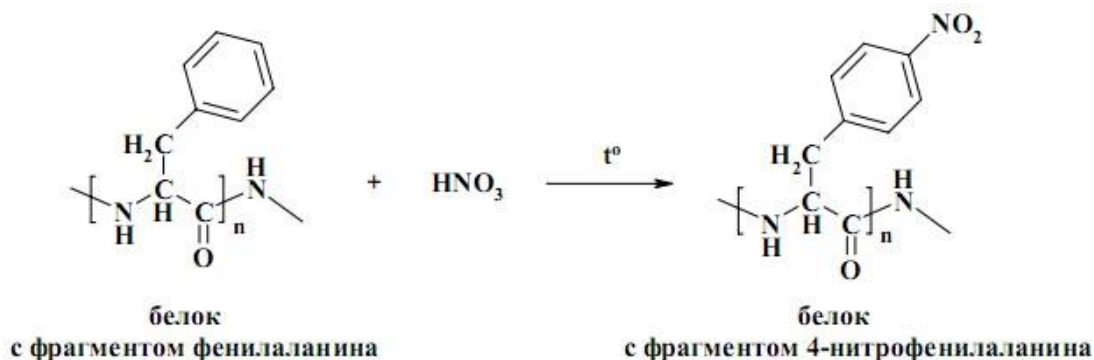
КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (МУЛЬДЕРА) (на тирозин, триптофан, фенилаланин)

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



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

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

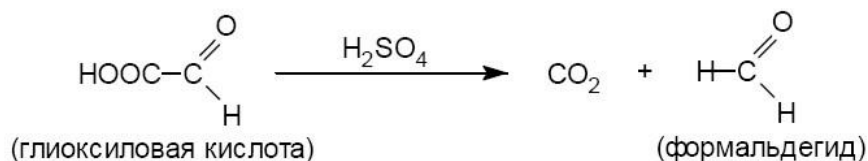


Ход работы

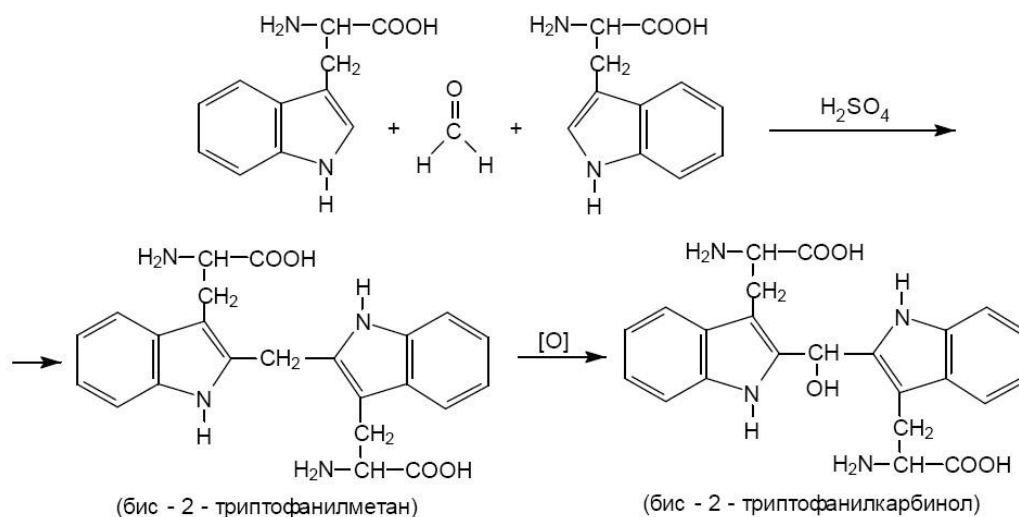
К 1 мл раствора белка добавляют 0,2-0,3 мл концентрированной азотной кислоты, появляется белый осадок или раствор мутнеет. Затем нагревают смесь на горелке до кипения и поддерживают его в течение 1-2 мин. При этом раствор и осадок окрашиваются в ярко-желтый цвет. При кипячении выделившийся осадок может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

РЕАКЦИЯ АДАМКЕВИЧА

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



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



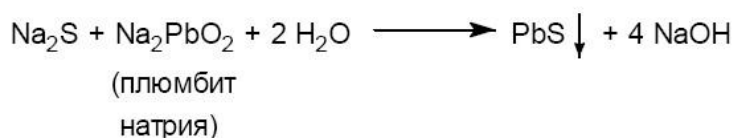
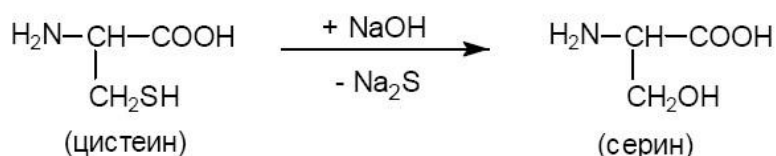
Ход работы

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

РЕАКЦИЯ НА ЦИСТЕИН (РЕАКЦИЯ ФОЛЯ)

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

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



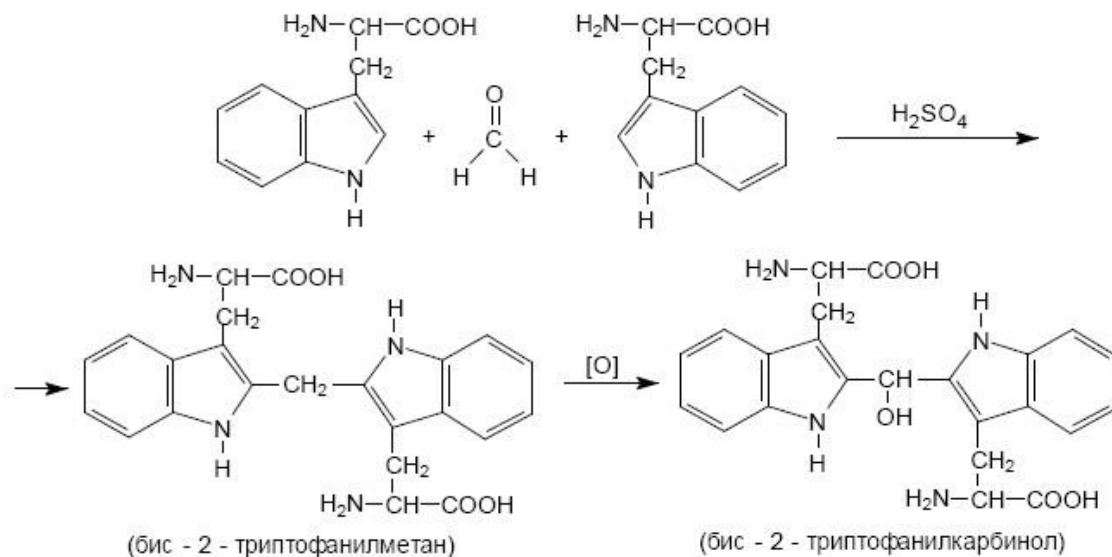
Ход работы

В одну пробирку наливают 5 капель раствора яичного белка, в другую - 5 капель 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 30 % раствора гидроксида натрия и по 1 капле 5% раствора ацетата свинца. При интенсивном кипячении жидкость в

пробирках с яичным белком темнеет, образуется черный осадок сульфида свинца. В пробирки с желатином черного осадка не образуется, объясните почему?

РЕАКЦИЯ ВАУЗЕНЕ (НА ТРИПТОФАН)

Белки, содержащие триптофан, дают в кислой среде в присутствии нитрита натрия и формальдегида сине-фиолетовое окрашивание. В этой реакции триптофан взаимодействует с формальдегидом с образованием продукта конденсации (бис-2-триптофанилметана), который окисляется нитритом натрия до бис-2-триптофанилкарбинола. Последний в присутствии минеральных кислот образует соли сине-фиолетового цвета.



Ход работы

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

РЕАКЦИЯ С ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

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

Ход работы

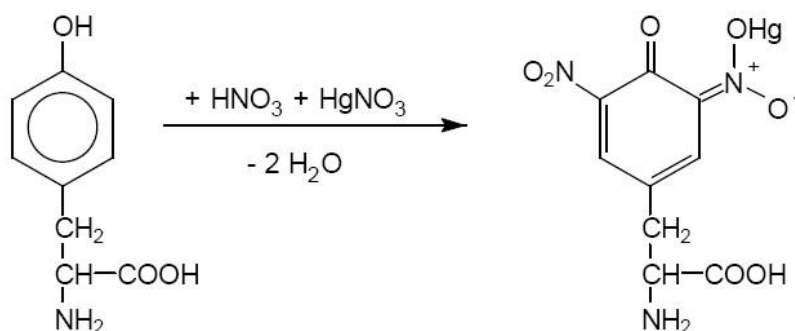
В пробирку наливают 5 капель 1%-го раствора глицина и прибавляют 1 каплю индикатора метилового красного. Раствор окрашивается в желтый цвет (нейтральная среда). К полученной смеси добавляют равный объем 40%-го раствора формальдегида (формалин). Появляется красное окрашивание.

РЕАКЦИЯ МИЛЛОНА

Реактив Миллона состоит из азотнокислых солей окиси и закиси ртути в HNO_3 с примесью HNO_2 . Он дает окрашивание с фенолами, полифенолами.

В случае белков реакция обусловлена присутствием в них тирозинового остатка со свободной фенольной группой. При нагревании раствора белка с реактивом Миллона образуется нитросоединение тирозина, которое, присоединяя ртуть, превращается в

ртутную соль нитротирозина, имеющую пурпурно-красный цвет. Белки, не содержащие тирозин (желатина, клупеин, сальмин и др.), не дают реакции Миллона.



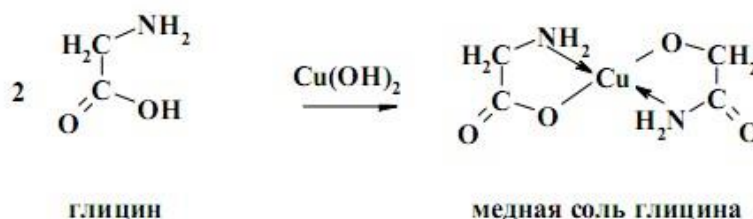
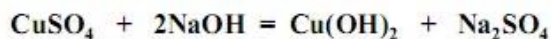
Ход работы

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

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

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

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМИНОКИСЛОТ С СОЛЯМИ МЕДИ (II)



Ход работы

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

ДИАЗОРЕКЦИЯ

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

Ход работы

В пробирку наливают 0,5 мл 1% раствора белка, 8 капель 10% раствора натрия карбоната и 16 капель диазосмеси (сульфаниловая кислота, растворенная в

концентрированной хлоридной кислоты). Через 10 минут образуется оранжево-красное окрашивание.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

	Название	Реактивы и условия	Окраска	Аминокислоты

ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА ПРИ НАГРЕВАНИИ

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

Ход работы

В пять пронумерованных пробирок наливают по 10 капель 1% раствора яичного белка.

Содержимое первой пробирки нагревают на газовой горелке. Жидкость мутнеет, и, так как частицы денатурированного белка несут заряд, они удерживаются во взвешенном состоянии (яичный альбумин является кислым белком и в нейтральной среде заряжается отрицательно).

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

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

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

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

	Среда	Реактивы	Наблюдаемые изменения	Выводы
1	Нейтральная			
2	Слабокислая			
3	Кислая			
4	Кислая и электролит			
5	Щелочная			

ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА КОНЦЕНТРИРОВАННЫМИ МИНЕРАЛЬНЫМИ КИСЛОТАМИ

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

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

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

ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА ОРГАНИЧЕСКИМИ КИСЛОТАМИ

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

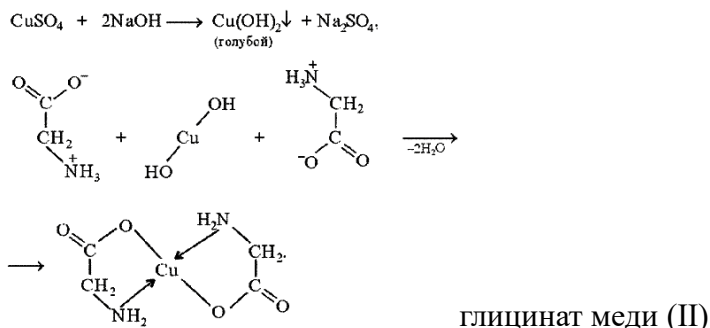
Реакции с трихлоруксусной (CCl_3COOH) и сульфосалициловой кислотами являются весьма специфическими и чувствительными (сульфосалициловая кислота открывает белок в разведении 1: 50000). Они получили широкое практическое применение в клинических лабораториях при обнаружении белка в моче и других биологических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

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

ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

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

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



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

Ход работы

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

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

ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

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

Однако некоторые белки, например проламины растений, растворимы в горячем 70—80% спирте, гормон поджелудочной железы — инсулин растворяется в подкисленном 60% спирте. Это зависит от особенностей их первичной структуры.

Ход работы

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

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

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

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

ГОРЕНИЕ КАК СПОСОБ РАСПОЗНАВАНИЯ БЕЛКОВЫХ МАТЕРИАЛОВ

Вносят в пламя пучок шерсти, волос, перья птицы и другие белковые тела. Ощущается характерный запах жженных перьев или паленого.

Этот способ может быть использован как наиболее простой для распознавания белков. Например, чтобы отличить шерстяную пряжу от хлопчатобумажной или натуральный шелк от искусственного, можно поджечь очень небольшие пучки нитей исследуемых образцов.

Шерсть и натуральный шелк горят медленно и, как белковые тела, дают при этом характерный запах. Хлопковое волокно и искусственный шелк, представляющие собой в основном клетчатку, горят быстро, выделяя запах жженой бумаги.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

Название осадителя	Употребляемые реактивы	Характер и цвет осадка	Чем обусловлена реакция
Минеральные кислоты			
Органические кислоты			
Тяжелые металлы			
Спирты			
Алкалоиды			

Практическая значимость

На явлениях денатурации белков основаны приемы и методы асептики и антисептики, дезинфекции в лечебной и практической медицине; пастеризация и консервирование продуктов в пищевой промышленности.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Общая характеристика пептидов, полипептидов, белков и их строения.
2. Классификация аминокислот (примеры). Как соединяются аминокислоты в молекуле белка и за счет каких групп? Соедините Ала, Цис, Сер.
3. Перечислите цветные реакции на белки и аминокислоты. Какую цветную реакцию используют для количественного определения α -аминокислот и почему?
4. Какая реакция открывает пептидные связи? Её химизм.
5. Что характеризуют цвет и интенсивность окраски при положительной биуретовой реакции?
6. Что открывает нингидриновая реакция? Её химизм.
7. Назовите аминокислоты имеющие в радикале бензольное кольцо. Какой реакцией можно обнаружить ароматические аминокислоты? Её химизм.
8. Назовите аминокислоты содержащие серу. Какую из них обнаруживает реакция Фоля? Химизм реакции.
9. Какую цветную реакцию используют для количественного определения белков в растворе и почему?
10. Назовите основные факторы, обуславливающие стабильность молекул белка в растворе.
11. Характеристика обратимых и необратимых реакций осаждения белков.
12. Причины осаждения белков нагреванием при рН около 7,0?
13. Почему в растворе при рН<7,0 белки при нагревании не выпадают в осадок?
14. Почему в растворе при рН>7,0 белки при нагревании не выпадают в осадок?
15. Почему в растворе при рН<7,0 с добавлением хлорида натрия белки при нагревании выпадают в осадок?
16. Механизм действия минеральных кислот на белки в растворе.
17. Механизм осаждения белков органическими кислотами и органическими растворителями.
18. Механизм осаждения белков солями тяжелых металлов.
19. Ренатурация белков, всегда ли она возможна?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2. ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить свойства простых и сложных белков на примере нуклеопротеидов, гликопротеидов, фосфопротеидов и хромопротеинов. Освоить методы выделения и исследования химического состава сложных белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Высаливанием белков называется выделение белков из водных растворов нейтральными растворами концентрированных солей щелочных и щелочноземельных металлов. При добавлении достаточно больших концентраций этих солей к раствору белка происходит дегидратация белковых частиц и снятие заряда, при этом белок выпадает в осадок. Разные белки осаждаются при различных концентрациях солей, что зависит от ионной силы осадителя и размера частиц белковой молекулы. Например, глобулин, имеющий большой молекулярный вес, по сравнению с альбумином, легче выпадает в осадок, чем альбумин.

Сложные белки при гидролизе распадаются на простые белки и небелковую часть, называемую простетической группой. Сложные белки подразделяются на подгруппы в зависимости от характера простетических групп. К важнейшим сложным белкам относятся: нуклеопротеиды, гликопротеиды, фосфопротеиды, хромопротеиды, липопротеиды. Они выполняют в организме различные функции. К сложным белкам относятся и многие ферменты.

ВЫСАЛИВАНИЕ БЕЛКОВ СЕРНОКИСЛЫМ АММОНИЕМ

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

ВЫСАЛИВАНИЕ БЕЛКОВ ХЛОРИСТЫМ НАТРИЕМ И СЕРНОКИСЛЫМ МАГНИЕМ

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

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

Таблица 1

Высаливание белков

Белок	Используемая соль	Степень насыщения	Образование осадка
Глобулин			
Альбумин			

ДИАЛИЗ БЕЛКОВ

Метод диализа основан на неспособности коллоидных частиц проникать через полупроницаемые мембраны, в то время как частицы кристаллоидов легко проходят через них. Обладая большим диаметром, частицы белка не способны к проникновению через

мембраны. Диализ широко используется для очистки белков от низкомолекулярных примесей.

Ход работы

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

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

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

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

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

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ ПРИРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ ВЫДЕЛЕНИЕ ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА

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

Ход работы

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

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

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

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

ЭКСТРАКЦИЯ АЛЬБУМИНОВ *Ход работы*

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

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

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

ЭКСТРАКЦИЯ ГЛОБУЛИНОВ

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

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

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

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

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

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

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

ОСАЖДЕНИЕ МИОЗИНА ИЗ ГЛОБУЛИНОВОЙ ФРАКЦИИ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ

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

ВЫДЕЛЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА ИЗ ПЛАЗМЫ

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

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

Ход работы

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

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ КЕРАТИНОВ

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

ДЕЙСТВИЕ ВОДЫ И РАЗБАВЛЕННЫХ КИСЛОТ

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

ДЕЙСТВИЕ ЩЕЛОЧИ

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

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА АМИНОКИСЛОТЫ В СОСТАВЕ КЕРАТИНА

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

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

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

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ГЛИКОПРОТЕИДОВ

Гликопротеиды - сложные белки, содержащие в качестве простетической группы углеводы и их производные. Из гликопротеидов наиболее распространены муцин и мукоиды, входящие в состав всех тканей и жидкостей. Муцин содержится в слюне и других слизистых выделениях желез, мукоиды - в хрящах, связках и др. Гликопротеиды не растворимы в воде, хорошо растворяются в щелочах, в кислой среде выпадают в осадок.

Ход работы **ВЫДЕЛЕНИЕ МУЦИНА ИЗ СЛЮНЫ**

В пробирку берут около 2 мл слюны и по каплям прибавляют концентрированную уксусную кислоту (4-5 капель). Образуется сгусток муцина.

НАФТОЛОВАЯ ПРОБА НА УГЛЕВОДНЫЙ КОМПОНЕНТ (реакция Подобедова)

Углеводы муцина обнаруживают нафтоловой пробой (реакция Подобедова-Молиша).

Реакция обусловлена взаимодействием оксиметилфурфурола, образующегося из гексоз под влиянием серной кислоты с β -нафтолом. При этом образуется окрашенный продукт конденсации.

Эта реакция дает положительный результат со всеми веществами, в состав которых входят углеводы.

К сгустку муцина добавляют 1-2 капли 1% раствора (спиртового) β -нафтола или тимола, перемешивают, а затем по стенке осторожно приливают 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе раздела двух слоев жидкостей появляется фиолетово-красное кольцо (хорошо заметно на белом фоне).

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

Наименование сложного белка	Простетическая группа	Химическая структура простетической группы	Реакции, характерные для простетической группы	Что наблюдается ?	Чем обусловлена реакция ?

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Общая характеристика метода хроматографии, и ее роль в биохимии.
2. Назовите основные виды хроматографии.
3. Общая характеристика принципа хроматографии.
4. Назовите разновидности метода хроматографии на бумаге, и чем они отличаются.
5. Как рассчитывается коэффициент подвижности (R_f) и что он характеризует?
6. Что такое «идентификация аминокислот» и как её проводят.
7. Способы гомогенизации биологического материала.
8. Методы определения гомогенности белковых препаратов.
9. Методы гидролиза белков.
10. Как осуществляется экстракция белков?
11. Методы фракционирования белков.
12. Методы очистки белков.
13. Понятие о сложных белках, их роль. Классификация протеидов.
14. Какие белки относятся к липопротеидам, где встречаются, их функции?
15. Какие белки относятся к фосфопротеидам и какова их роль в организме?
16. Какое строение имеет гем в гемоглобине и миоглобине. Функции гемоглобина и миоглобина.
17. Что представляют собой гликопротеиды и какова их роль в организме?
18. Металлопротеиды, их роль в организме.
19. Хромопротеиды и их роль в организме.
20. Какие биологические пигменты находятся в крови человека и животных?

21. Белки плазмы крови. Основные группы, содержание. Характеристика некоторых белков плазмы крови
22. электрофорез белков сыворотки крови
- 23.

ВИТАМИНЫ. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА. МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ВОДО- И ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ. ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

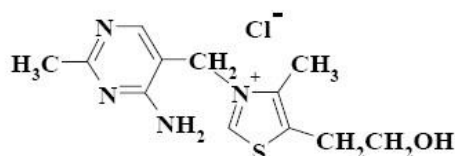
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить знания о строении и биологической роли водорастворимых витаминов. Научиться определять присутствие витаминов в биологических материалах при помощи качественных цветных реакций.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИАМИНА (ВИТАМИН В₁)

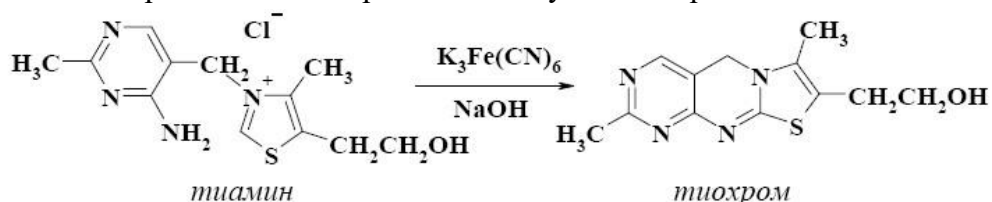
Тиамин (витамин В₁) - водорастворимый витамин. Наряду с аминогруппой витамин В₁ содержит атом серы, и поэтому он получил название тиамин. В химической структуре его содержится два кольца: пиримидиновое и тиазоловое, соединенные метиленовой (-CH₂) группой.



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

РЕАКЦИЯ ОКИСЛЕНИЯ

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



Ход работы

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

ДИАЗОРЕАКЦИЯ

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

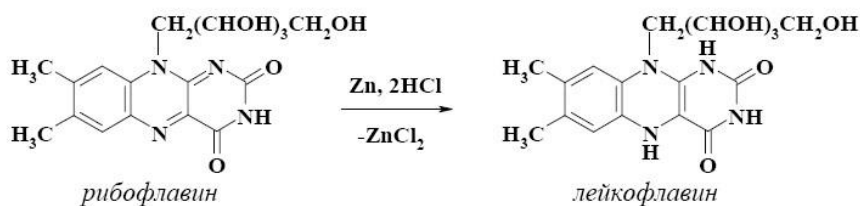
Ход работы

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОФЛАВИНА (ВИТАМИН В₂)

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

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



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

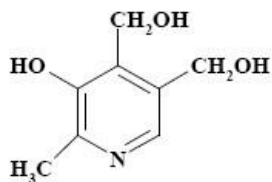


Розовую жидкость сливают в другую пробирку и наблюдают за изменением окраски. Водород в жидкость больше не поступает, а уже растворенный в ней уходит в воздух и переносится через рибофлавин и метиленовый синий на кислород воздуха. **Ход работы**

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРИДОКСИНА (ВИТАМИН В₆)

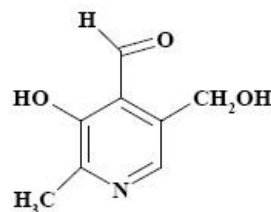
Пиридоксин - витамин В₆. Пиридоксаль (витамин В₆) - альдегидное производное пиридоксина. В виде фосфорного эфира - пиридоксальфосфата - входит в состав ряда ферментов, катализирующих реакции переаминирования и декарбоксилирования Аминокислот. Термин "витамин В₆" применяется ко всем трем производным 3-оксипиридоксина,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



(пиридоксин)



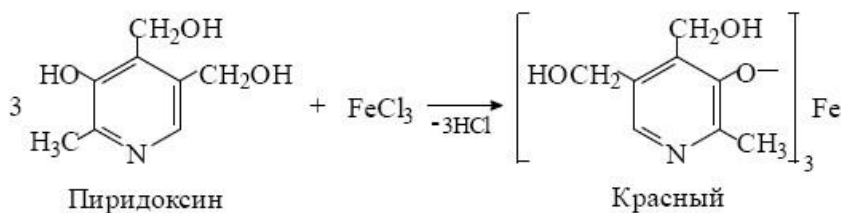
(пиридоксамин)



(пиридоксаль)

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

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



Ход работы

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

РЕАКЦИЯ НА ЦИАНОКОБАЛАМИН (ВИТАМИН В₁₂)

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

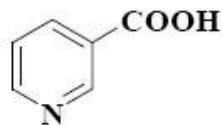
Витамин В₁₂ находится главным образом в продуктах животного происхождения. Наиболее богата им печень рогатого скота и цыплят.

Ход работы

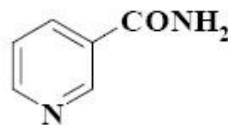
Половину содержимого витамина В₁₂ из ампулы переносят в фарфоровый тигель, выпаривают досуха и прокаливают на небольшом огне. После охлаждения доливают 1 мл концентрированной азотной кислоты и 3 мл концентрированной соляной кислоты и кипятят в вытяжном шкафу до полного испарения жидкости и охлаждают.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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИН РР)

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



никотиновая кислота



никотинамид

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

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ С УКСУСНОКИСЛОЙ МЕДЬЮ

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

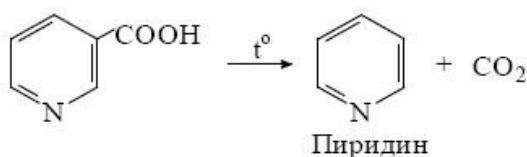
Ход работы

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

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

ОБНАРУЖЕНИЕ ПИРИДИНОВОГО КОЛЬЦА В МОЛЕКУЛЕ ВИТАМИНА РР

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



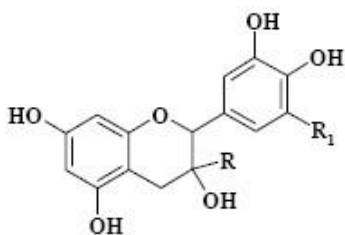
Ход работы

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

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА (ВИТАМИН Р)

Известно несколько соединений, обладающих Р-витаминной активностью.



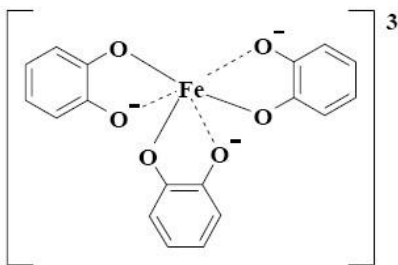
R и R₁ – H или OH

Витамин Р (цитрин)

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

РЕАКЦИЯ С ХЛОРИДОМ ЖЕЛЕЗА

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



Ход работы

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

2) Налейте в пробирку 1 мл чайной заварки (в ней содержится витамин Р) и добавьте к ней 5 капель водного раствора хлорного железа FeCl₃. Осторожно встряхните пробирку и разбавьте полученный раствор, добавив 2мл дистиллированной воды. Как изменяется окраска раствора?

РЕАКЦИЯ С СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

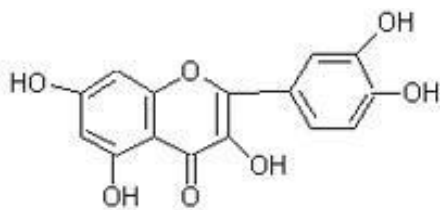
Концентрированная серная кислота образует с флавонами и флавоноидами оксониевые соли, растворы которых имеют ярко-желтую окраску. **Ход работы**

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

РЕАКЦИЯ С РЕАКТИВОМ ФЕЛИНГА

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

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



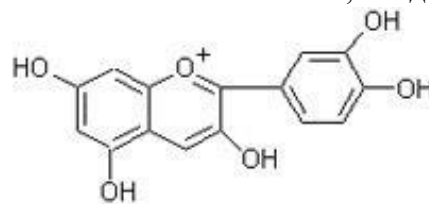
При восстановлении кверцетина образуется цианидин.

□

кверцетин

РЕАКЦИЯ С МАГНИЕМ И СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

Флавоноиды реагируют с магнием и соляной кислотой, легко восстанавливаются, давая окрашенные соединения.



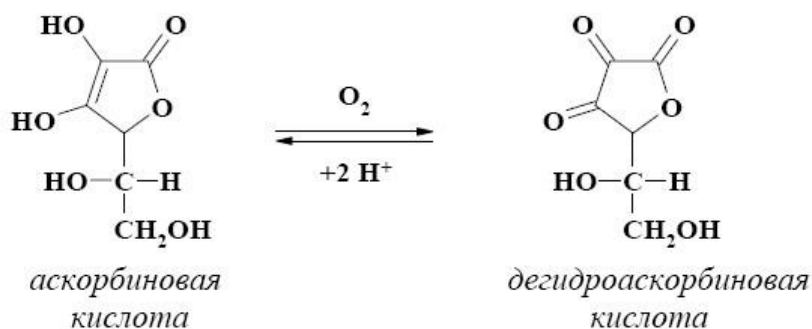
цианидин

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

КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

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

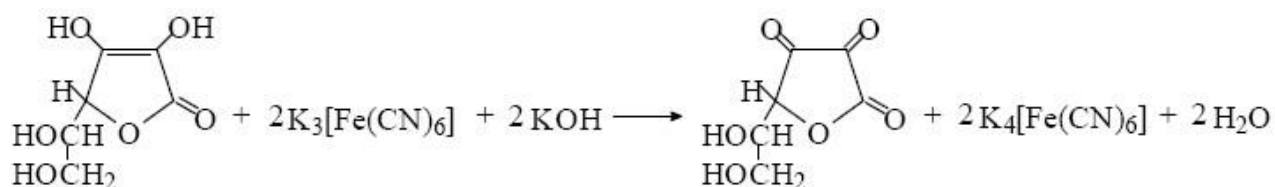
При недостатке витамина С в пище у человека развивается цинга. При цинге повышается хрупкость сосудов, возникают кровоизлияния, повреждаются кости особенно зубы. Суточная потребность в аскорбиновой кислоте взрослого человека при средних затратах физического труда — 50 мг. Богаты витамином С лимоны, черная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



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

РЕАКЦИЯ С ЖЕЛЕЗОСИНЕРОДИСТЫМ КАЛИЕМ

Реакция основана на том, что аскорбиновая кислота, окисляясь в дегидроаскорбиновую в щелочной среде, может восстанавливать железосинеродистый калий до железистосинеродистого, последний в взаимодействии с хлорным железом в кислой среде образует берлинскую лазурь.



Синий

Ход работы

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

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

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

РЕАКЦИЯ С МЕТИЛЕНОВОЙ СИНЬЮ

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

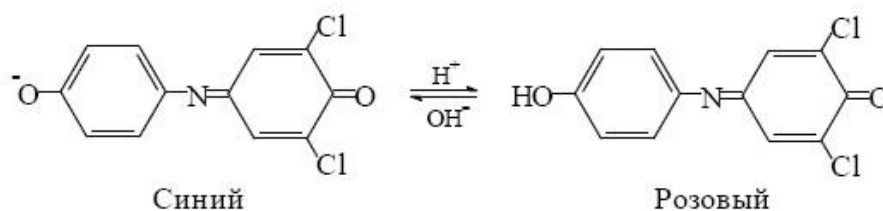
Ход работы

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

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

РЕАКЦИЯ С 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛОМ

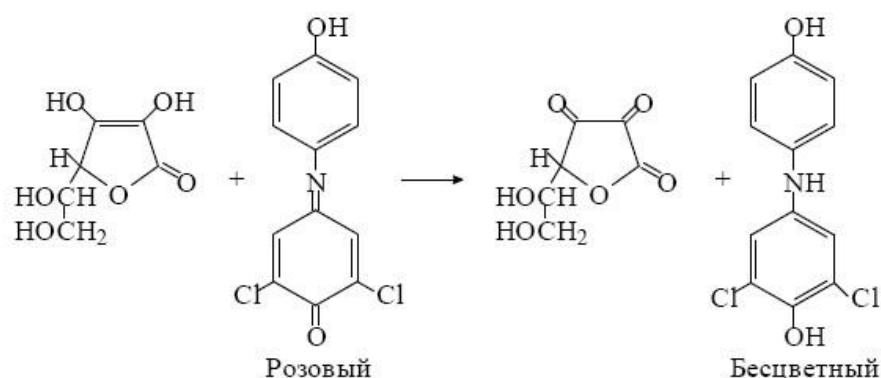
Титрование аскорбиновой кислоты 6-дихлорфенолиндофенолом (метод Тильманса) осуществляют в кислой среде, в которой 2,6-дихлорфенолиндофенол имеет розовую окраску, а в щелочной среде – синюю:



Синий

Розовый

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

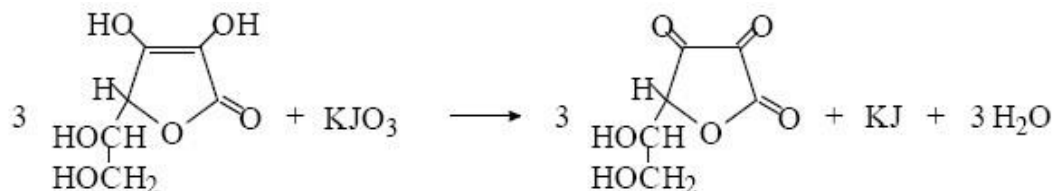


Ход работы

В две пробирки наливают по 10 капель 0,02% раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. В одну из пробирок добавляют 10 капель вытяжки из шиповника, в другую 10 капель воды. Жидкость в пробирке с вытяжкой шиповника, обесцвечивается.

РЕАКЦИЯ С РАСТВОРОМ ЛЮГОЛЯ

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

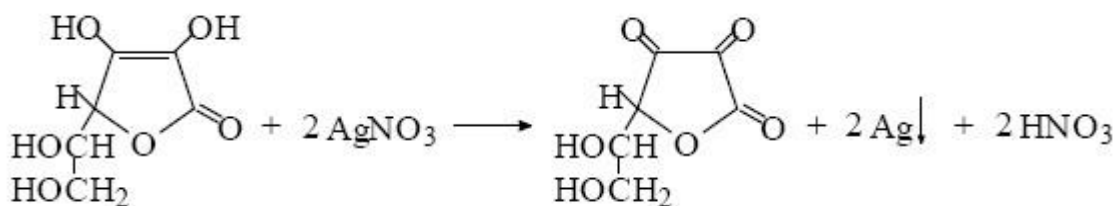


Ход работы

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

СЕРЕБРЯНАЯ ПРОБА НА ВИТАМИН С

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



Ход работы

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

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

п/п	Материал, содержащий витамин	Название витамина	Употребляемые реактивы и материалы	Наблюдаемые окраски жидкости, осадка, появление запаха, обесцвечивание жидкости	На чём основана реакция

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4. ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

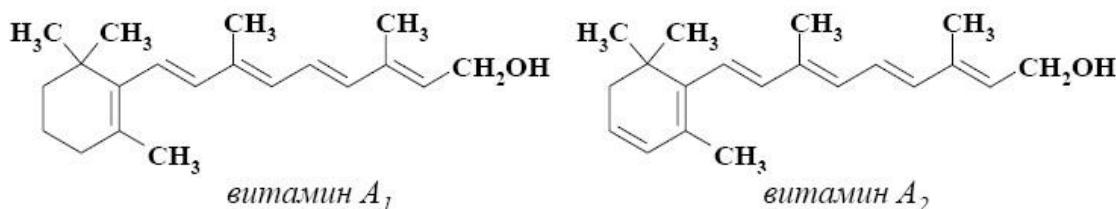
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить знания о строении и биологической роли жирорастворимых витаминов. Научиться определять присутствие витаминов в биологических материалах при помощи качественных реакций.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Жирорастворимые витамины участвуют в ряде окислительно-восстановительных реакций, регуляции проницаемости мембран и многих биохимических процессов. Отсутствие или недостаток в пище витаминов приводят к нарушениям обмена веществ и, в конечном счете, заболеваниям, получившим название гиповитаминозов и авитаминозов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕТИНОЛА (ВИТАМИН А)

Ретинол (витамин А) - жирорастворимый витамин, молекула которого состоит из бионового ядра и боковой изопреноидной цепи:



Ретинол обладает высокой специфичностью строения. Изменения в боковой цепи приводят к снижению или полной потере витаминной активности у полученных производных. Действие света, нагревание раствора, плавление кристаллов ретинола, контакт с поверхностно-активными веществами приводит к цис-транс-изомерным переходам. Витамин обладает противомикробным действием, участвует в процессе восприятия света. Наибольшее содержание каротиноидов в моркови, перце, томате.

Суточная потребность в витамине А для взрослого человека составляет 1—2,5 мг витамина А.

Ход работы РЕАКЦИЯ С ТРЕХХЛОРИСТОЙ СУРЬМОЙ

В сухую пробирку вносят две капли масляного раствора витамина А (свежего рыбьего жира) и добавляют 2-3 капли 33% хлороформного раствора треххлористой сурьмы; при смешивании содержимое пробирки окрашивается в синий цвет.

РЕАКЦИЯ ДРУММОНДА С КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

В сухую пробирку по стенке опускают 3 капли масляного раствора витамина А или рыбьего жира. Вслед за этим сюда же осторожно опускают каплю серной кислоты. В месте соприкосновения витамина А с серной кислотой появляется фиолетовое окрашивание, переходящее в вишнево-красное.

РЕАКЦИЯ С СУЛЬФАТОМ ЖЕЛЕЗА (II)

В пробирку к 2-3 каплям масляного раствора витамина А или рыбьего жира приливают 5-10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II), 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в красно-розовое. Каротины дают при этой реакции зеленое окрашивание.

ОБНАРУЖЕНИЕ КАРОТИНА В ШИПОВНИКЕ

Каротин открывается по появлению окраски при взаимодействии с треххлористой сурьмой или концентрированной серной кислотой.

Наличие в его молекуле ненасыщенных связей можно обнаружить по обесцвечиванию бромной воды, т. е. по способности каротина как соединения, имеющего двойные связи, присоединять бром по месту их разрыва:

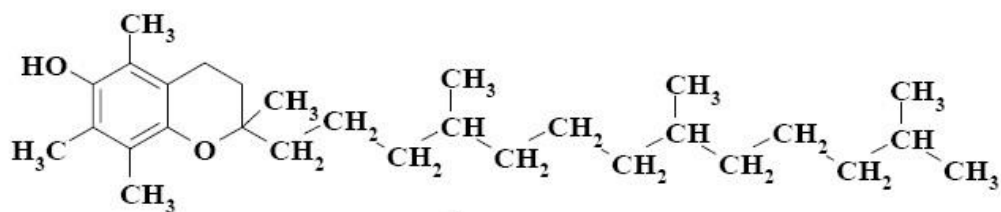


Ход работы

1. Одну-две сухие ягоды шиповника растирают в ступке, затем добавляют 2—3 мл хлороформа и растирание продолжают еще 1 минуту.
2. Содержимое ступки фильтруют через заранее приготовленный фильтр в сухую пробирку. Фильтрат окрашен каротинами в оранжевый цвет.
3. В сухой пробирке к нескольким каплям хлороформной вытяжки, содержащей каротин, добавляют около 20 капель раствора хлористой сурьмы в хлороформе. Появляется голубая окраска, которая даже при длительном стоянии не переходит в розово-фиолетовую.
4. В сухую пробирку вносят несколько капель хлороформной вытяжки и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется синяя окраска, переходящая в зеленую.
5. К нескольким каплям хлороформной вытяжки добавляют 1—2 капли бромной воды и встряхивают. Бромная вода обесцвечивается. В ходе реакции происходит не только обесцвечивание брома, но и обесцвечивание самого каротина. Избыток бромной воды добавлять не следует, так как он вызывает окрашивание хлороформного слоя.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА α-ТОКОФЕРОЛ

Под общим названием витамина Е известен ряд веществ, дающих витаминными свойствами и являющихся производными хромана. Самым активным из них является α-токоферол.



α-токоферол

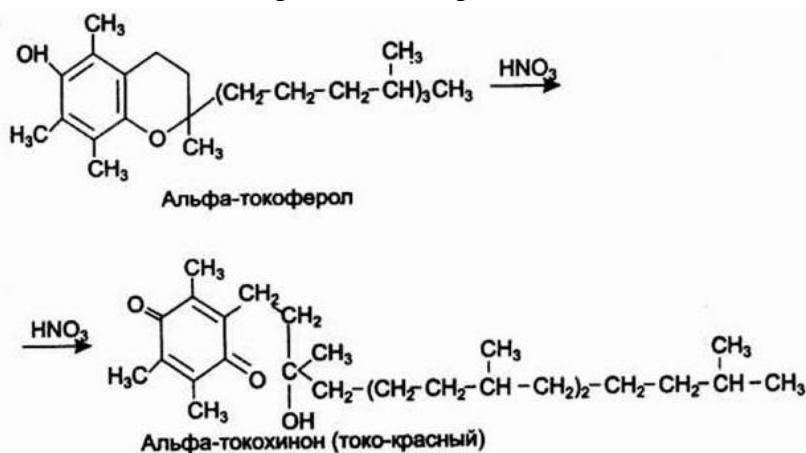
Наиболее богаты витамином Е масла из зародышей пшеницы, семян яблок, шиповника, из облепихи, кукурузы, сои. Он содержится в семенах злаков, в мясе, жире, печени, в яичном желтке, масле, молоке. Для усвоения организмом витамина Е необходимо наличие желчи в кишечном содержимом.

Витамин Е обладает противоокислительным действием: он тормозит окисление ненасыщенных жирных кислот и тем самым предохраняет от разрушения ненасыщенные липиды, входящие в состав таких важных клеточных структур, как митохондрии.

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

РЕАКЦИЯ С АЗОТНОЙ КИСЛОТОЙ

Спиртовой раствор витамина Е в присутствии концентрированной азотной кислоты окисляется в хиноидное соединение, окрашенное в красный цвет.



Ход работы

В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора витамина Е и добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты. Пробирку интенсивно встряхивают и наблюдают постепенное появление красного окрашивания. Эмульсию оставляют стоять до расслоения. Окраска остается в верхнем масляном слое.

РЕАКЦИЯ С ХЛОРНЫМ ЖЕЛЕЗОМ

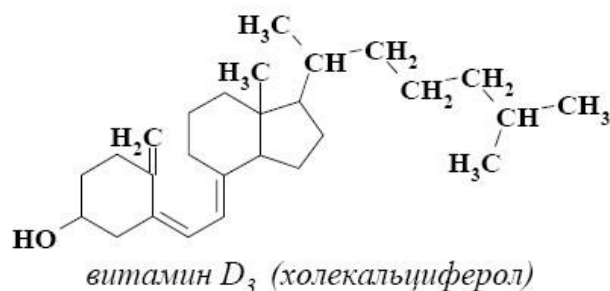
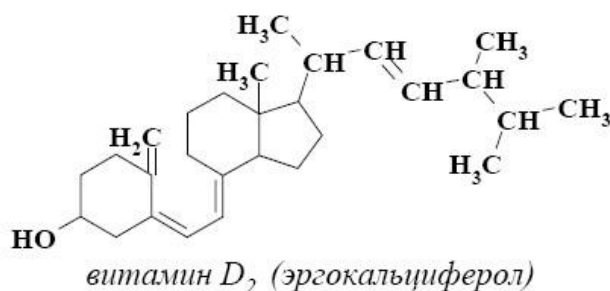
В сухую пробирку вносят 0,5 мл спиртового раствора α -токоферола, затем 0,5 мл 1% раствора хлорного железа (III) и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдают появление красного окрашивания.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИФЕРОЛА (ВИТАМИН D)

Известно несколько витаминов группы D (кальциферолы). Они образуются из провитаминов путем воздействия ультрафиолетового света. Провитаминами являются стеринны, у которых в кольце В имеются две двойные связи. Естественным витамином,

находящимся в тканях животного и человека, а также в рыбьем жире, является витамин D₃ (холекальциферол), который образуется из 7-дегидрохолестерина в коже под влиянием ультрафиолетовых солнечных лучей.

Основные проявления недостаточности этого витамина касаются костной системы. Недостаток витамина D у детей приводит к возникновению рахита. Это приводит к деминерализации костей, их размягчению и искривлению. Суточная потребность маленьких детей в витамине D — 13-25 мкг, что составляет 500—1000 ме (1 ме = 0,025 мкг витамина D₂ или D₃). Богаты витамином D печеночный жир морских рыб, сливочное масло, желтки яиц.



Витамин D при взаимодействии с анилиновым реактивом при нагревании окрашивается в красный цвет, при взаимодействии с раствором брома в хлороформе в зеленовато-голубой.

РЕАКЦИЯ С АНИЛИНОМ

В сухую пробирку вносят 2 капли масляного раствора эргокальциферола, 10 капель хлороформа и 1-2 капли анилинового реактива, осторожно нагревают при постоянном помешивании. Отмечают результат реакции.

РЕАКЦИЯ С БРОМОМ

В сухую пробирку вносят 2-3 капли раствора эргокальциферола и 2-4 капли раствора брома в хлороформе. Отмечают полученный результат.

РЕАКЦИЯ С УКСУСНЫМ АНГИДРИДОМ И СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

Эргостерол по строению близок к холестерину, поэтому дает характерную для него реакцию с уксусным ангидридом и серной кислотой (синее или зеленое окрашивание).

Немного сухих дрожжей помещают в пробирку, затем добавляют 15 капель хлороформа, встряхивают. Полученный экстракт отфильтровывают. К нему добавляют по 5 капель уксусного ангидрида и серной кислоты. Отмечают результат реакции.

КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ ФИЛЛОХИНОНА

К группе витаминов К относятся два типа хинонов (витамины К₁ и К₂) с боковыми цепями, представленными изопреновыми звеньями, в основе циклической структуры которых лежит кольцо 1,4-нафтохинона. Витамин К₁ - это филлохинон-4, а витамин К₂ - менахинон-6.

Витамин К необходим для синтеза клетками печени ряда факторов свертывания крови. В остатки глутаминовых кислот белковых молекул этих факторов вводится еще одна карбоксильная группа. Образуются остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты, через которые происходит присоединение ионов кальция. Поэтому после введения в организм антагонистов витамина К время свертывания крови увеличивается.

При авитаминозе К появляются подкожные и внутримышечные кровоизлияния, содержание протромбина в крови понижается. Наиболее богаты витамином К капуста, шпинат, рябина, печень.

РЕАКЦИЯ С ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТОМ *Ход работы*

В пробирку вносят 4 капли спиртового раствора витамина К, добавляют 8 капель 5% раствора диэтилдителиокарбамата натрия и 4 капли 4 % спиртового раствора гидроксида натрия.

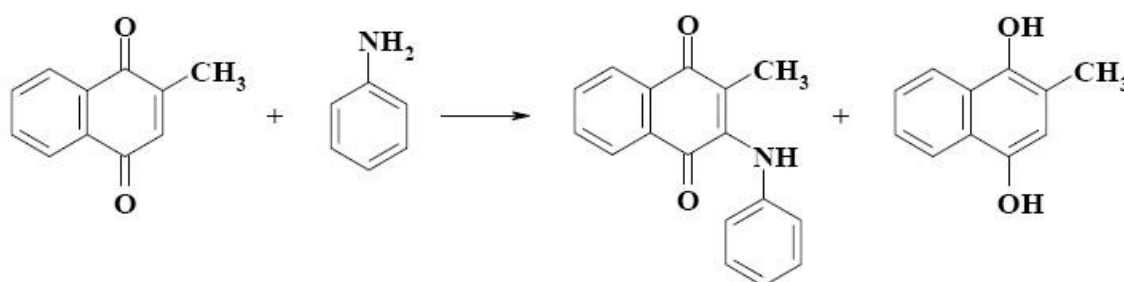
Содержимое пробирки встряхивают. Постепенно появляется окраска.

РЕАКЦИЯ СО ЩЕЛОЧНЫМ РАСТВОРОМ ЦИСТЕИНА *Ход работы*

В пробирку вносят 5 капель 0,1% спиртового раствора викасола, добавляют 2 капли 0,02% раствора цистеина и 2 капли 10% раствора гидроксида натрия и тщательно перемешивают. Раствор в пробирке становится лимонно-желтого цвета.

РЕАКЦИЯ С АНИЛИНОМ

В основе метода лежит образование окрашенного 2-метил-3-фениламино-1,4-нафтохинона при реакции с анилином:



Ход работы

В пробирку вносят 10 капель 0,1% спиртового раствора викасола, добавляют 5 капель раствора анилина и перемешивают. Раствор в пробирке приобретает красный цвет.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица - Результаты лабораторной работы

п/п	Материал, содержащий витамин	Название витамина	Употребляемые реактивы и материалы	Наблюдаемые окраски, осадки, запах, обесцвечивание	На чём основана реакция

ЗНАЕТЕ ЛИ ВЫ ЧТО

Изменение витаминов при кулинарной обработке. Потери при кулинарной обработке водорастворимых витаминов (группы В, витамин С) вызваны либо переходом их в воду (отвар), либо разрушением за счет окисления или других деструкционных процессов. Содержание жирорастворимых витаминов (А, D, Е и др.), в свою очередь, снижается только за счет их разрушения. Например, при оттаивании мороженного мяса потери витаминов группы В составляют 4-10%, а при промывании риса - 30%. Больше количество витаминов группы В извлекается при варке растительных продуктов (круп, овощей): в отвар переходит до 40% витаминов, поэтому отвары желательно использовать.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Жирорастворимые витамины. Понятие. Химические свойства.
2. Витамин Е. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
3. Витамин А, бета-каротины. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
4. Витамин Д. Химическая структура витаминов Д₂ и Д₃, роль в фосфорнокальциевом обмене. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
5. Витамин К. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.

ФЕРМЕНТЫ. КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ. МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ. РОЛЬ ФЕРМЕНТОВ В ОРГАНИЗМЕ ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5. ФЕРМЕНТЫ, ОБЩИЕ СВОЙСТВА, ВЫДЕЛЕНИЕ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ПО МЕТОДУ ВОЛЬГЕМУТА

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

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

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

Во все 10 пробирок приливают по 1 мл воды и по 2 мл 0,1% раствора крахмала.

Перемешивают, встряхивают пробирки и помещают в термостат при температуре 37 °С на 30 мин. Затем пробирки вынимают, охлаждают, во все добавляют по 1 капле раствора йода, перемешивают и отмечают окраску.

Данные занести в таблицу.

Таблица Определение активности амилазы

пробирки	Разведение слюны	Окрашивание йодом	Активность амилазы
1	1:10		
2	1:20		
3	1:40		
4	1:80		
5	1:160		
6	1:320		
7	1:640		
8	1:1280		
9	1:2560		
10	1:5120		

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

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

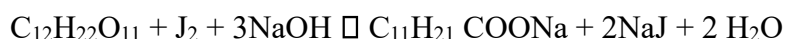
Например, если с красно-бурой окраской жидкость была отмечена в 5 пробирке, где слюна разбавлена в 160 раз и куда было прибавлено 2 мл 0,1% раствора крахмала, то 1 мл неразбавленной слюны расщепил бы в 160 раз больше 0,1% раствора крахмала: 1/160 мл слюны расщепляет 2 мл — 0,1% раствора крахмала, 1мл слюны расщепляет x мл 0,1% раствора крахмала, т. е. $x = 2 \cdot 1 : 1/160 = 320$ мл 0,1% раствора крахмала. Следовательно, 1 мл неразбавленной слюны расщепляет за 30 минут при 37 °С 320 мл 0,1% раствора крахмала.

Условно это принимают за 320 единиц α -амилазы по Вольгемуту. Результат принято изображать следующим образом: $A_{37^\circ/30'} = 320$ ед.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ ПО ПРИРОСТУ МАЛЬТОЗЫ

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

Крахмал и гликоген не обладают восстанавливающей способностью, тогда как продукт их гидролиза мальтоза — обладает этим свойством. Реакция идет по уравнению: $(C_6H_{10}O_5)_n + H_2O \rightarrow C_{12}H_{22}O_{11}$



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

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

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

Спустя 30 минут в опытную колбочку вносят 0,5 мл 5% HCl и нагревают до кипения. Затем в обе колбы, добавляют по 15 мл 0,1 н. раствора J₂ и по каплям, все время перемешивая, добавляют 0,5 мл 40% раствора NaOH.

Оставляют пробы стоять 15 минут, а затем в обе колбочки вносят по 10 мл 5% раствора HCl и выделившийся J₂ титруют 0,05 н. раствором Na₂S₂O₃ до исчезновения синефиолетового окрашивания.

Рассчитывают активность амилазы: 1 мл 0,05 н. раствора J₂ эквивалентный 1 мл 0,05 н. раствора Na₂S₂O₃, соответствует 8,57 мг мальтозы. Количество образовавшейся мальтозы

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

где B — количество 0,05 н. раствора Na₂S₂O₃, пошедшее на титрование контрольной пробы; D — количество 0,05 н. раствора Na₂S₂O₃, пошедшее на титрование опытной пробы; 8,57 коэффициент поправки на 0,05 н. раствора Na₂S₂O₃. Активность амилазы A будет равна:

$$A = C/n,$$

где n — разведение пробы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ

Предлагаемый метод основан на учете образующегося в процессе реакции аммиака при гидролизе мочевины NH₂-CO-NH₂. При этом уреазы не действуют на тиомочевину, структурно сходное вещество NH₂-CS-NH₂.

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

В две колбы на 50 мл вносят по 5 мл препарата уреазы и по 5 мл 2% раствора мочевины в фосфатном буфере (pH 7), перемешивают. В одной из колб фермент инактивируют путем нагревания до кипения; обе колбы ставят на 1 час в термостат при 37 °C, после чего в колбы добавляют по 1 мл 0,1%-ного раствора HgCl₂, несколько капель 0,2%-ного метилового красного и выделившийся аммиак титруют 0,1 н. раствором HCl.

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

Расчет активности уреазы производят по формуле:

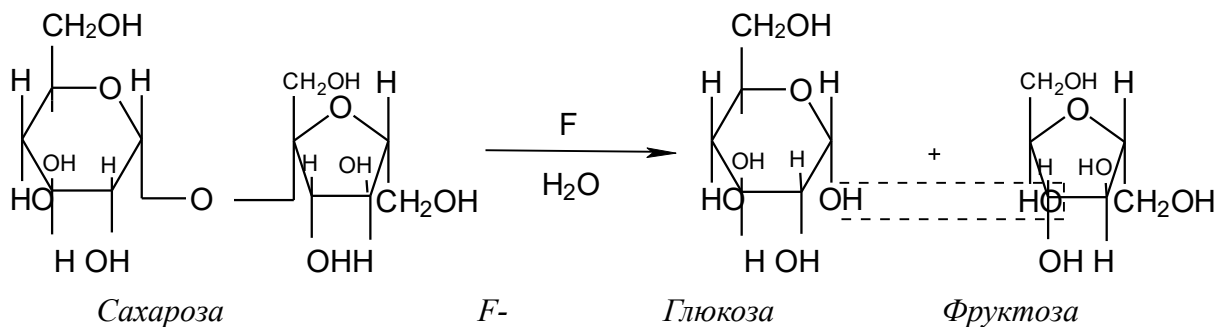
$$v = \frac{(A - B) \cdot T \cdot 1,4 \cdot 1,25}{t}$$

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

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ САХАРАЗЫ

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



сахараза **Ход работы**

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

Берут 4 пробирки, в первые две приливают по 1 мл инвертазы, по 2 мл 5 % раствора NaOH и нагревают до кипения. В две другие приливают по 1 мл инвертазы. Затем во все 4 пробирки приливают по 5 мл 1% раствора сахарозы. Пробирки 3 и 4 ставят на 15 минут в термостат при 37 °С. По истечении указанного времени в пробирки 3 и 4 приливают по 2 мл 5% раствора щелочи. После охлаждения во все пробирки добавляют по 5 мл Фелинговой жидкости и нагревают до кипения. Выпадает красный осадок гидрата закиси меди. По количеству осадка судят об активности инвертазы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Ферменты. Понятие. Биологическая роль. Физико-химические свойства.

Сходство и отличие ферментов и неорганических катализаторов

2. Номенклатура и классификация ферментов. Примеры ферментативных реакций.
3. Теории о механизмах действия ферментов.
4. Зависимость скорости ферментативных реакций от температуры, pH. Константа Михаэлиса.
5. Виды специфичности ферментативных реакций. Примеры ферментативных реакций.
6. Строение ферментов. Физико-химические основы ферментативных реакций.
7. Сложные ферменты. Особенности строения. Простетические группы ферментов.

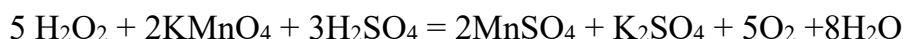
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 6. ФЕРМЕНТЫ, ОБЩИЕ СВОЙСТВА, ВЫДЕЛЕНИЕ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ Каталаза-это распространенный фермент, обнаруженный почти во всех живых организмах, подвергающихся воздействию кислорода (таких как бактерии, растения и животные), который катализирует разложение перекиси водорода на воду и кислород. Фермент обеспечивает защиту клетки от окислительного повреждения активными формами кислорода.

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

Метод определения активности каталазы основан на определении количества пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом. Количество H_2O_2 в реакционной смеси определяют титрованием в кислой среде раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л:



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

ЗАВИСИМОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ОТ pH 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. **Ход работы**

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

Таблица Приготовление буферных растворов

	pH	Количество 0,2 М раствора Na_2HPO_3 , мл	Количество 0,1 М раствора лимонной кислоты, мл
1	5,6	2,90	2,10
2	6,4	3,45	1,55
3	6,8	3,65	1,15
4	7,2	4,35	0,63
5	7,8	4,80	0,20

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

желтой). Фиолетовое, красно-фиолетовое и бурое окрашивание показывает меньшую степень расщепления крахмала.

Результаты опыта занести в таблицу.

пробы			Оптимум pH
1	5,6		
2	6,4		
3	6,8		
4	7,2		
5	7,8		

Таблица Зависимость активности амилазы слюны от pH среды pH
среды Окраска с йодом

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Строение ферментов. Кофакторы ферментов.
2. Активаторы ферментов: ионы металлов, частичный протеолиз, фосфолирование и дефосфолирование.
3. Ингибиторы. Обратимое и необратимое ингибирование. Лекарственные препараты как ингибиторы ферментов.
4. Регуляция действия ферментов: аллостерические ингибиторы и активаторы. Примеры ферментативных реакций.
5. Регуляция активности ферментов по принципу обратной связи. Примеры ферментативных реакций.
6. Локализация ферментов в организме. Понятие общих и органоспецифических ферментов.
7. Различия ферментного состава органов и тканей. Органоспецифичные ферменты.
8. Понятие изоферментов. Значение определения уровня активности ферментов и изоферментов в плазме крови в диагностике заболеваний.
9. Методы определения ферментативной активности. Особые приемы, применяемые при выделении ферментов.
10. В каких единицах измеряется ферментативная активность?
11. Способы определения активности ферментов.
12. Как можно обнаружить фермент в биологическом материале? 13. Дайте определение удельной активности фермента
14. Факторы, определяющие активность ферментов.
15. Основные этапы и условия выделения ферментов из биоматериала.

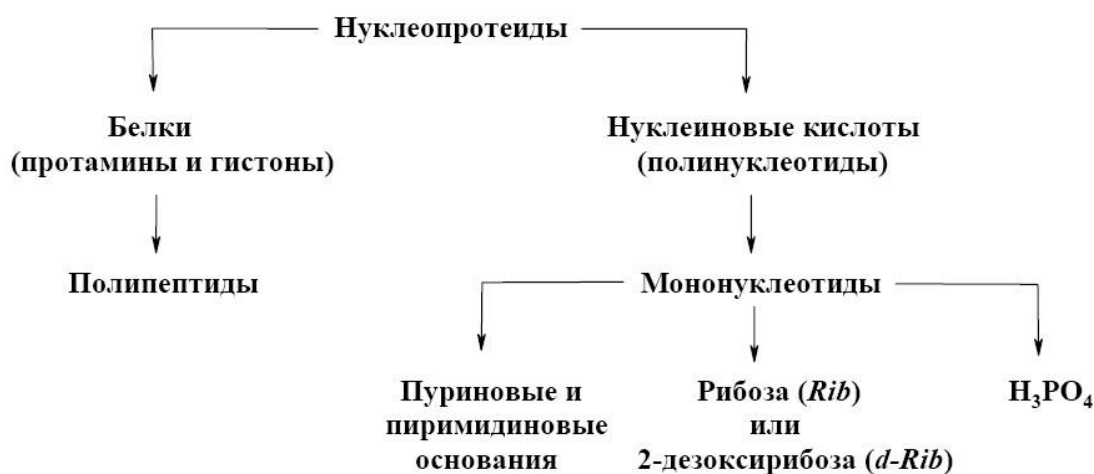
НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА. ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ. ЗНАЧЕНИЕ. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 7. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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



ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

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

Ход работы

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ

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

Ход работы ПОЛИПЕПТИДЫ ОТКРЫВАЮТ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИЕЙ

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

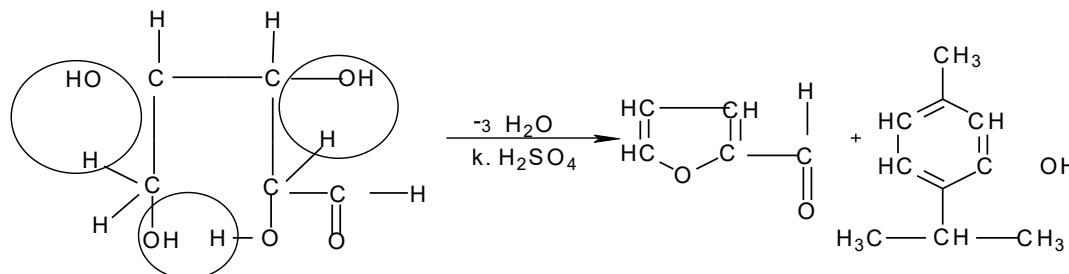
УГЛЕВОДЫ (РИБОЗУ И ДЕЗОКСИРИБОЗУ) ОПРЕДЕЛЯЮТ ФЕЛИНГОВОЙ

ПРОБОЙ

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

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ МОЛИША НА ПЕНТОЗУ

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



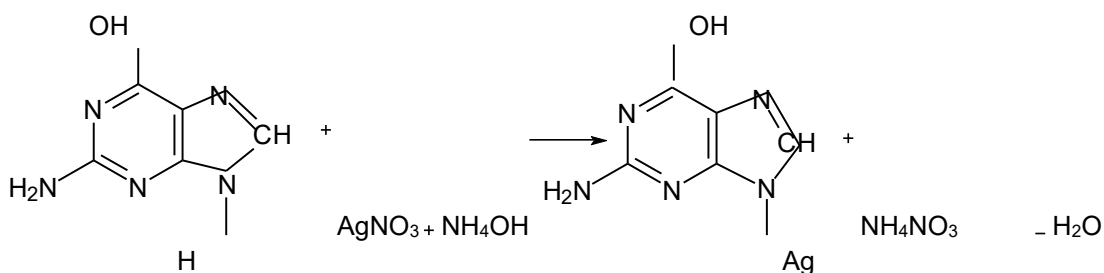
К 10 каплям гидролизата дрожжей прибавляют 3 капли раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно!) - 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки появляется красное окрашивание.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

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

ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ ОСНОВАНИЯ ОБНАРУЖИВАЮТ ПО ИХ РЕАКЦИИ С АММИАЧНЫМ РАСТВОРОМ ОКСИДА СЕРЕБРА

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



КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. История открытия нуклеиновых кислот.
2. Функции и виды нуклеиновых кислот
3. Строение нуклеиновых кислот. Сходство и различия в строении ДНК и РНК
4. Пуриновые и пиримидиновые основания. Напишите формулы
5. Углеводные компоненты нуклеиновых кислот. Напишите формулы.
6. Что такое нуклеотиды и нуклеозиды? Напишите формулы
7. Циклические нуклеотиды строение и функции. Напишите формулы
8. Что такое нуклеопротеиды, из каких компонентов они состоят?
9. Физико-химические свойства нуклеиновых кислот

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 8. ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Из сложных белков особое значение имеют нуклеопротеиды, играющие ведущую роль в передаче наследственных признаков, в синтезе белка, во многих процессах обмена. Нуклеопротеиды состоят из белка и сложных полинуклеотидов, или нуклеиновых кислот, которые в своем составе содержат азотистые основания, углеводы (моносахариды) и фосфорную кислоту. Различают рибонуклеиновые (РНК) и дезоксирибонуклеиновые (ДНК) кислоты в зависимости от того, какой моносахарид – рибоза или дезоксирибоза – входит в их состав. Так как все три компонента (азотистое основание, углевод и фосфорная кислота) входят в состав нуклеиновых кислот всегда в постоянных молярных концентрациях (в отношении 1:1:1), определение нуклеиновых кислот обычно проводят, исследуя содержание какого-либо одного из указанных компонентов.

Принцип метода основан на экстракции нуклеиновых кислот (суммарного количества РНК и ДНК) горячей хлорной кислотой с последующим определением нуклеинового фосфора в растворе фотометрированием при 270 и 290 нм; по концентрации нуклеинового фосфора вычисляют содержание нуклеиновых кислот. Точность метода $\pm 10\%$.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ

Для выделения растительного ДНК можно взять зелёный горошек или лук.

Ход работы

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

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

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

Деревянной палочкой выловите их и рассмотрите под микроскопом.

В выводах опишите биохимические механизмы выделения молекул ДНК из предложенных образцов.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

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

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

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

Ход работы

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

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

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

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

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

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. АТФ, УДФ, ТМФ, ГТФ, ЦДФ строение и функции.
2. ДНК, биологическая роль, локализация в клетке. Биологическое значение двуспирального строения ДНК. Принцип комплементарности ДНК и РНК и его биологическая роль.
3. Пуриновые и пиримидиновые основания.
4. РНК, ее виды, биологическая роль, локализация в клетке.
5. Углеводные компоненты нуклеиновых кислот.
6. Лактим-лактаманная таутомерия азотистых оснований. Напишите формулы
7. ДНК и РНК биологическая роль, локализация в клетке.
8. Методы выделения нуклеиновых кислот

9. Роль этилового спирта в выделении ДНК из проб растительного и животного происхождения.
10. Опишите принцип спектрофотометрии нуклеиновых кислот

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 9. АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

ДНК - носитель генетической информации, записанной в виде генетического кода. По последовательности нуклеотидов в ДНК можно установить степень родства людей, а по митохондриальной ДНК – точно устанавливать родство по материнской линии. Для этих целей используют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). В основе метода ПЦР лежит природный процесс - комплементарное достраивание (воспроизводство) ДНК-матрицы *in vivo*, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция носит название - репликация ДНК. ПЦР позволяет многократно воспроизводить (амплифицировать) выбранный фрагмент ДНК без помощи клетки-хозяина. Для этого нужно иметь в своем распоряжении два олигонуклеотида (праймера), каждый из которых будет гибридизоваться с одной из цепей на противоположных концах подлежащего амплификации фрагмента ДНК, достаточное количество дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ) и термостабильную ДНК-полимеразу. Затем, чтобы выявить специфическую последовательность нуклеотидов в ДНК-фрагменте полученного образца ДНК, ДНК-фрагмент амплифицируют с помощью ПЦР. На первой стадии двунитевую ДНК нагревают до 93-95^oC для разделения цепей и получения одонитевой ДНК. Затем смесь охлаждают (отжиг), чтобы произошла гибридизация с праймерами. Далее, комплементарные цепи ДНК синтезируются в обоих направлениях, начиная от праймеров. Этот циклический процесс (цикл 1) повторяют с той же самой реакционной смесью (цикл 2, 3 и т.д.) 20-30-кратно. Двунитевые фрагменты ДНК, равные по длине расстоянию между двумя праймерами (темно-серый цвет), начинают накапливаться после третьего цикла. Их количество удваивается после каждого цикла до тех пор, пока почти все синтезированные фрагменты не будут соответствовать первоначальному фрагменту, ограниченному праймерами.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КРОВИ (ПО П. В. СИМАКОВУ) Ход работы

Определение нуклеиновых кислот в крови. В 1,4 мл воды, налитой в широкие центрифужные пробирки, помещают 0,1 мл крови и размешивают. К полученному гемолизату прибавляют 13,5 мл 0,6 н. раствора хлорной кислоты и перемешивают. Пробирку помещают на 20 мин. в сильно кипящую водяную баню и закрывают маленькой воронкой. За это время происходит полный гидролиз нуклеиновых кислот, связанных с белками, и осаждение белков. Затем пробирку охлаждают струей воды из крана и центрифугируют 10–15 мин. при 1500 об/мин. Жидкость сливают в чистую пробирку и фотометрируют при 270 и 290 нм в кювете с рабочей длиной 10 мм против 0,6 н. раствора хлорной кислоты.

Определение нуклеиновых кислот в тканях. Навеску материала от 5 до 500 мг заливают точно отмеренным количеством (5–10 мл) 0,5 н. раствора хлорной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане 20 мин. Дальнейший Порядок выполнения работы и расчет те же, что и при определении нуклеиновых кислот в крови (А. С. Спирин).

Расчет содержания нуклеиновых кислот в крови производят по формуле: x

$$x = \frac{A - B}{G} \cdot 10,3 \cdot 100 \cdot \frac{1}{V},$$

где $A - B$ – разность между оптическими плотностями исследуемого раствора при 270 и 290 нм,

0,19 – поправка при измерении оптической плотности исследуемого раствора при 270 и 290 нм;

G – объем раствора крови с хлорной кислотой;

V – объем крови, взятой для исследования;

10,3 – коэффициент пересчета на количество нуклеиновых кислот; 100

– коэффициент пересчета в процентах.

Темы устных сообщений

1. Спектрофотометрия: определение концентрации белков и нуклеиновых кислот по оптической плотности, свойстве, основанном на способности азотистых оснований (нуклеиновые кислоты) и пептидных групп (белки) поглощать свет в УФобласти 2. Выделение ДНК из биологического материала фенолхлороформным методом
3. Полимеразная цепная реакция.
4. Real-time ПЦР
5. Секвенирование нуклеиновых кислот

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Первичная структура нуклеиновых кислот
2. Вторичная структура ДНК, стэкинг-взаимодействия. Принцип комплементарности. Напишите формулы
3. Правила Чаргаффа.
4. Вторичная структура РНК
5. Третичная структура ДНК. Уровни упаковки хроматина
6. Третичная структура РНК
7. Определение количества нуклеиновых кислот, методы
8. Нуклеотиды, не входящие в состав нуклеиновых кислот. Напишите формулы

РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. ГОРМОНЫ. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА. ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 10. ГОРМОНЫ - ПРОИЗВОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ, ВЫДЕЛЕНИЕ, КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить классификацию и общие механизмы действия гормонов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

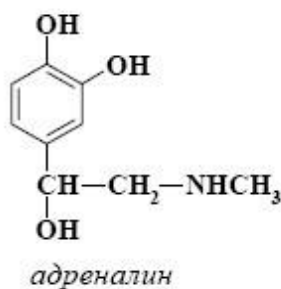
- белками (гормоны гипофиза, поджелудочной и паращитовидных желез).
- производными аминокислот (адреналин, тироксин).

- стероидами (гормоны коркового вещества, надпочечников и половые).

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

ОБНАРУЖЕНИЕ АДРЕНАЛИНА

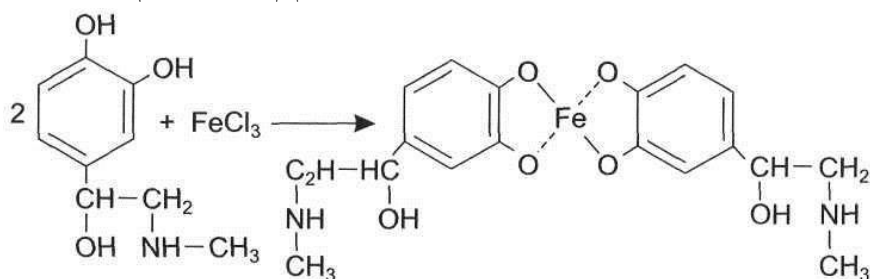
Адреналин, L-1-(3,4-диоксифенил)-2-метиламиноэтанол (5) - гормон коры надпочечников. Играет большую роль в процессе передачи нервного возбуждения, влияет на сердечно-сосудистую систему (вызывает значительное повышение кровяного давления, увеличение частоты сердечных сокращений и минутного объема сердца).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



Ход работы РЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН С ЙОДАТОМ КАЛИЯ

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

РЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН С ХЛОРНЫМ ЖЕЛЕЗОМ



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

ДИАЗОРЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН

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

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

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НИТРИТНО-МОЛИБДЕНОВОГО РЕАКТИВА

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

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

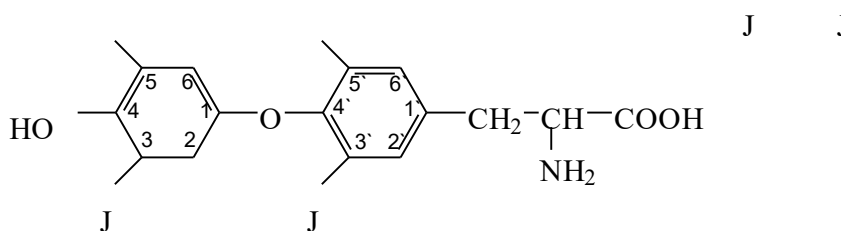
ДОКАЗАТЕЛЬСТВО НАЛИЧИЯ ЯДРА ПИРОКАТЕХИНА В АДРЕНАЛИНЕ

Ход работы

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

РЕАКЦИЯ НА ГОРМОНЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ТИРОКСИН)

Гормон щитовидной железы.



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

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



J_2 + крахмал $\rightarrow$ синее окрашивание

Ход работы

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

ОБНАРУЖЕНИЕ ИНСУЛИНА

Инсулин - гормон, вырабатываемой поджелудочной железой животных и человека. Он регулирует содержание сахара (глюкозы) в крови. При его недостатке развивается весьма распространенное заболевание – сахарный диабет (гипергликемия). Инсулин является главным лекарственным препаратом для лечения этого заболевания и основное его

количество производится экстракцией из поджелудочной железы сельскохозяйственных животных (свиней, крупного рогатого скота). Инсулин образуется в (β-клетках островков Лангерганса из своего предшественника — проинсулина.

ОБНАРУЖЕНИЕ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИЕЙ

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

Ход работы

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

ОБНАРУЖЕНИЕ РЕАКЦИЕЙ С СУЛЬФОСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

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

ОБНАРУЖЕНИЕ РЕАКЦИЕЙ ФОЛЯ

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Определение гормонов. Химическая природа гормонов.
2. Химическая природа гормонов.
3. Номенклатура гормонов.
4. Исторические аспекты изучения гормонов.
5. Классификация гормонов, основанная на их химической природе
6. Классификация гормонов по влиянию на обмен веществ
7. Классификация гормонов, основанная на их растворимости, функциональному признаку и по локализации
8. Анатомическая классификация по органу-продуценту (месту синтеза)
9. Специфические особенности биологического действия гормонов.
- Взаимосвязь функционирования нервной системы и эндокринных систем
10. Принцип действия гормонов. Характеристика гормонов по классам.
11. Молекулярные механизмы передачи гормонального сигнала. Типы реализации гормонального действия
12. Варианты действия гормонов. Антагонисты и агонисты гормонов

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 11. СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ, ВЫДЕЛЕНИЕ, КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить классификацию и общие механизмы действия гормонов стероидной природы.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

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

РЕАКЦИЯ НА ФОЛЛИКУЛИН (ЭСТРОН)

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

Ход работы РЕАКЦИЯ С КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

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

ОБРАЗОВАНИЕ ФЕНОЛЯТА ФОЛЛИКУЛИНА

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

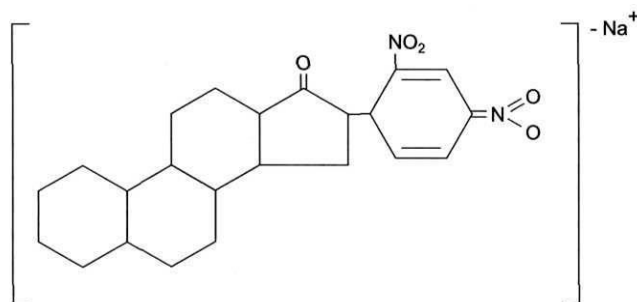
РЕАКЦИЯ НА ФЕНОЛЬНУЮ ГРУППУ

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

ГОРМОНЫ КОРКОВОГО СЛОЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ

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

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



Реакция открытия 17-кетостероидов в моче основана на способности 17кетостероидов давать в щелочной среде с мета-динитробензолом продукт конденсации красного или красно-фиолетового цвета за счет метиленовой группы (CH_2), соседней с кетогруппой. Интенсивность окраски пропорциональна количеству находящихся в моче 17кетостероидов.

Ход работы

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

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

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА КОРТИЗОЛ С СОЛЯНОКИСЛЫМ ФЕНИЛГИДРАЗИНОМ

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

Ход работы

К 1 мл раствора преднизолона прибавляют 5 мл раствора фенилгидразина и нагревают на водяной бане. Через несколько минут появляется желтое окрашивание.

С РЕАКТИВОМ ФЕЛИНГА

Кортизон и преднизолон способны восстанавливать закись меди из солей окиси. **Ход работы**

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

Результаты работы оформить в виде таблицы.

Таблица. Исследование гормонов

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

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Стероидные гормоны. Примеры, значение.
2. Пептидные гормоны. Примеры, значение.
3. Прочие гормоны. Примеры, значение.
4. Гормоны гипоталамуса.
5. Гормоны гипофиза
6. Гормоны паращитовидных желез (паратгормоны)
7. Гормоны щитовидной железы
8. Гормоны поджелудочной железы 9. Гормоны надпочечников
10. Половые гормоны.
11. Гормоны эпифиза
12. Гормоны пищеварительного тракта
13. Гормоны вилочковой железы (тимуса)
14. Кинины. Цитокины

БИОЭНЕРГЕТИКА. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 12. ОСНОВЫ БИОЭНЕРГЕТИКИ.

МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

1. ИССЛЕДОВАНИЕ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТКАНЕВОГО ГОМОГЕНАТА

Материалы и реактивы: дистиллированная вода, мышечная ткань.

Приборы и посуда: весы, гомогенизатор, ступка и пестик, песок, марля, воронка, стеклянная палочка, пробирки, штатив, пипетка, пипетатор. Ход работы

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЫШЦ

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



Материалы и реактивы: мышечная ткань, 3 % раствор янтарной кислоты, 10 % раствор NaOH, дистиллированная вода, 3 % яблочная кислота, 0,2 % раствор метиленовой сини.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, стеклянная палочка, пипетка, пипетатор, термостат.

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 °С. Через 20–25 мин наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания в двух других.

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

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 и реактивы: мышечная ткань, дистиллированная вода, 1 % раствор метиленового синего, вазелиновое масло, 0,1 М раствор янтарной кислоты, 0,1 М раствор яблочной кислоты.

Приборы и посуда: весы, ступка и пестик, воронка, марля, пробирка, штатив, стеклянная палочка, термостат.

Ход работы

Навеску свежей мышечной ткани 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.

Таблица – Торможение активности СДГ

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

Во все пробирки добавляют по 2–3 капли 1 % раствора метиленового синего и после перемешивания по 3–4 капли вазелинового масла. Пробирки термостатируют при температуре 40 °С. Через 3–5 мин наблюдают изменение окраски. Полученные результаты внести в таблицу.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Варианты дыхательной цепи. Полная дыхательная цепь. Коэффициент Р/О. Написать схему движения электронов и протонов через дыхательную цепь ферментов.
2. Сокращенная (укороченная) дыхательная цепь. Субстраты. Коэффициент Р/О. Написать схему движения электронов и протонов через дыхательную цепь ферментов.
3. Роль фермента сукцинатдегидрогеназы. Какую реакцию катализирует сукцинатдегидрогеназа? Напишите уравнение реакции.
4. Максимально сокращенная (максимально укороченная) дыхательная цепь. Субстраты. Коэффициент Р/О. Написать схему движения электронов и протонов по дыхательной цепи.
5. Сопряжение дыхания и фосфорилирования. Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы в биологических системах. Формулы расчета.
6. Коэффициент Р/О. Суммарный результат окисления НАДН⁺, ФАДН₂ и фосфорилирования.
7. Интенсивность дыхания, отношение АТФ/АДФ. Роль адф в дыхательном контроле. Расчет энергетического заряда системы АТФ—АДФ—АМФ, напишите уравнение.

8. Механизм сопряжения окисления и фосфорилирования. Основные гипотезы, объясняющих механизм сопряжения окисления и фосфорилирования.
9. Химическая и конформационная гипотеза сопряжения окисления и фосфорилирования.
10. Хемиосмотическая теория сопряжения окисления и фосфорилирования. Электрохимический потенциал. Расчет.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 13. МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить реакции, лежащие в основе окисления субстратов, состав и последовательность ферментов дыхательной цепи, изучить основы моделирования биологических окислительно-восстановительных систем.

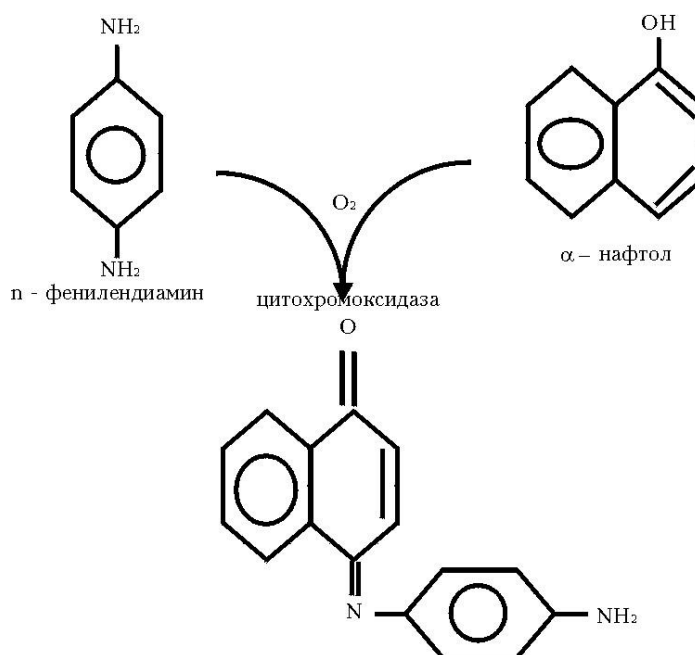
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Цитохромоксидаза является хромопротеином, содержит геминую группу и Cu^{2+} , активна в растительных и животных тканях, осуществляет перенос электронов на кислород в цепи тканевого дыхания. Определение активности фермента дает представление о функционировании цепи переноса электронов.

Цитохромоксидаза как гемсодержащий белок очень чувствительна к действию цианидов, сульфидов, азидов и прочих веществ, взаимодействующих с железом гема. При отравлении этими соединениями происходит угнетение цитохромоксидазы и развивается гистотоксическая гипоксия, т.е. кислородное голодание тканей, связанное с невозможностью использовать кислород как акцептор электронов и протонов в дыхательной цепи митохондрий. Метод выявления цитохромоксидазы реактивом НАДИ используется для выявления этого фермента с целью диагностики нарушений тканевого дыхания.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ МЫШЦ

Смесь нафтола и п-фенилендиамина (реактив «НАДИ») окисляется цитохромоксидазой в присутствии кислорода, образуя продукт конденсации индофеноловый синий по схеме:



Ход работы

0,5 г свежих мышц растирают в ступке с 10 мл H₂O. Воду сливают, мышечную ткань просушивают фильтровальной бумагой.

Мышечную ткань разделяют на 2 части. Одну помещают на фильтр, другую переносят в пробирку, добавляют 1 мл H₂O и кипятят 1 минуту. После охлаждения извлекают прокипяченную мышечную ткань стеклянной палочкой и помещают на фильтр.

На обе порции мышц наносят по 2 капли реактива «НАДИ». Инкубация 5-10 минут, при температуре 18-20 С (комнатная). Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.

Результат: Вывод:

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ОБМЕН УГЛЕВОДОВ ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 14. ВЫДЕЛЕНИЕ И РЕАКЦИИ НА ОТКРЫТИЕ МОНО-, ДИ- И ПОЛИСАХАРИДОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с методами выделения моносахаридов и качественными реакциями наиболее распространенных представителей класса углеводов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

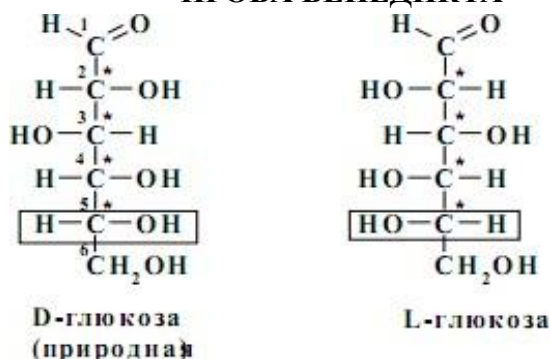
Углеводы – обширный класс соединений широко распространенных в природе. По химической природе это органические вещества, представляющие собой альдегиды или кетоны многоатомных спиртов. В зависимости от числа атомов углерода в цепи моносахариды делят на тетразы (C₄), пентозы (C₅), гексозы (C₆) и т.д. В каждую из этих групп включают и альдозы и кетозы.

Моносахариды являются гетерофункциональными соединениями. В их молекулах одновременно содержатся и карбонильная (альдегидная или кетонная), и несколько гидроксильных групп, т.е. моносахариды представляют собой полигидроксикарбонильные соединения - полигидроксиальдегиды и полигидроксикетоны.

ОТКРЫТИЕ ГЛЮКОЗЫ

Глюкоза – самая распространенная из моноз, как в растительном, так и в животном мире. Содержится в свободном виде в зеленых частях растений, семенах, различных фруктах и ягодах. В больших количествах содержится в винограде – отсюда происходит ее другое название – виноградный сахар.

ПРОБА БЕНЕДИКТА



Реактив Бенедикта: В колбу на 1 л наливают 700 мл дистиллированной воды, добавляют 173 г лимоннокислого натрия, 100 г безводного (или 200 г кристаллического) Na_2CO_3 . Нагревают до растворения. Отдельно растворяют 17,3 г CuSO_4 в 100 мл воды. Смешивают оба раствора, непрерывно взбалтывая, и после охлаждения доливают до 1 л дистиллированной водой в мерной колбе.

Ход работы

В пробирку наливают 5 мл реактива Бенедикта и прибавляют 0,5 мл 5% раствора глюкозы. Перемешивают и нагревают 1 мин на горелке или 5 мин на водяной бане. Раствор охлаждают и через 5 мин отмечают результаты. При наличии глюкозы раствор окрашивается в зеленый, желтый или красный цвет, на дне образуется осадок.

РЕАКЦИЯ С АРГИНИНОМ

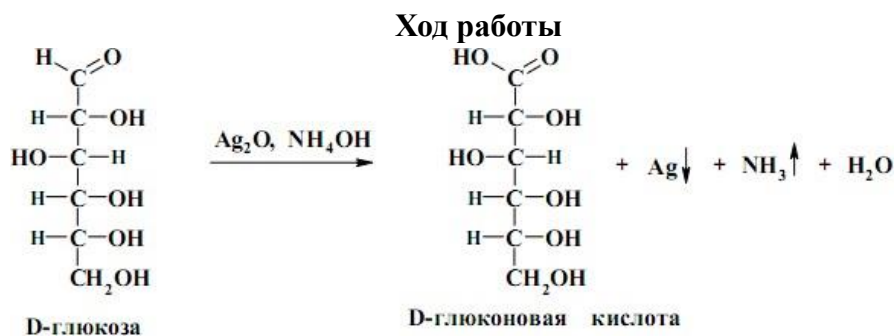
Аргинин взаимодействует с карбонильным кислородом молекулы фруктозы как аминогруппой, так и гуанидиновой группой. При этом раствор в пробирке, где находилась смесь аргинина и фруктозы, приобретает красно-бурый оттенок. Реакцию ведут в растворе борной кислоты для предупреждения осмоления фруктозы, которое маскирует реакцию.

Ход работы

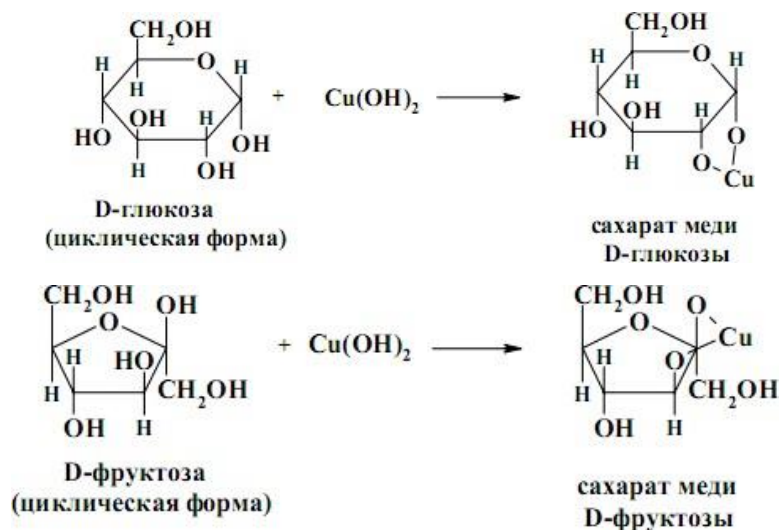
В две пробирки наливают по 2 мл 5% раствора фруктозы в 2,5% растворе H_3BO_3 и прибавляют в первую из них 2 мл 3% раствора аргинина, а во вторую – 2 мл дистиллированной воды. В третью – 2 мл 3% раствора аргинина и 2 мл 2,5% раствора H_3BO_3 . Ставят пробирки на несколько минут в кипящую водяную баню. Отмечают различие во времени появления окраски и ее интенсивности в каждой из проб.

РЕАКЦИЯ «СЕРЕБРЯНОГО ЗЕРКАЛА»

Как и у всех альдегидов, окисление моносахаридов приводит к соответствующим кислотам. Так, при окислении глюкозы аммиачным раствором гидрата окиси серебра образуется глюконовая кислота.



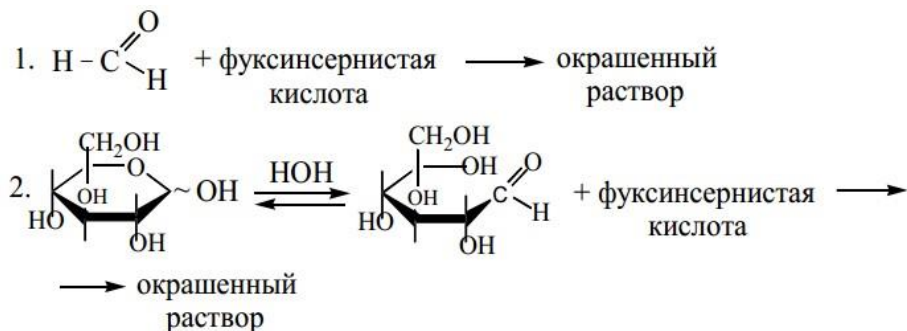
В большую пробирку поместить 3 капли 0,2 н раствора AgNO_3 , 5 капель 2 н NaOH и добавлять по каплям 2 н NH_4OH до полного растворения образующегося осадка. Полученный бесцветный раствор – аммиачный раствор гидрата окиси серебра. Затем к аммиачному раствору гидрата окиси серебра добавить 3-4 капли 0,5% раствора глюкозы и слегка подогреть. Металлическое серебро выделится либо в виде осадка черного цвета, либо в виде блестящего зеркального налета, если стенки пробирки химически чисты. Запишите уравнения реакций. Аналогичный опыт проделайте с 0,5% раствором фруктозы. **ОТКРЫТИЕ АЛЬДЕГИДНЫХ ГРУПП (реакция Троммера)** У восстанавливающих углеводов имеется свободный полуацетального гидроксил, который определяет восстанавливающие свойства и реакции, свойственные моносахаридам. У невосстанавливающих углеводов не содержится свободного полуацетального гидроксила и не проявляются характерные реакции для альдегидной группы.



Ход работы

В большую пробирку поместить 0,5 мл 0,5% раствора глюкозы и 6-8 капель 2 н NaOH . Затем по каплям добавлять 0,2 н раствор CuSO_4 , пока не прекратится его растворение. Осторожно нагреть пробирку. Голубой не растворимый в воде осадок гидрата окиси меди постепенно переходит в желтый, а затем в красный осадок закиси меди. Аналогичный опыт проделать с 0,5% раствором фруктозы.

ОТКРЫТИЕ КАРБОНИЛЬНЫХ ГРУПП



В одну пробирку наливают 2 мл 10% раствора формальдегида, а во вторую – 2 мл 1% раствора глюкозы. Затем в обе пробирки добавляют по 2 мл фуксинсернистой кислоты и перемешивают. Через несколько минут в пробирке с формальдегидом появляется фиолетовое окрашивание, а раствор с глюкозой остается бесцветным. Почему?

Олигосахариды – углеводы, молекулы которых содержат от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями. В соответствии с этим различают дисахариды, трисахариды и т.д. В природе олигосахариды (содержащие от 3 до 8 остатков моносахаров) практически не встречаются, обнаруживаясь в очень незначительных количествах в клетке, как полупродукты синтеза амилозы. Олигосахариды классифицируют: - в зависимости от числа моносахаридных фрагментов, входящих в олигосахариды: дисахариды, трисахариды, тетрасахариды и т. д.; по составу моносахаридных остатков:

- гомоолигосахариды, состоящие из остатков одного вида моносахарида; - гетероолигосахариды, состоящие из остатков разных сахаров; - в зависимости от порядка соединения мономеров:
- линейные и разветвленные;
- восстанавливающие и невосстанавливающие.

Из олигосахаридов в природе наиболее широко распространены дисахариды.

ОТКРЫТИЕ ЛАКТОЗЫ В МОЛОКЕ

В пробирку наливают 0,5 мл молока, добавляют 5 капель 10% раствора NaOH и по каплям 2% раствор CuSO₄ до образования легкой не исчезающей мути. Пробирку нагревают, появляется желтое окрашивание, а затем образуется красно-коричневый осадок.

ВОССТАНАВЛИВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ЛАКТОЗЫ

У восстанавливающих дисахаридов связь между мономерами осуществляется за счет спиртового и полуацетального гидроксильных групп. Таким образом, одно из моносахаридных звеньев сохраняет свободный полуацетальный гидроксил, который определяет восстанавливающие свойства и все реакции, свойственные моносахаридам.

Ход работы

В пробирку вносят 0,5 мл 1 % раствора лактозы и 6-8 капель 2 н раствора NaOH. Затем по каплям добавляют 0,2 н раствора CuSO₄ до полного растворения. Осторожно нагревают, голубой осадок гидрата окиси меди переходит в желто-оранжевый.

Полисахариды (гликаны) это природные полимерные высокомолекулярные углеводы, состоящие из моносахаридов, соединенных гликозидными связями в линейные или разветвленные цепи.

С лечебной целью применяются растительные полисахариды (крахмал, инулин, агар, каррагинан), вытяжки из лекарственного растительного сырья, богатого полисахаридами (слизь корня алтея и др.), комплексные препараты из некоторых высших растений и водорослей (плантаглюцид, мукалтин, ламинарид и т.п.).

РЕАКЦИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ С ЙОДОМ

Амилопектин – полисахарид, одна из фракций крахмала. С раствором Люголя амилоза дает темно-синюю окраску. Йод заходит внутрь спирали амилозы и образует при этом комплексное соединение темно-синего цвета.



В одну пробирку наливают 1 мл 1% раствора крахмала, а в другую – 1 мл гликогена, затем добавляют 2-3 капли раствора Люголя. В пробирке с раствором крахмала появляется синее окрашивание, исчезающее при нагревании и появляющееся вновь при охлаждении.

Гликоген с раствором йода дает красно-бурое окрашивание.

ДЕЙСТВИЕ НА ПОЛИСАХАРИДЫ РЕАКТИВА ФЕЛИНГА

В присутствии восстановителей после нагревания осаждается оксид или гидроксид меди (I); цвет осадка от желтого до красного, иногда зеленого в зависимости от степени дисперсности и размера его частиц.

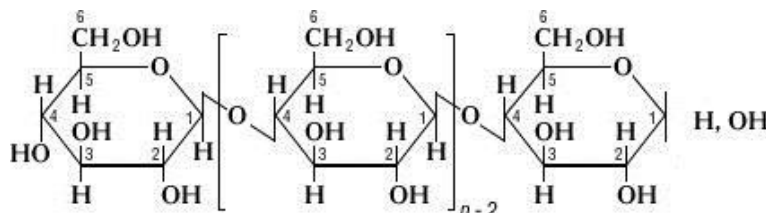
Кетоны (за исключением кето-спиртов), одноатомные фенолы и большинство ароматические альдегидов не восстанавливают реактив Фелинга. Для обнаружения углеводов иногда используют так называемый нейтральный реактив Фелинга, который вместо NaOH содержит Na₂CO₃.

Ход работы

Пронумеровать 3 пробирки. В первую налить 1 мл раствора крахмала, во вторую – 1 мл раствора формалина, в третью – 1 мл воды. В каждую пробирку добавить 1 мл реактива Фелинга. Нагреть все пробирки и сделать выводы.

8. ЦЕЛЛЮЛОЗА

Целлюлоза – один из самых распространённых природных полимеров; главная составная часть клеточных стенок растений. Структурной единицей целлюлозы является D-глюкопираноза, звенья которой соединены 1,4-гликозидными связями в линейные неразветвлённые цепи.



ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА ИЗ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

При экстракции используется способность гликогена к растворению в кислой среде. Применение трихлоруксусной кислоты или хлорной кислот в качестве экстрагирующего реагента одновременно даёт возможность освобождения раствора от примесей белков, нуклеиновых кислот и других полимерных соединений. Гликоген, подобно белкам, обладает

резко выраженными гидрофильными свойствами, поэтому его можно осадить из раствора при высаливании солями щелочных и щелочно-земельных металлов, солями тяжёлых металлов, спиртом.

Оборудование: штативы с пробирками, центрифужные пробирки, пипетки объемом 1 и 2 мл; пипетки капельные (глазные), центрифуга лабораторная, фарфоровые ступки, ножницы.

Реактивы: 1. Трихлоруксусная кислота, 5 % раствор; 2. Реактив Люголя; 3. Уксуснокислый свинец, 10 % раствор; Исследуемый материал: свежая мышечная ткань. **Ход**

работы

5 г свежей мышечной ткани поместить в фарфоровую ступку, замороженную в лёд. Ткань измельчить, залить 2 мл 4 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и вновь тщательно растереть пестиком. Полученную кашицу перенести в центрифужную пробирку, отцентрифугировать при 3000 об/мин. в течение 8-10 мин. и по 1 мл надосадочной жидкости перенести в две пробирки.

В первой из них провести йодную пробу на гликоген, добавив 2-3 капли реактива Люголя. Отметить проявление характерной красно-бурой окраски раствора, интенсивность которой зависит от концентрации глюкозы.

Во вторую пробирку прилить 1 мл 10 %-ного раствора ацетата свинца и отметить выпадение осадка.

Сделать вывод.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Углеводы – определение, распространение, функции. Напишите примеры формул.
 2. Классификация и номенклатура углеводов. Напишите примеры.
 3. Уровни структурной организации полисахаридов. Примеры
 4. Способы написания формул углеводов, формулы Фишера, Колли—Толленса, Хеуорса, конформационные формулы. Напишите примеры формул 5.
- Физико-химические свойства моносахаридов. Напишите реакции.
6. Виды изомерии моносахаридов.стереоизомерия моносахаридов. Энантиомеры, диастереомеры, оптическая активность, аномеры, мутаротация, рацемическая смесь. Напишите формулы.
 7. Представители моносахаридов. Триозы. Тетрозы Пентозы. Гексозы. Напишите примеры формул.
 8. Производные моносахаридов. Сахарные спирты. Напишите примеры формул.
 9. Производные моносахаридов. О- и N- Гликозиды. S- и D- Гликозиды. C- Гликозиды. Напишите примеры формул.
 10. Производные моносахаридов. Аминосахара. Напишите примеры формул. Нейраминовая и сиаловые кислоты. Напишите примеры формул.
 11. Производные моносахаридов. Дезоксисахара. Уроновые кислоты. Напишите примеры формул.
 12. Производные моносахаридов. Уроновые кислоты. Напишите примеры формул.
 13. Применение моносахаридов и их производных в медицине.

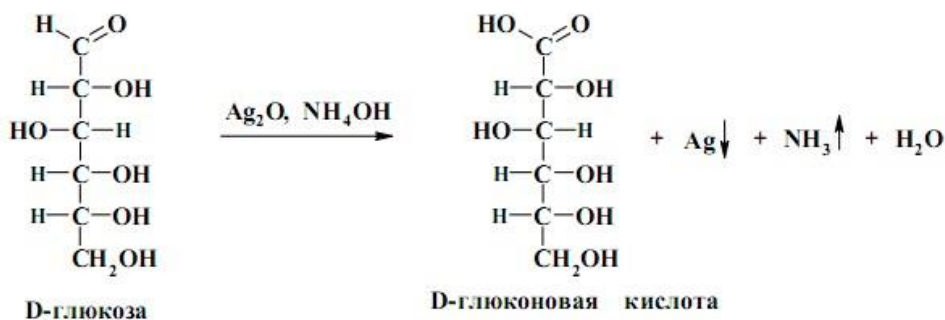
14. Олигосахариды, общая характеристика, классификация. Номенклатура. Физические и химические свойства олигосахаридов. Напишите уравнения
15. Характеристика представителей олигосахаридов. Мальтоза. Сахароза. Лактоза. Напишите формулы.
16. Восстанавливающие и невосстанавливающие дисахариды. Напишите примеры формул. Что такое редуцирующие сахара? Приведите примеры. Напишите формулы редуцирующих сахаров.
17. Гидролиз олигосахаридов. Напишите уравнение реакции ферментативного гидролиза сахарозы, мальтозы, лактозы.
18. Пути мобилизации полисахаридов в организме животных, растений и
19. Пищевые волокна (компоненты пищевых волокон, их пищевая ценность, значение в питании человека).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 15. УГЛЕВОДЫ, ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Моносахариды являются гетерофункциональными соединениями. В их молекулах одновременно содержатся и карбонильная (альдегидная или кетонная), и несколько гидроксильных групп, т.е. моносахариды представляют собой полигидроксикарбонильные соединения - полигидроксиальдегиды и полигидроксикетоны.

РЕАКЦИЯ «СЕРЕБРЯНОГО ЗЕРКАЛА»

Как и у всех альдегидов, окисление моносахаридов приводит к соответствующим кислотам. Так, при окислении глюкозы аммиачным раствором гидрата окиси серебра образуется глюконовая кислота.



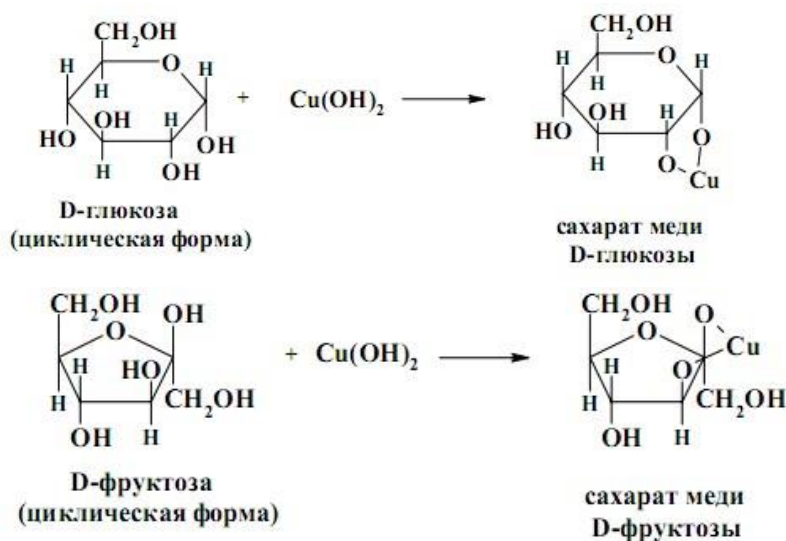
Ход работы

В большую пробирку поместите 3 капли 0,2 н раствора AgNO_3 , 5 капель 2 н NaOH и добавляйте по каплям 2 н NH_4OH до полного растворения образующегося осадка. Полученный бесцветный раствор - аммиачный раствор гидрата окиси серебра. Затем к аммиачному раствору гидрата окиси серебра добавьте 3-4 капли 0,5% раствора глюкозы и слегка подогрейте. Металлическое серебро выделится либо в виде осадка черного цвета, либо в виде блестящего зеркального налета, если стенки пробирки химически чисты. Запишите уравнения реакций. Аналогичный опыт проделайте с 0,5% раствором фруктозы.

РЕАКЦИЯ ТРОММЕРА

У восстанавливающих углеводов имеется свободный полуацетального гидроксил, который определяет восстанавливающие свойства и реакции, свойственные моносахаридам. У невосстанавливающих углеводов не содержится свободного

полуацетального гидроксила и не проявляются характерные реакции для альдегидной группы.



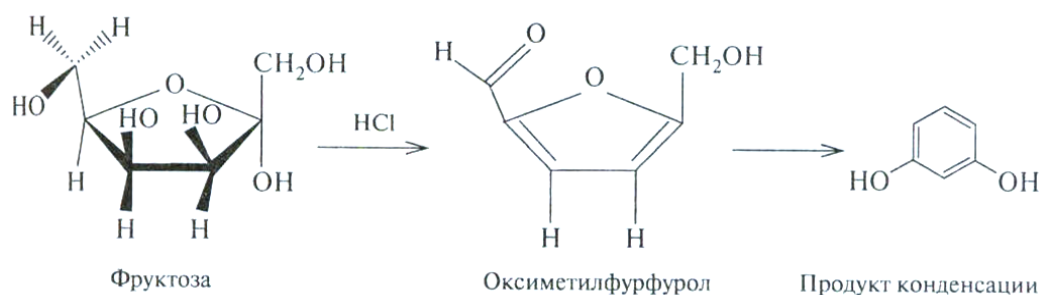
Ход работы

В большую пробирку поместите 0,5 мл 0,5 % раствора глюкозы и 6-8 капель 2 н NaOH. Затем по каплям добавляйте 0,2 н раствор CuSO_4 , пока не прекратится его растворение. Осторожно нагрейте пробирку. Голубой не растворимый в воде осадок гидрата окиси меди постепенно переходит в желтый, а затем в красный осадок закиси меди. Аналогичный опыт проделайте с 0,5% раствором фруктозы.

ОТКРЫТИЕ ФРУКТОЗЫ (РЕАКЦИЯ СЕЛИВАНОВА)

Фруктоза (моноза, гексоза, кетоза, левулеза, плодовый сахар) содержится во всех зеленых растениях и нектаре цветов.

Реакция Селиванова является специфической на кетозы. При нагревании фруктозы с соляной кислотой образуется оксиметилфурфурол. При его взаимодействии с резорцином, образуется соединение, окрашенное в красный цвет.



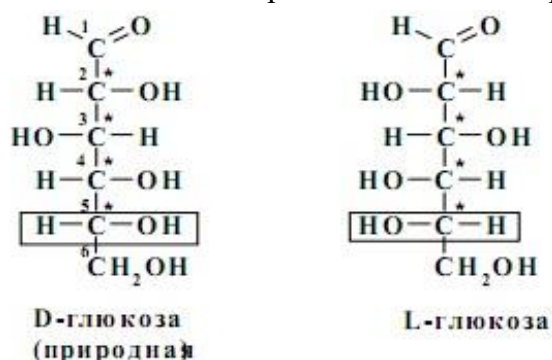
Ход работы

В первую пробирку вносят 10 капель 0,5% раствора фруктозы, во вторую пробирку - 10 капель 0,5% раствора глюкозы. В обе пробирки добавляют в равных объемах свежеприготовленный реактив Селиванова (0,5% раствор резорцина в 20% соляной кислоте). Осторожно нагрейте. Что наблюдаете?

ПРОБА БЕНЕДИКТА НА ГЛЮКОЗУ

Глюкоза — самая распространенная из моноз как в растительном, так и в животном мире. Содержится в свободном виде в зеленых частях растений, семенах, различных фруктах и ягодах. В больших количествах содержится в винограде — отсюда происходит ее другое название — виноградный сахар.

Реактив Бенедикта: В колбу на 1 л наливают 700 мл дистиллированной воды, добавляют 173 г лимоннокислого натрия ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11 \text{H}_2\text{O}$), 100 г безводного (или 200 г кристаллического) углекислого натрия. Нагревают до растворения. Отдельно растворяют 17,3 г сернокислой меди в 100 мл воды. Смешивают оба раствора, непрерывно взбалтывая, и после охлаждения доливают до 1 л дистиллированной водой в мерной колбе.

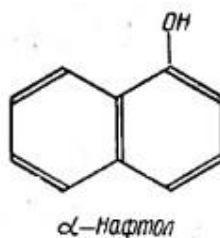


Ход работы

В пробирку наливают 5 мл реактива Бенедикта и прибавляют 0,5 мл 5% раствора глюкозы. Перемешивают и нагревают 1 мин на пламени или 5 мин на водяной бане. Раствор охлаждают и через 5 минут отмечают результаты. При наличии глюкозы раствор окрашивается в зеленый, желтый или красный цвет, на дне образуется осадок.

РЕАКЦИЯ МОЛИША

Пентозы с β -нафтолом в присутствии серной кислоты образуются продукты конденсации, имеющие окраску от красной до синей.

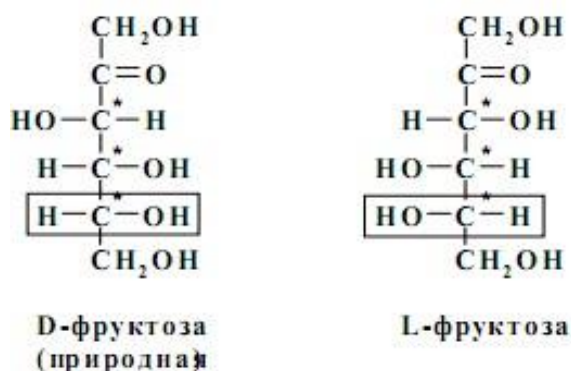


Ход работы

К 1 мл раствора рибозы добавляют 1-2 капли спиртового раствора β -нафтола, затем по стенке пробирки к смеси осторожно приливают 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы кислота не смешивалась с водным слоем. Появление темно-фиолетового кольца на границе двух слоев указывает на присутствие углевода или вещества, содержащего углевод.

ЦВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ С ВАНИЛИНОМ НА ФРУКТОЗУ

Эта реакция основана на конденсации продуктов расщепления фруктозы с ванилином, причем, в зависимости от концентрации сахара, получается слабо розовое и красное окрашивание.



Ванилиновый реагент готовят, растворяя 0,2 г ванилина в смеси 25 мл концентрированной соляной кислоты 75 мл 85% фосфорной кислоты. Такой раствор хранят в хорошо, закрытой темной склянке.

Ход работы

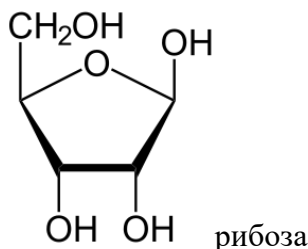
1 мл исследуемого раствора (1% фруктозы)- смешать с 5 мл ванилинового реагента и нагреть две минуты на водяной бане, после чего быстро охладить в ледяной воде.

РЕАКЦИЯ НА КАРБОНИЛЬНЫЕ ГРУППЫ

В одну пробирку наливают 2 мл 10% раствора формальдегида, а во вторую 2 мл 1% раствора глюкозы. Затем в обе пробирки добавляют по 2 мл фуксинсернистой кислоты и перемешивают. Через несколько минут в пробирке с формальдегидом появляется фиолетовое окрашивание, а раствор с глюкозой остается бесцветным. Почему глюкоза не дает реакцию на карбонильную группу?

РЕАКЦИЯ ПОДОБЕДОВА-МИЛЫША

Рибоза - моносахарид (альдопентоза), входит в состав РНК, динуклеотидов и др. биологически активных веществ.

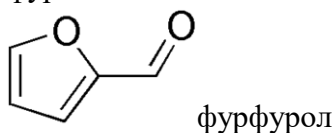


Ход работы

В 2 пробирки налить по 2 мл раствора рибозы. В 1-ю добавить 1 мл β -нафтола, во 2-ю 1 мл тимола. В обе пробирки осторожно по стенке добавить концентрированной серной кислоты. На границе раздела фаз жидкостей образуется красное кольцо.

РЕАКЦИЯ ПЕНТОЗ С УКСУСНОКИСЛЫМ АНИЛИНОМ

В ходе реакции образуется фурфурол.



Ход работы

В пробирку поместить несколько крупинок любой пентозы и прилить 2 мл раствора соляной кислоты (1:1). На фильтровальную бумагу нанести 2 капли анилина и 2 капли уксусной кислоты. Затем подносят эту бумажку у отверстию пробирки со смесью пентозы с

соляной кислотой и кипятят реакционную смесь. Через 1-2 минуты на бумаге появляется розово-красное пятно.

ПРОБА ГАЙНЕСА

Проба основана на свойстве глюкозы восстанавливать гидрат окиси меди в гидрат закиси меди (желтый цвет) или закись меди (красный цвет).

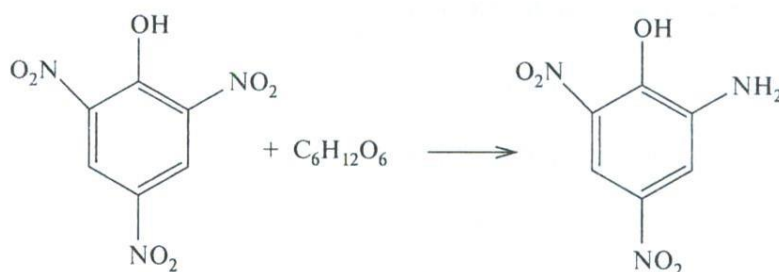
Реактив Гайнеса: 1) 13,3 г кристаллического сульфата меди растворяют в 400 мл воды; 2) 15 г глицерина разводят в 200 мл воды; 3) 50 г NaOH растворяют в 400 мл воды. Смешивают первый и третий растворы и тотчас приливают второй. Реактив стойкий.

Ход работы

К 1-2 мл реактива Гайнеса приливают 10 капель 5% раствора глюкозы, кипятят или ставят на кипящую водяную баню. В присутствии глюкозы появляется желтая или красная окраска жидкости и осадок.

РЕАКЦИЯ С ПИКРИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Раствор глюкозы при взаимодействии с пикриновой кислотой приобретает темнокрасное окрашивание вследствие превращения пикриновой кислоты в пикраминовую.



Ход работы

К 1 мл 1% раствора глюкозы приливают 0,5 мл 10% раствора гидроксида натрия и 1 мл раствора 1% пикриновой кислоты. Смесь нагревают на водяной бане. Что происходит?

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УГЛЕВОДОВ С КОНЦЕНТРИРОВАННЫМИ КИСЛОТАМИ

При действии концентрированных минеральных кислот молекулы углеводов постепенно расщепляются, образуя смесь различных продуктов: фурфурол и его производные и так называемые гуминовые вещества. Они окрашены в темно-бурый или черный цвет, плохо растворимы в воде и в условиях опыта выделяются на границе слоев жидкости.

Ход работы РЕАКЦИЯ С СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

Несколько крупинок глюкозы или фруктозы растворяют в 1-2 мл воды. К холодному раствору осторожно, по стенкам пробирки, добавляют равный объем концентрированной серной кислоты, стараясь не взболтать смесь. Серная кислота образует нижний, тяжелый, слой под раствором сахара. На границе этих слоев постепенно появляется темно-бурое кольцо. Если на холоду кольца не образуется, слегка подогревают содержимое пробирки, не взбалтывая.

РЕАКЦИЯ С СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

Небольшое количество глюкозы кипятят 20-30 сек с 2 мл концентрированной соляной кислоты, раствор охлаждают и добавляют воду до 2/3 высоты пробирки. Повторяют этот же опыт, заменив глюкозу фруктозой. Что наблюдаете?

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ САХАРОВ СО ЩЕЛОЧАМИ

Все сахара, имеющие свободную карбонильную группу, т.е. все моносахариды и некоторые дисахариды при нагревании в щелочном растворе легко осмоляются, образуя коричневый или черный раствор. Опыт одновременно проводят с несколькими различными сахарами, применяя готовые 5-10%-ные их растворы или растворяя 0,1-0,2 г сахара в 1-2 мл воды.

Ход работы

К 1-2 мл раствора исследуемого сахара (моносахариды (глюкоза, галактоза, фруктоза), дисахариды (сахароза, лактоза, мальтоза)) добавляют вдвое меньший объем концентрированного раствора щелочи, нагревают смесь до кипения и поддерживают в таком состоянии в течение 2-3 мин. Отметив изменение окраски раствора, если оно наблюдается, охлаждают жидкость и подкисляют ее разбавленной серной кислотой.

Окраска бледнеет и появляется отчетливый запах карамели (жженого сахара).

ОКИСЛЕНИЕ АЛЬДОЗЫ И КЕТОЗЫ ЙОДОМ

Опыт проводят параллельно с растворами (2%-ные растворы) глюкозы и фруктозы. К 3 мл каждого из растворов добавляют по 0,5 мл раствора йода и затем разбавленную щелочь (одинаковое число капель) до обесцвечивания смеси. Отмечают время добавления щелочи и ставят обе пробирки в штатив.

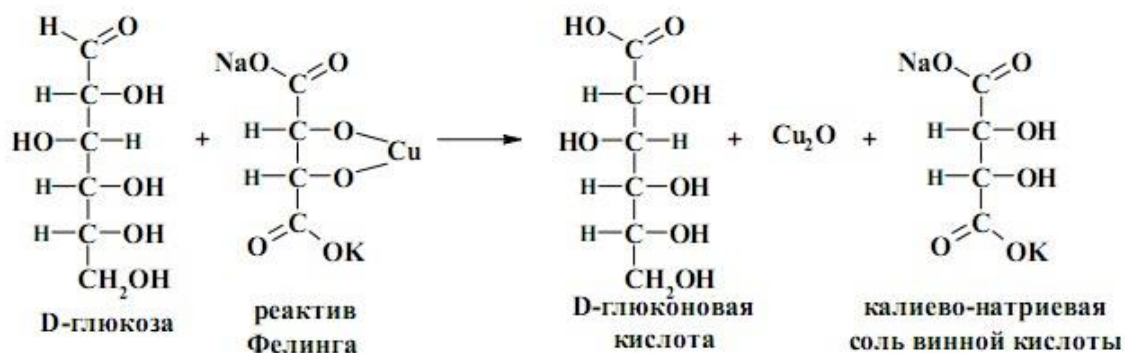
Через 7-8 минут приливают в обе пробирки по 0,5 мл разбавленной серной кислоты и сравнивают появляющуюся окраску.

ДЕЙСТВИЕ НА УГЛЕВОДЫ РЕАКТИВА ФЕЛИНГА

В присутствии восстановителей после нагревания осаждается оксид или гидроксид меди(I); цвет осадка от желтого до красного, иногда зеленого в зависимости от степени дисперсности и размера его частиц.

Аналогично реагируют кетозы (последние в щелочной среде легко изомеризуются в альдозы), многоатомные фенолы, фенилгидразин и др. органические производные гидразина, а также гидразиды карбоновых кислот.

Кетоны (за исключением кето-спиртов), одноатомные фенолы и большинство ароматических альдегидов не восстанавливают реактив Фелинга. Для обнаружения углеводов иногда используют так называемый нейтральный реактив Фелинга, который вместо NaOH содержит Na_2CO_3 .



При добавлении к осадку гидроксида меди (II) раствора, содержащего глюкозу, осадок сначала растворяется, затем при нагревании раствор приобретает окраску от бурой до жёлто-оранжевой.

Ход работы

Пронумеровать 3 пробирки. В 1-ю налить 1 мл раствора глюкозы, во 2-ю 1 мл раствора формалина, в 3-ю 1 мл воды. В каждую пробирку добавить 1 мл реактива Фелинга. Нагреть все пробирки и сделайте выводы.

РЕАКЦИЯ БИАЛЯ (ОТКРЫТИЕ ПЕНТОЗ)

Пентозы в кислой среде образуют фурфурол, который конденсируется с орцином в присутствии следов хлорида железа (III).

Ход работы

В 125 мл 25%-ной соляной кислоты растворяют 0,25 г орцина и добавляют 5 капель хлорида железа (III). Около 5 мл 0,1%-ного раствора пентозы смешивают с двойным объемом реактива, приготовленного описанным способом, и кипятят 1—2 мин. Появляется сине-зеленая окраска, которая извлекается амиловым спиртом. Глюкоза, галактоза и фруктоза дают коричневое окрашивание.

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ ВО ФРУКТАХ И ЯГОДАХ

С помощью реакции восстановления гидроксидом меди $\text{Cu}(\text{OH})_2$ проверяют наличие глюкозы в виноградном соке, меде, в спелых яблоках и т.п.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АРГИНИНА И ФРУКТОЗЫ

Аргинин взаимодействует с карбонильным кислородом молекулы фруктозы как Аминогруппой, так и гуанидиновой группой. При этом раствор в пробирке, где находилась смесь аргинина и фруктозы, приобретает красно-бурый оттенок. Реакцию ведут в растворе борной кислоты для предупреждения осмоления фруктозы, которое маскирует сахароаминную реакцию.

Ход работы

В две пробирки берут по 2 мл 5% раствора фруктозы в 2,5% растворе борной кислоты и прибавляют в первую из них 2 мл 3% раствора аргинина, а во вторую 2 мл дистиллированной воды. В третью пробирку берут 2 мл 3% раствора аргинина и 2 мл 2,5% раствора борной кислоты. Ставят пробирки на несколько минут в кипящую водяную баню. Отмечают различие во времени появления окраски и ее интенсивности в каждой из проб.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие моносахариды вам известны. Напишите их формулы.
 2. Перечислите виды изомерии моносахаридов.
 3. Укажите качественные реакции на открытие альдоз и кетоз. Напишите в структурном виде известные вам реакции на примере глюкозы.
 4. Переваривание углеводов, поступающих с продуктами питания
- Этапы и необходимость гидролитического расщепления углеводов в ЖКТ, предшествующая всасыванию углеводов в кишечнике.
 - Участие ферментов в гидролизе поли- и дисахаридов.
 - Последовательность действия отдельных ферментов в ЖКТ.
 - Причины отсутствия гидролиза клетчатки.
 - В какой форме всасываются углеводы в кишечнике? Механизм всасывания.
5. Характеристика процесса гликолиза по плану:
о локализация и условия протекания процесса, о последовательность реакций и ферменты, о конечные продукты, о участие адениловых нуклеотидов и энергетический

эффект, о реакции, сопряженные с потреблением АТФ, о реакции субстратного фосфорилирования, значение,
о гликолитическая оксидоредукция НАД⁺ и НАДН, значение. Энергетический выход гликолиза.

6. Характеристика процесса глюконеогенеза по плану:

о локализация и условия протекания реакций,
о субстраты (молочная кислота, глицерол, аминокислоты). Откуда поступают эти вещества? о последовательность реакций и ферменты, о реакции, сопряженные с потреблением ГТФ и АТФ,
о необратимые реакции, о значение при голодании и физической работе, о расход энергии для синтеза одной молекулы глюкозы.

7. Синтез глюкозы из аланина, аспартата и глутамата. При каких условиях и где протекают реакции? В чем их значение?

8. Гормональная регуляция гликолиза и глюконеогенеза. Роль инсулина, адреналина, кортизола, глюкагона. Ферменты, регулируемые этими гормонами. (Представить в виде таблицы)

9. Аллостерическая регуляция гликолиза и глюконеогенеза, роль АТФ, АДФ, АМФ, цитрата, жирных кислот, глюкозо-6-фосфата, фруктозо-6-фосфата, фруктозо-1,6дифосфата, ацетил-S-КоА. Регулируемые ферменты. (Представить в виде таблицы)

10. Глюкозо-лактатный цикл (цикл Кори), его значение при физической работе. Источники молочной кислоты в организме.

11. Глюкозо-аланиновый цикл, его значение при физической работе и голодании.

12. Энергетический эффект окисления глюкозы в анаэробных условиях. Сравнение энергетического эффекта анаэробного окисления глюкозы и распада гликогена до лактата.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 16. МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть процессы катаболизма и анаболизма глюкозы.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ПО МЕТОДУ ВОЛЬГЕМУТА

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

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

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

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

Данные занести в таблицу.

Таблица Определение активности амилазы

пробирки	Разведение слюны	Окрашивание йодом	Активность амилазы
1	1:10		
2	1:20		
3	1:40		
4	1:80		
5	1:160		
6	1:320		
7	1:640		
8	1:1280		
9	1:2560		
10	1:5120		

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

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

Например, если с красно-бурой окраской жидкость была отмечена в 5 пробирке, где слюна разбавлена в 160 раз и куда было прибавлено 2 мл 0,1% раствора крахмала, то 1 мл неразбавленной слюны расщепил бы в 160 раз больше 0,1% раствора крахмала: 1/160 мл слюны расщепляет 2 мл — 0,1% раствора крахмала, 1мл слюны расщепляет x мл 0,1% раствора крахмала, т. е. $x = 2 \cdot 1 : 1/160 = 320$ мл 0,1% раствора крахмала. Следовательно, 1 мл неразбавленной слюны расщепляет за 30 минут при 37 °С 320 мл 0,1% раствора крахмала.

Условно это принимают за 320 единиц α -амилазы по Вольгемуту. Результат принято изображать следующим образом: $A_{37^\circ/30'} = 320$ ед.

КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА

Распад крахмала происходит до стадии образования декстринов. **Ход работы**

В большую пробирку с пипеткой помещают 1 мл 0,1 % раствора крахмала и 20 капель 2 н раствора серной кислоты. Нагреть на водяной бане в течение 10 мин, отбирая пипеткой каждые 2 мин в маленькие пробирки 3 - 4 капли гидролизата и добавляя в них по 1 капле йода. Обратить внимание на изменение окраски гидролизата с йодом в ходе гидролиза. К

последней пробе в большой пробирке добавить 2 капли 2 н раствора сульфата меди, а затем добавлять по каплям 2 н раствора гидроксида натрия до образования растворимого темносинего соединения. Далее полученный раствор нагреть (реакция Троммера). Появляется желто-красное окрашивание (положительная реакция Троммера). По результатам реакций сделать заключение о строении крахмала.

ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА ФЕРМЕНТАМИ ЖКТ

Различные ферменты в разной степени гидролизуют крахмал. **Ход работы**

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

Таблица. Гидролиз крахмала

	Добавляемая жидкость	Окраска с йодом, мин							Реакция Фелинга
		0	5	10	15	20	25	30	
1	Вода								
2	Пепсин								
3	Панкреатин								

ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА альфа-АМИЛАЗОЙ СЛЮНЫ

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

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

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

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

Через несколько секунд (5—7) из контрольного и основного опытов отливают по несколько капель жидкости в пробирки с раствором йода в йодистом калии и наблюдают окрашивание. Отбор проб и реакцию с раствором йода производят несколько раз через короткие интервалы. Сначала синее окрашивание будет появляться от проб, взятых из обеих пробирок; затем из пробирки, где есть амилаза, проба жидкости начнет давать с йодом красно-бурое окрашивание. Вскоре отмечают, что пробы жидкости из пробирки слюной окрашивания с йодом более не дают. Эти различные окраски от йода указывают на то, что

идет постепенный гидролиз крахмала с образованием декстринов. Когда последняя проба жидкости, взятая из пробирки со слюной, не изменит желтого цвета раствора йода, гидролиз считают завершенным и записывают время его окончания.

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

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

Рекомендации к составлению протокола

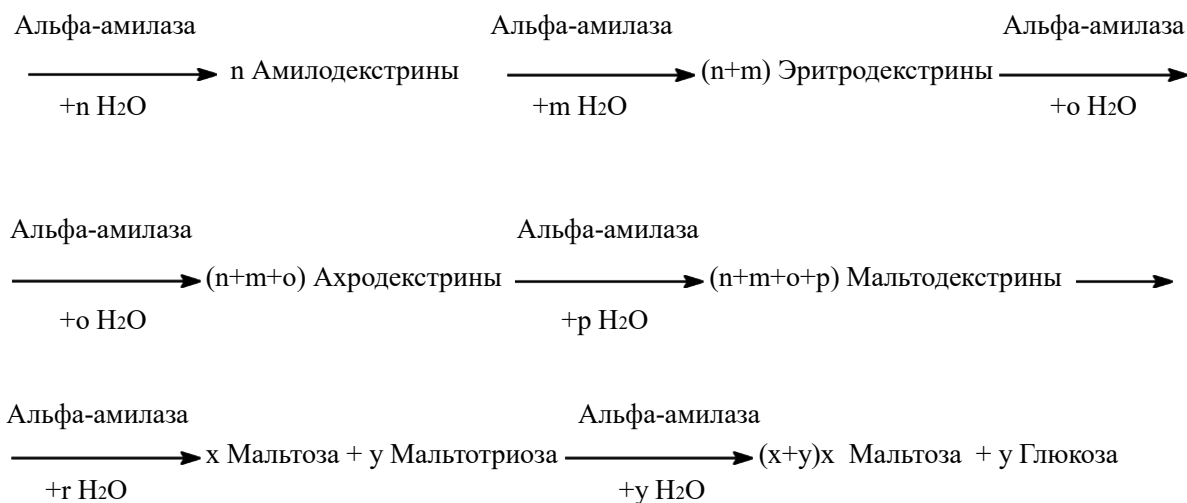
Результаты работы записать в таблицу. В выводах обратить внимание на то, что гидролиз крахмала под влиянием α -амилазы идет постепенно, через промежуточные продукты, при температуре тела или близкой к ней, в течение короткого времени. Обосновать, почему конечные продукты гидролиза дают положительную реакцию Троммера.

Таблица. Гидролиз крахмала альфа-амилазой слюны

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

ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕПЕНИ ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА

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



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

Таблица. Продукты гидролиза крахмала

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

Ход работы

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

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

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

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

ГИДРОЛИЗ КЛЕТЧАТКИ ДО ГЛЮКОЗЫ

Одним из характерных и практически важных свойств клетчатки как представителя полисахаридов является ее гидролиз до более простых продуктов.

Конечным продуктом гидролиза клетчатки, как и крахмала, является глюкоза:
 $(C_6H_{12}O_6)_n + nH_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6$ Гидролиз клетчатки также катализируется минеральными кислотами.

В настоящее время в промышленности гидролизом клетчатки (преимущественно древесины) и последующим сбраживанием образующейся глюкозы получают этиловый спирт и другие продукты.

Опыты по гидролизу могут ставиться с различной полнотой: от констатации наличия глюкозы в гидролизате до извлечения глюкозы в твердом виде.

Ход работы

а) В ступке смачивают кусочек чистой фильтровальной бумаги или ваты концентрированной серной кислотой и растирают пестиком. Полученный раствор переносят в демонстрационную пробирку или химический стакан с небольшим количеством воды (2-3 мл) и кипятят в течение 5 мин. После этого часть раствора нейтрализуют щелочью и нагревают с фелинговой жидкостью. Образование красного оксида меди (I) указывает на появление глюкозы.

Параллельно можно провести контрольный опыт: кипятить столько же времени фильтровальную бумагу или вату с водой без кислоты. При последующем нагревании этой жидкости с фелинговым раствором осадок оксида меди (I) не образуется.

б) Для демонстрации процесса гидролиза клетчатки можно воспользоваться древесными опилками. Этот опыт будет поучительнее предыдущего, так как с большим приближением иллюстрирует современное гидролизное производство.

1—2 г древесных опилок смачивают в химическом стакане водой, прибавляют 2—3 мл концентрированной серной кислоты, затем 30—50 мл воды и кипятят 8—10 мин. После этого часть еще горячего раствора фильтруют через складчатый фильтр, фильтрат нейтрализуют щелочью и нагревают с фелинговым раствором. Образуется красный оксид меди (I).

Параллельно может быть поставлен опыт нагревания опилок с водой без кислоты. Получающийся в этом случае раствор не дает с фелинговой жидкостью оксид меди (I).

в) К 1-1,5 г древесных опилок в колбе прибавляют 14 мл серной кислоты (6 мл воды и 8 мл концентрированной серной кислоты). Смесь встряхивают примерно в течение 10 мин, одновременно прогревая ее немного в пламени спиртовки. Затем к ней приливают 150—200 мл воды, закрывают колбу пробкой с обратным холодильником и кипятят в течение 10-15 мин.

Раствор фильтруют в большую коническую колбу. К фильтрату добавляют небольшими порциями мелко измельченный мел, все время энергично круговыми движениями перемешивая смесь до тех пор, пока не прекратится выделение углекислого газа (шипение) и лакмусовая бумажка не покажет, что серная кислота нейтрализована:
$$\text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CaSO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$$

Раствор фильтруют от обильного осадка сульфата кальция. С помощью фелингова раствора убеждаются в наличии глюкозы в фильтрате. Упаривают раствор в фарфоровой чашке на водяной бане до небольшого объема жидкости.

Сконцентрированный раствор глюкозы выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане. При этом следят за тем, чтобы выделяющийся сахар по возможности не подгорал. На дне чашки по мере испарения воды образуется немного глюкозы, обычно светло-желтого цвета (вследствие частичного разложения органических примесей). Ощущается запах горелого сахара, так как при выпаривании без вакуума не удастся избежать частичного разложения. Растворив полученный продукт в воде и добавив дрожжей, в соответствующих условиях можно наблюдать реакцию брожения (по выделению углекислого газа), что подтверждает образование сахара из древесины.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Гликолиз и гликогенолиз. Уравнения реакций.
2. Энергетический эффект распада глюкозы.
3. Пентозный цикл обмена углеводов.
4. Синтез глюкозы из неуглеводных компонентов?
5. Цикл трикарбоновых кислот.
6. Анаэробный путь обмена углеводов.
7. Обмен пировиноградной кислоты.
8. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты.
9. Химизм спиртового и молочнокислого брожения.
10. Особенности всасывания углеводов – активный транспорт и облегченная диффузия. Роль белков семейства ГЛЮТ в трансмембранном переносе глюкозы.
11. Этапы синтеза гликогена в тканях (формулы). Ферменты.
12. Этапы распада гликогена в тканях (схема). Ферменты.

13. Значение гликогена для организма. Регуляция обмена гликогена. □ В каких органах преимущественно откладывается гликоген?
- Почему резервной формой углеводов является гликоген, а не глюкоза?
 - Как называется процесс распада гликогена?
 - При каких условиях происходит депонирование глюкозы в печени?
 - Как происходит мобилизация гликогена в покое, при умеренных нагрузках и экстремальных нагрузках?
 - Гликогенозы. Общее понятие. Краткая характеристика болезни Гирке, болезни Мак-Ардля, генерализованного гликогеноза, агликогеноза.
14. Пентозофосфатный путь превращения гликогена, где протекает и его биологическое значение.
- Написать реакции окислительной части ПФП, указать ферменты, коферменты.
 - Написать схему реакций неокислительной части ПФП.
 - В каких процессах организма используется НАДФН+Н⁺, полученный в ПФП превращения глюкозы?
15. Метаболизм этилового спирта в печени при участии алкогольдегидрогеназы и ацетальдегиддегидрогеназы, последовательность реакций, конечные продукты.
16. Влияние этилового алкоголя на обмен углеводов в организме человека.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 17. МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть методы определения глюкозы в крови в биохимической лаборатории

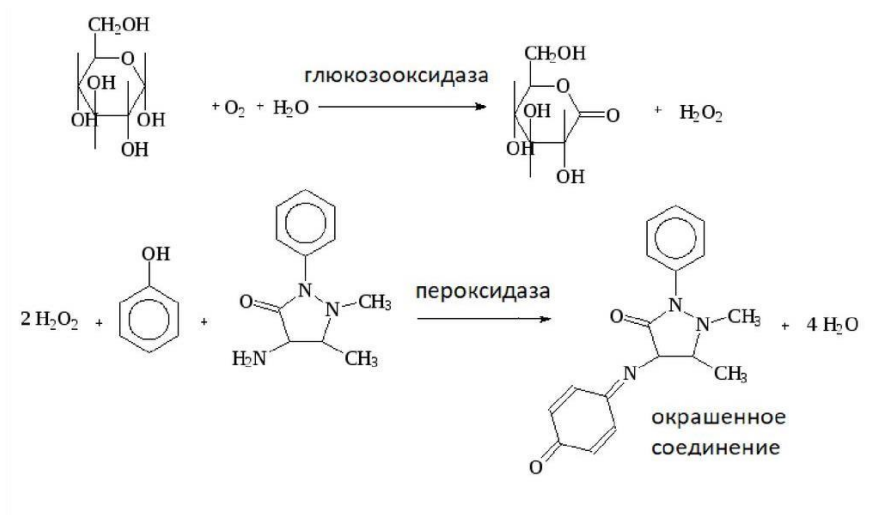
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Более 90 % всех растворимых низкомолекулярных углеводов крови приходится на глюкозу. Глюкоза распределена практически равномерно между плазмой и эритроцитами, поэтому с равным успехом может определяться как в цельной крови, так и в плазме или сыворотке.

В норме концентрация глюкозы колеблется в пределах 3,3 – 6,0 ммоль/л. Часто принимают, что в венозной крови содержится на 0,5 ммоль/л глюкозы меньше, чем в капиллярной крови (разница условная). Повышение показателя (гипергликемия) имеет место при диабете, гипертиреозе, аденокортицизме (гиперфункция коры надпочечников), гиперпитуитаризме, иногда - при заболеваниях печени. Снижение уровня глюкозы (гипогликемия) наблюдается при гиперинсулизме, недостаточности функции надпочечников, гипопитуитаризме, печеночной недостаточности, функциональной гипогликемии, при приеме гипогликемических препаратов.

Принцип метода:

Глюкоза с помощью глюкозооксидазы окисляется до глюконовой кислоты с образованием пероксида водорода. Пероксид водорода в присутствии хлорфенола при участии фермента пероксидазы окисляет краситель 4-аминоантипирин, превращая его в хинонимин, окрашенный продукт розово-малинового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию глюкозы и определяется фотоколориметрически.



Материал исследования Сыворотка крови.

Реактивы

1) Рабочий р-р, содержащий хлорфенол, глюкозооксидазу, пероксидазу, 4-аминоантипирин в калиево-фосфатном буфере.

Стандартный р-р глюкозы, 5,5 ммоль/л.

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Стандарт, мл
Сыворотка крови	0,02	—
Стандартный раствор глюкозы	—	0,02

Расчет

Концентрация глюкозы, ммоль/л = ССТ, ст Еоп Е

где ЕОП – оптическая плотность опытной пробы, ЕСТ – оптическая плотность стандартной пробы, ССТ – концентрация стандартного раствора.

Нормальные величины		
Сыворотка крови (натошак)	взрослые	3,5–6,0 ммоль/л

Оформление работы

Указывают принцип метода, ход работы, нормальные величины и результаты исследования, отмечают клинико-диагностическое значение показателя и делают выводы о возможной патологии.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Количественное определение содержания глюкозы в сыворотке крови и моче. Принцип метода. Нормальные показатели. Клинико-диагностическое значение.
2. Заполнить таблицу:

Биохимические основы заболеваний, обусловленных нарушением углеводного обмена

Название заболевания	Причина (■) и биохимические последствия (•)	Симптоматика	Рекомендуемые меры (лечение)
А. 1) Постоянная непереносимость лактозы у детей. А.2) Временная непереносимость лактозы. А.3) Непереносимость лактозы у взрослых (у 20-80% взрослых: негров, индейцев, чукчей) А.4) Непереносимость сахарозы Б.1) Галактоземия Б.2) Фруктозурия Б.3) Врожденная непереносимость фруктозы В.1) Гликогенозы - Болезнь Гирке - Болезнь Херса - -... В.2) Агликогеноз Г.) Гликозидозы Лизосомные болезни накопления			

- Каковы механизмы гормональной регуляции углеводного обмена (инсулин, адреналин, глюкагон, глюкокортикоиды, кортизол)?
- Гипергликемии (физиологические, патологические; внегормональные, гормональные). Гипогликемии (внегормональные, гормональные).
- Какова роль печени в углеводном обмене?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 18. МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ ТЕСТ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ГЛЮКОЗЕ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть методы определения глюкозы в крови в биохимической лаборатории

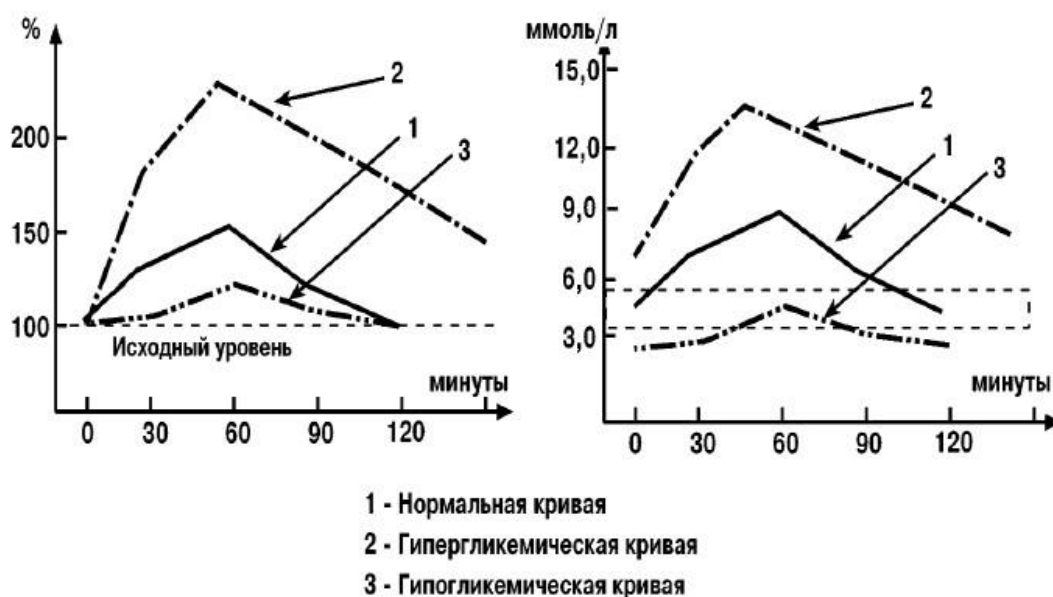
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Тест толерантности к глюкозе (проба с сахарной нагрузкой) является информативным тестом для выявления сахарного диабета на ранних этапах, нарушений гликогенообразовательной функции печени и оценки состояния тонкого кишечника.

Тест толерантности к глюкозе основан на определении концентрации глюкозы в крови через определенные промежутки времени после приема глюкозы внутрь. Концентрация глюкозы в крови определяется глюкозооксидазным методом. Выделяют следующие типы гликемических кривых:

Тип кривой	Исходное содержание глюкозы	Максимальный подъем	Гипогликемическая фаза	Содержание глюкозы к концу 2 часа
Нормальная	Норма	Через 1 час	Через 2 часа или отсутствует	Исходный уровень
Гипергликемическая	Гипергликемия	Через 1,0–1,5 часа	Нет	Исходного уровня не достигает
Гипогликемическая	Гипогликемия	1 час	Нет	Исходный уровень

Результаты обследования обычно выражают графически, при этом их можно отражать в относительных или абсолютных единицах:



У здорового человека уровень глюкозы в крови после нагрузки глюкозой изменяется следующим образом:

1. Через 30 минут после приема глюкозы наблюдается увеличение содержания глюкозы в крови. Скорость повышения концентрации глюкозы в течение первых 30 минут (крутизна подъема) отражает силу рефлекторного раздражения окончаний симпатических нервов при попадании глюкозы в пищеварительный тракт и эффективность всасывания глюкозы в ЖКТ.

2. К 60 минуте наблюдается максимальное повышение концентрации глюкозы в крови – на 50–75% выше исходного. Промежуток от 30 до 60 минут связан с быстротой всасывания глюкозы, с общим состоянием печени и с ее гликогенсинтезирующей функцией.

3. Через 90–120 минут содержание глюкозы в крови возвращается к норме. Снижение уровня глюкозы в крови в этом периоде объясняется усиленным выделением инсулина из поджелудочной железы. Степень снижения отражает функциональную активность парасимпатического отдела нервной системы, гликогенсинтезирующую функцию печени, чувствительность к инсулину мышечной и жировой тканей. В ряде случаев концентрация глюкозы может опускаться ниже исходной величины, так как обычно выделяется больше инсулина, чем это требуется для восстановления нормального уровня глюкозы в крови, что и приводит к небольшой гипогликемии.

У здорового человека нагрузка глюкозой не вызывает глюкозурию.

Клинико-диагностическое значение

Гипергликемические кривые отмечаются при повреждениях паренхимы печени, заболеваниях центральной нервной системы, скрытых формах сахарного диабета, гиперфункции щитовидной железы и коры надпочечников, инфекционных заболеваниях (ревматизм, дифтерия, тиф, дизентерия, сепсис, бронхопневмония), панкреатите.

Гипогликемические кривые наблюдаются при аденоме островков Лангерганса, гипотиреозе, аддисоновой болезни, энцефалите, заболеваниях кишечника, дисбактериозах.

ТЕСТ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ГЛЮКОЗЕ

В **клинико-диагностических лабораториях** исследуют пробы капиллярной крови, взятой натощак и через определенные промежутки времени после нагрузки глюкозой.

Тест проводят следующим образом:

У обследуемого натощак берут кровь из пальца, затем дают глюкозу с теплой водой или слабым чаем. Детям в возрасте от 1,5 до 3 лет рекомендуется давать глюкозу из расчета 2,0 г на 1 кг массы тела, от 3 до 12 лет – 1,75 г/кг, после 12 лет – 1,25 г/кг. Взрослые принимают глюкозу в количестве 1,0–1,5 г/кг. Через 30, 60, 90 и 120 минут после приема глюкозы повторно берутся пробы крови. Далее определяют концентрацию глюкозы в пробах.

На **практическом занятии** метод сахарной нагрузки проводится с модельными образцами сыворотки крови, взятыми до глюкозной нагрузки, через 30, 60 и 120 минут после нагрузки. Во всех взятых пробах определяют концентрацию глюкозы глюкозооксидазным методом

Материал исследования

Модельные образцы сыворотки крови, содержащие разные концентрации глюкозы.

Реактивы

1) Рабочий р-р, содержащий хлорфенол, глюкозооксидазу, пероксидазу, 4-миноантипирин в калиево-фосфатном буфере.

Стандартный р-р глюкозы, 5,5 ммоль/л.

Определение концентрации глюкозы

Опытные пробы, мл		Стандартная проба, мл	
до нагрузки		время после нагрузки	
30 мин	60 мин	120 мин	

1	2	3	4	5
Рабочий раствор	2,0	2,0	2,0	2,0
Сыворотка крови	0,02	0,02	0,02	0,02
Стандартный раствор глюкозы	—	—	—	0,02
Содержимое пробирок перемешивают, инкубируют при 37С в течение 15 минут. Измеряют оптическую плотность опытных и стандартной пробы при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр).				

Расчет

В каждом образце крови рассчитывают концентрацию глюкозы по формуле: Концентрация глюкозы, ммоль/л = ССТ, ст Еоп Е

где ЕОП – оптическая плотность опытной пробы, ЕСТ – оптическая плотность стандартной пробы, ССТ – концентрация стандартного раствора.

Нормальные величины До нагрузки (натощак)	3,5–6,0 ммоль/л	100%
Через 60 минут	5,3–9,6 ммоль/л	150–175%
Через 120 минут	ниже 5,3 ммоль/л	около 100%

Оформление работы

Записывают принцип построения гликемических кривых, отмечают полученные значения, строят по ним гликемическую кривую в абсолютных и относительных единицах.

Номер пробы	Концентрация глюкозы в крови	
до нагрузки	Время после нагрузки	
30 минут	60 минут	120 минут

Отмечают клинико-диагностическое значение метода. Делают вывод о возможных причинах изменения формы гликемических кривых.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Нарушения углеводного обмена при сахарном диабете
2. Строение и функции инсулина. Механизм действия инсулина. Диагностические аспекты исследования С-пептида.
3. Как влияет инсулин в норме на обменные процессы в организме и как меняется его действие при сахарном диабете?
4. Перечислите основные симптомы сахарного диабета.
5. Каковы причины возникновения гипергликемии, глюкозурии, полиурии при сахарном диабете?

6. Каковы причины возникновения кетонемии и кетонурии при сахарном диабете?
7. Что такое "кетоз"? Когда и почему он возникает, к чему может привести?

МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ОБМЕН ЛИПИДОВ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 19. ЛИПИДЫ. ВЫДЕЛЕНИЕ ЦЕЛЬ

ЗАНЯТИЯ: Научиться выделять и идентифицировать липиды.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА В ЖЕЛТКЕ КУРИНОГО ЯЙЦА

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

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

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЛЕЦИТИН С ХЛОРИДОМ КАДМИЯ

Эту реакцию не дают растворы холестерина и растительных масел. **Ход**

работы

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

ГИДРОЛИЗ ЛЕЦИТИНОВ И ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА

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

ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛИНА

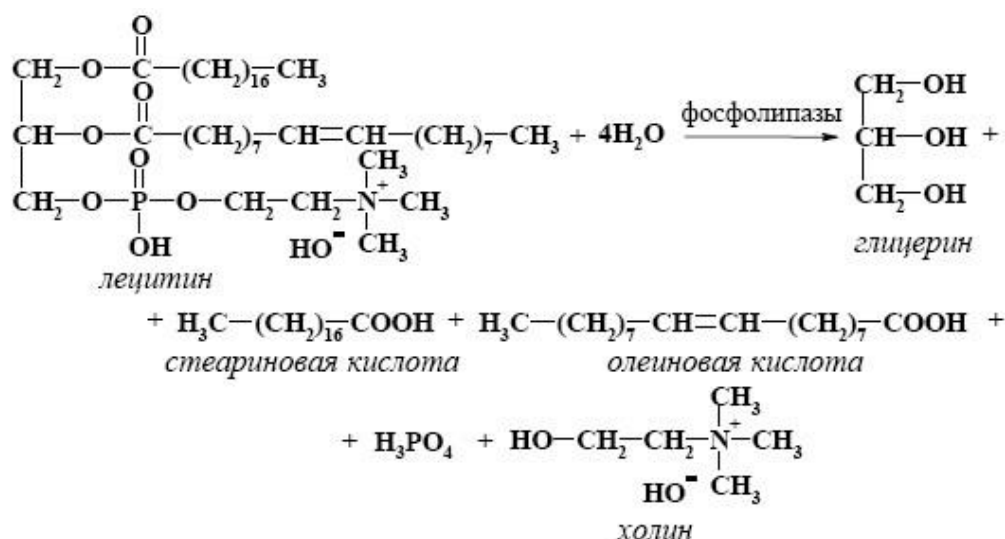
К 1–2 мл спиртового экстракта желтка добавляют равный объем 10 %-го раствора NaOH и кипятят 5–10 мин. При нагревании ощущается запах селедочного рассола, характерный для триметиламина, образующегося из холина.

ОБНАРУЖЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

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

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИЦЕРИНА

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

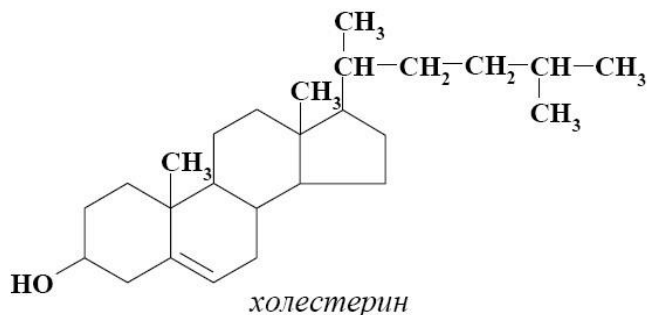


ОБНАРУЖЕНИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

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

ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В ТКАНИ МОЗГА

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



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

Ход работы ВЫДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА

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

РЕАКЦИЯ САЛЬКОВСКОГО

К 2–3 мл хлороформного раствора холестерина приливают 2–3 мл концентрированной серной кислоты и жидкость осторожно перемешивают. Когда жидкость отстаивается,

верхний хлороформный слой оказывается окрашенным в красный цвет, нижний - в желтокрасный цвет с зеленой флуоресценцией.

РЕАКЦИЯ ЛИБЕРМАННА—БУРХАРДТА

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные свойства лецитина.
2. С помощью каких реакций можно обнаружить холестерин?
3. Определение понятия "липиды".
4. Биологическая роль липидов.
5. На чем основана классификация липидов?
6. От чего зависит жирнокислотный состав ацилглицеринов?
7. Простые липиды - жиры, воски и стероиды, общая характеристика.
8. Сложные липиды - фосфолипиды и гликолипиды, характеристика.
9. Триглицериды и их структура и разнообразие в природе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 20. ЛИПИДЫ, ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ

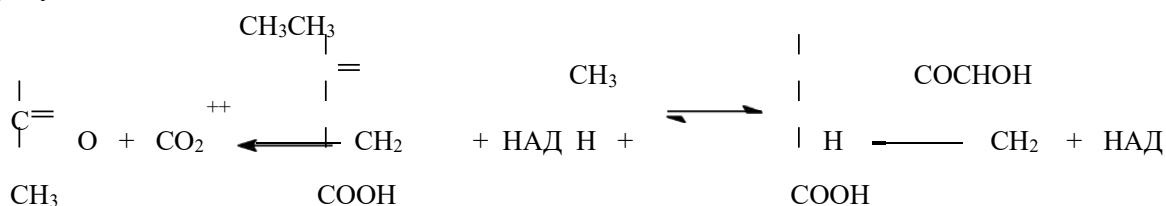
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить химические свойства липидов

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Липиды выполняют в организме двоякую биологическую роль – источника энергии и составной части клетки, фосфолипиды участвуют в построении клеточных мембран. Знание обмена липидов необходимо для понимания биохимических основ ряда заболеваний.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА

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



ацетон

ацетоуксусная кислота

β -оксимасляная кислота

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

Ход работы

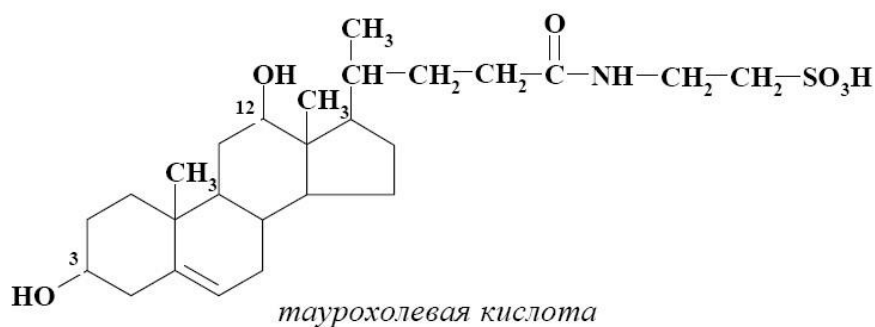
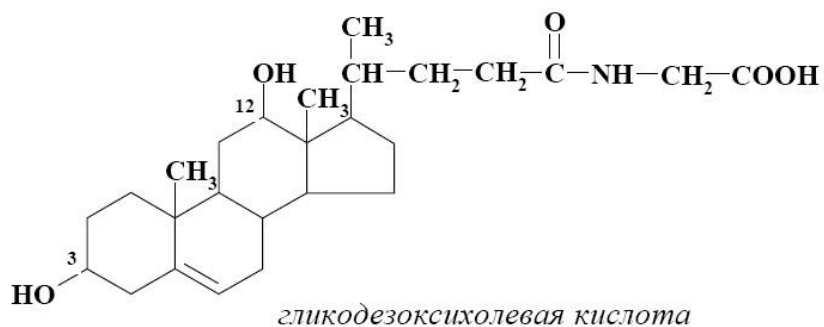
На стекло наносят 0,1-0,2 г порошка нитропруссид натрия, прибавляют 2-3 капли молока и выдерживают 5 минут. Появление розово-фиолетовой окраски указывает на положительный результат. Минимальный уровень кетоновых тел, дающий положительную реакцию, равен 10 мг/100 мл (10 мг%). Скорость развития окраски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

содержится 30-50 мг%; развитие слабой окраски через 3 минуты свидетельствует о присутствии 10-30 мг% кетоновых тел.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ (РЕАКЦИЯ ПЕТЕНКОФФЕРА)

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

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



Ход работы

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

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. □- и □-окисление высших жирных кислот.
2. Кетоновые тела, их значение, пути образования.

3. Окисление жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов. Перекисные окисления липидов.
4. Реакции образования и утилизации кетоновых тел, их биологическая роль.
5. Механизм избыточного накопления кетоновых тел при голодании и сахарном диабете. Кетоацидоз.
6. Механизм биосинтеза высших жирных кислот.
7. Механизм биосинтеза кефалина, роль ЦДФ в этом процессе.
8. Механизм биосинтеза лецитина, роль ЦДФ в этом процессе.
9. Механизм биосинтеза триглицеридов.
10. Обмен ацетил-КоА.
11. Обмен триглицеридов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 21. МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть процессы обмена липидов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

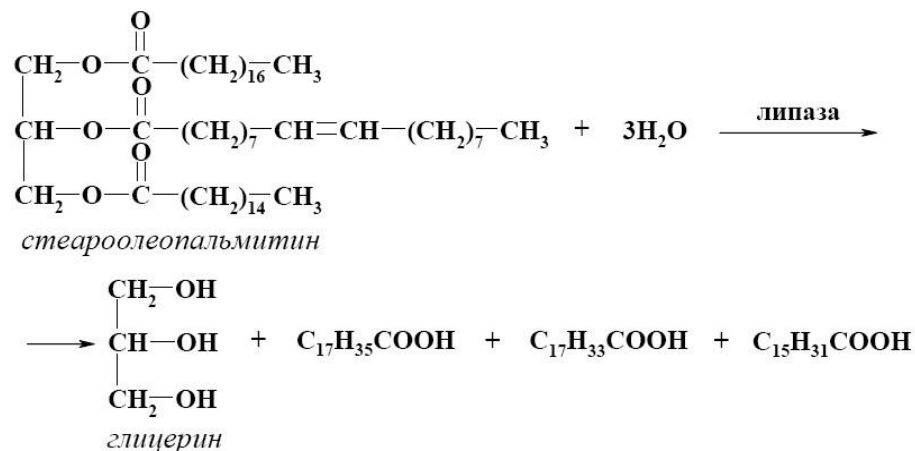
Слюна не содержит расщепляющих липиды ферментов. В полости рта жиры не подвергаются никаким изменениям. В желудочном соке содержится желудочная липаза, однако ее роль в гидролизе пищевых триглицеридов у взрослых невелика, ее содержание крайне низкое и pH желудочного сока далек от оптимума действия этого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

1. ПЕРЕВАРИВАНИЕ ЖИРОВ ЛИПАЗОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

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

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

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



Гидролиз жиров удобнее всего наблюдать при помощи липазы панкреатического сока. В качестве субстрата лучше всего взять молоко, жир которого, находясь в эмульгированном

состоянии, быстро расщепляется на глицерин и жирные кислоты. Последние можно оттитровать щелочью.

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

Очищают поджелудочную железу от жира, измельчают и перемешивают ее. Помещают около 5 г измельченной железы в ступку и добавляют около 10 мл водноглицеринового раствора. С помощью пестика тщательно растирают содержимое ступки в течение 5 минут. Отфильтровывают смесь в пробирку. Фильтрацию удобно вести через полотно; для одного опыта достаточно отфильтровывать 4 мл вытяжки.

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

Отмеривают с помощью цилиндра в 3 колбы (1, 2, 3) по 25 мл молока.

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

Отмеривают с помощью пипетки в три другие колбы (4, 5, 6) по 5 мл дистиллированной воды и добавляют в каждую колбу по несколько капель фенолфталеина.

Добавляют, по возможности одновременно, в колбу 1 - 2 мл вытяжки липазы, активированной желчью, в колбу 2 – 2 мл не активированной вытяжки липазы, в колбу 3 - 2 мл разведенного в 5 раз раствора желчи.

Быстро и тщательно перемешивают содержимое каждой колбы.

Быстро отмеривают с помощью пипетки из колбы 1 (с активированной липазой) 5 мл жидкости переносят ее в колбу 4 (с водой и фенолфталеином), из колбы 2 (с не активированной липазой) 5 мл жидкости и переносят ее в колбу 5 (с водой и фенолфталеином), из колбы 3 (с разведенным раствором желчи) 5 мл жидкости и переносят ее в колбу 6 (также, с водой и фенолфталеином).

Колбы 1, 2, 3 вновь ставят в термостат при 37 °С. В процессе гидролитического расщепления жира происходит образование жирных кислот, которые оттитровывают затем 0,1 н раствором NaOH. Содержимое колб 4, 5, 6 оттитровывают 0,1 н щелочью до слабозеленого окрашивания при непрерывном помешивании.

Еще три раза через каждые 15 минут берут из колбы 1, колбы 2 и колбы 3 пробы по 5 мл и помещают соответственно в чистые колбы 4, 5, 6, в которые предварительно должно быть отмерено по 5 мл дистиллированной воды и добавлено по несколько капель фенолфталеина. Отмеренные пробы титруют по вышеуказанному методу.

Сравнивают объемы 0,1 нормальной щелочи, пошедшие на титрование всех трех проб из колбы 2, всех трех проб из колбы 3 и 4, откладывая их по времени и вычерчивают кривые титрования.

По окончании титрования записать результаты в таблицу.

Таблица. Переваривание жиров липазой поджелудочного сока

п	Добавленное вещество, мл					Продолжительность опыта, мин.				
	Расход NaOH, Молоко	Фенол фталеин	Вода	Панкреатин	Желчь					
						15	30	45	60	Всего

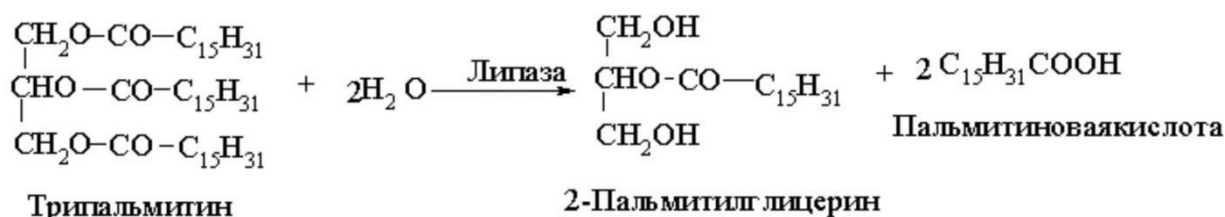
Так как гидролиз идет постепенно, количество освобождающихся инертных кислот нарастает по времени.

Изобразить графически динамику расщепления жира липазой для каждой пробы, откладывая на оси абсцисс время в минутах, а на оси ординат количество 0,1 н. раствора NaOH (в мл), израсходованного на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данное время (15, 30, 45, 60 минут).

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

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЛИПАЗЫ НА ЛИПИДЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В тонкой кишке происходит гидролиз липидов, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой. Существует несколько типов панкреатических липаз. Одни из них специфичны в отношении эфирных связей в β -положении триацилглицерина, а другие гидролизуют связи в α -положении. Полный гидролиз происходит поэтапно: сначала ферментами атакуются α - и β -связи, а затем более медленно гидролизуются β -моноацилглицерины. Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, а также ди- и моноацилглицерины) всасываются и стенки кишечника.



Ход работы

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

Таблица. Исследование действия липазы

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

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

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

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

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

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

На основании полученных данных строят график, где по оси абсцисс откладывают время (в минусах), а по оси ординат - активность липазы, выраженную объемом 0,01 моль/л раствора гидроксида натрия в мл, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени.

V NaOH,

мл



В тетрадь записать сделанные выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Переваривание липидов.
2. Роль желчи в переваривании липидов и всасывании образующихся продуктов.
3. Синтез липидов в энтероцитах, транспорт в составе хиломикронов и депонирование в жировой ткани.
4. Состав и строение транспортных липопротеинов крови.
5. Катаболизм жирных кислот.
6. Фосфолипиды, представители, биологическая роль.
7. Распад фосфолипидов, образование эйкозаноидов, (простагландины, лейкотриены, простагланцины, тромбоксаны), их биороль.
8. Роль липотропных веществ.
9. Жировое перерождение печени.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 22. МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть процессы обмена липидов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Присутствие желчных кислот можно обнаружить реакцией Петтенкофера. Желчные кислоты дают пурпурное окрашивание с оксиметилфуролом, образующимся из фруктозы в присутствии концентрированной серной кислоты.

Кетоновые тела – общее название для продуктов обмена липидов у животных: ацетоуксусной, оксимасляной кислот и ацетона. Ацетон и ацетоуксусная кислота образуют с нитропруссидом натрия в щелочной среде комплексное соединение розово-фиолетовой окраски. Интенсивность окраски зависит от количества кетоновых тел в реакции.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ

Присутствие желчных кислот можно обнаружить реакцией Петтенкофера. Желчные кислоты дают пурпурное окрашивание с оксиметилфуролом, образующимся из фруктозы в присутствии концентрированной серной кислоты.

Ход работы

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

ЖЕЛЧЬ И ЕЕ РОЛЬ В ПРОЦЕССЕ ПИЩЕВАРЕНИЯ

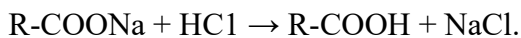
Материалы и оборудование. Штатив с пробирками, фарфоровая тарелка, маленькие воронки, желчь, жидкий растительный жир, фильтровальная бумага. **Подготовка и проведение опыта.**

Эмульгирование жиров желчью. Налить в пробирку немного растительного масла, добавить равный объем желчи, закрыть пробирку пробкой и взболтать. В результате взбалтывания образуется белое «молоко» – жировая эмульсия. Поставить пробирку в штатив на 10-15 мин и убедиться, что эмульсия является стойкой, так как границы между слоями не намечается. Для контроля то же самое проделать с растительным маслом при добавлении к нему воды. **Влияние желчи на фильтрацию жира.**

В небольшие воронки вложить бумажные фильтры. Один фильтр смочить желчью, другой - водой. Поставить воронки в пробирки, находящиеся в штативе, и налить в каждую немного растительного масла. Масло быстро профильтруется через фильтр смоченный желчью, и почти не пройдет через фильтр, смоченный водой. Записать ход опыта и сделать соответствующие выводы

РОЛЬ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ТРАНСПОРТЕ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В КРОВИ

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



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

Ход работы

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

Рекомендации к составлению протокола

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Биосинтез холестерина.
2. Гормональная регуляция синтеза холестерина.
3. Атеросклероз как следствие нарушений метаболизма холестерина и липопротеинов.
4. Механизм развития желчнокаменной болезни.
5. Кетоновые тела.
6. Пути использования кетоновых тел.
7. Биосинтез жирных кислот.
8. Биосинтез триацилглицеролов. Ожирение.
9. Гормональная регуляция метаболизма триацилглицеролов.
10. Нарушение обмена сфинголипидов: болезнь Нимана-Пика, болезнь Гоше, болезнь Тея-Сакса.

МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ОБМЕН БЕЛКОВ. ОБМЕН МОЧЕВИНЫ.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 23. МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть процессы обмена белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

1. Очень ярко выраженное деление белков на «свои» и «чужие». Это строго контролируется иммунной и другими системами и нарушение опознания «своих» сопровождается значительными нарушениями функций клеток и органов.
2. Отсутствие «запасных» белков. Если углеводы депонируются в форме гликогена почти всеми клетками, а липиды в форме нейтрального жира адипоцитами, то все белки практически функционально активны и в случае необходимости происходит распад одних менее важных в данный момент и синтез других более важных для данной ситуации белков.
3. Необходимость в дополнительных метаболических путях. Белки — основной носитель азота в организме и если углеводородный скелет аминокислот просто вливается в общие метаболические пути, то обмен азота протекает по специфическим путям со своими особенностями превращений и регуляции.

1. СТВОРАЖИВАНИЕ МОЛОКА ПЕПСИНОМ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

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

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

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

Результаты занести в таблицу.

Таблица. Створаживание молока пепсином желудочного сока

Субстрат	Фермент	Видимые изменения	Чем обусловлено изменение

2. ПЕРЕВАРИВАНИЕ ФИБРИНА ПЕПСИНОМ

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

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

Ход работы

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

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

В третью пробирку вливают 20 капель желудочного сока или 0,1% раствор пепсина в 0,2% соляной кислоте, предварительно под щелоченных 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°С.

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

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

Содержимое каждой пробирки фильтруют и с фильтратом производят биуретовую реакцию. Положительная реакция обнаруживается только в первой пробе, где был активный

пепсин, соляная кислота, фибрин, что указывает на присутствие в фильтрате продуктов переваривания белка. Результаты наблюдений занести в таблицу. Таблица. Переваривание белков пепсином

пробы	Фермент	Субстрат	Реакция среды	Инактивация пепсина кипячением	Видимые изменения фибрина	Биуретовая реакция

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

Обнаружение фенилпировиноградной кислоты в моче. Принцип метода. Фенилпировиноградная кислота с ионами железа трехвалентного дает комплексное соединение сине-зеленого цвета. Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные.

Реактивы: 1. Хлорид железа (FeCl_3), 10% раствор.

Исследуемый материал: моча нормальная, моча патологическая*.

Ход работы. В две пробирки соответственно внести по 10 капель нормальной мочи и патологической мочи. В обе пробирки прилить по 5 капель 10 % раствора FeCl_3 .

При наличии фенилпировиноградной кислоты отметить развитие сине-зеленого окрашивания.

Клинико-диагностическое значение. Фенилкетонурия связана с отсутствием фенилаланингидроксилазы при фенилпировиноградной олигофрении, наблюдается также при поражениях печени со снижением активности фенилаланингидроксилазы (вирусный гепатит, отравление гепатотропными ядами). При этих состояниях в крови повышается содержание фенилаланина до 12,0 мкмоль/сут. Фенилпировиноградная кислота в моче у здорового ребенка отсутствует.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Биологическая роль белков в организме.
2. Азотистый баланс и его формы.
3. Нормы белка в питании.
4. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте.
5. Всасывание аминокислот путем вторичного активного транспорта.
6. Пути использования аминокислот в тканях.
7. Общие направления распада аминокислот: Трансаминирование, окислительное дезаминирование, декарбоксилирование.
8. Превращения альфа-кетокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты.
9. Источники аммиака в организме.
10. Причины гипераммонемии.
11. Токсичность аммиака. Пути обезвреживания аммиака
12. Орнитиновый цикл мочевинообразования. Синтез мочевины. Написать уравнения реакций и ферменты
13. Особенности обмена фенилаланина и тирозина. Биологическая роль указанных аминокислот. Написать уравнения реакций и ферменты
14. Наследственные нарушения: фенилкетонурия, алкаптонурия, альбинизм.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 24. МЕТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Сформировать знания о метаболизме аминокислот и путях обезвреживания аммиака в тканях. Освоить методику определения мочевины в сыворотке крови. Составить метаболическую карту аминокислотного обмена.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ ДЕЙСТВИЕ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА НА БЕЛОК

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

Желудочный сок в пробирке 2 предварительно нагреть до кипения и охладить, в пробирке 3 – нейтрализовать 0,5%-ным раствором 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 °С; 4 – в стакан со льдом.

Через каждые 8-10 минут содержимое пробирок взбалтывать.

Через 30 минут отметить, какие изменения произошли с белком.

Результаты наблюдения записать в таблицу.

Таблица. Действие желудочного сока на белок

	Содержимое пробирки	Температура, °С	Результаты
1	Белок + 1мл желудочного сока	37	
2	Белок + 1мл прокипяченного желудочного сока	37	
3	Белок + 1мл нейтрализованного желудочного сока	37	
4	Белок + 1мл желудочного сока	0	

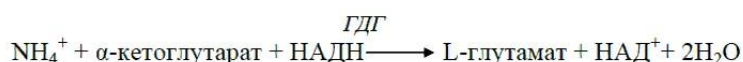
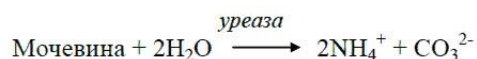
Белки расщепляются под воздействием ферментов желудочного сока, которые действуют лишь при определенной температуре и в кислой среде.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КИНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД)

ОБОСНОВАНИЕ ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ. Мочевина – продукт, образующийся в печени при обезвреживании аммиака. Это основной конечный продукт обмена белков.

Примерно 50% небелкового, остаточного азота крови приходится на долю мочевины.

ПРИНЦИП МЕТОДА: мочевина гидролизруется в присутствии уреазы с образованием аммиака и CO₂. Далее аммиак в реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой (ГДГ), взаимодействует с α-кетоглутаратом с образованием глутамата. В ходе реакции происходит окисление восстановленного НАД. Уменьшение концентрации НАДН пропорционально содержанию мочевины.



ОТМЕРИТЬ	КОНТРОЛЬ	СТАНДАРТ	ОПЫТ
Рабочий реактив, мл	—	2,0	2,0

Н ₂ O, мл	2,0
Прогреть пробирки в термостате при 370С 1 мин.	
Сыворотка крови, мл	0,02
Стандарт Ст13,33 ммоль/л	0,02
Тщательно перемешать и измерить поглощение опытной и стандартной пробы относительно контроля (воды) через 1 мин (Е _{1оп} и Е _{1ст}), затем через 2 мин (Е _{2оп} и Е _{2ст}). Измерения проводят при длине волны 340-365 нм; кювета 0,5 см.	

РЕЗУЛЬТАТ: Е_{1оп}= , Е_{1ст}= , Е_{2оп}= , Е_{2ст}=

Е_{оп} (Е_{1оп} – Е_{2оп}) =

Е_{ст} (Е_{1ст} – Е_{2ст}) =

Конечный результат рассчитывается по формуле

$$C_{\text{моч}} = \frac{\Delta E_{\text{оп}} \times C_{\text{ст}}}{\Delta E_{\text{ст}}} = \text{ммоль/л.}$$

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Нормальное содержание мочевины в сыворотке крови у взрослых 2,5-8,3 ммоль/л, экскреция с мочой 333-583 ммоль/сут.

Незначительное повышение концентрации мочевины в сыворотке крови наблюдается при избыточном содержании белка в рационе, при старении.

Значительное увеличение концентрации мочевины в сыворотке крови наблюдается при почечной недостаточности, обезвоживании (рвота, понос), шоке, усиленном распаде белков, сепсисе.

Пониженное содержание мочевины в сыворотке крови отмечается при гепатите, циррозе (резкое снижение мочевинообразовательной функции печени), нарушении всасывания в кишечнике, акромегалии, во время беременности.

Повышенное содержание мочевины в моче отмечается у больных со злокачественной анемией, лихорадкой, при диете с высоким содержанием белка.

Пониженное содержание мочевины в моче отмечается при поражении почек (нефрит), при патологии печени (паренхиматозная желтуха, цирроз), ацидозе.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Локализация реакций синтеза креатина, его биологическая роль.
2. Образование креатинфосфата и креатинина.
3. Врожденные нарушения обмена, ферментные блоки.
4. Особенности обмена серосодержащих аминокислот.
5. S-аденозилметионин и его роль в процессах метилирования.
6. Особенности обмена глицина и аргинина. Их роль в образовании креатина и креатинфосфата.
7. Особенности обмена дикарбоновых аминокислот.
8. Конечные продукты распада аминокислот.
9. Преобразование аминокислот по аминогруппе.
10. Преобразование аминокислот по карбоксильной группе.

11. Преобразование аминокислот по радикалу.
12. Пути новообразования аминокислот.
13. Образование ядовитых продуктов распада белков под действием микрофлоры кишечника. Механизм обезвреживания.
14. Составить метаболическую карту аминокислотного обмена. На карте отметить:
 - Источники аминокислот в тканях.
 - Пути превращения аминокислот в тканях.
 - Тканевое обезвреживание аммиака.
 - Биосинтез мочевины.
 - Аминокислоты, распад которых приводит к образованию ацетил-КоА.
 - Субстраты ЦТК, являющиеся промежуточными продуктами распада аминокислот.
 - Конечные продукты распада аминокислот и нуклеотидов и их нормы в крови и моче (мочевина, мочевая кислота).
15. Транспорт аминокислот через клеточные мембраны.
16. Источники и пути превращений аминокислот в тканях. В чем особенность метаболизма глюкогенных и кетогенных аминокислот?
17. Виды дезаминирования аминокислот (восстановительное, гидролитическое, внутримолекулярное, окислительное).
18. Окислительное дезаминирование. Отличие прямого и непрямого окислительного дезаминирования.
19. Механизм реакций трансаминирования. Роль витамина В6. Строение витамина В6 и его коферментных форм, роль в катализе.
20. Значение реакций трансаминирования. Характеристика аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ). Реакции, катализируемые этими ферментами.
21. Реакция прямого окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты.

МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 25. ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

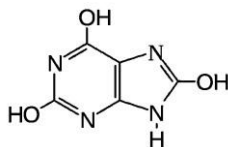
Нуклеотиды – лекарственные препараты успешно применяются в клинике с лечебной целью. Аналоги пуринов и пиримидинов, их нуклеозиды и нуклеотиды широко используются в клинической медицине и научных исследованиях. Изменения в структуре гетероциклического кольца или углеводного компонента приводят к образованию соединений, токсический эффект которых обусловлен: ингибированием определенных ферментов, участвующих в синтезе нуклеотидов или нуклеиновых кислот; включением

синтетических аналогов нуклеотидов в РНК или ДНК, где они нарушают комплементарное взаимодействие азотистых оснований или удлинение полинуклеотидных цепей.

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

ОБНАРУЖЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ПОМОЩИ МУРЕКСИДНОЙ ПРОБЫ

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



Мочевая кислота

Ход работы

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

Практическое значение

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 26. ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

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

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

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

Ход работы

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

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

Расчет

$$C_{\text{ст}} \square A \square D \\ C_{\text{оп}} \square \frac{\quad}{B}$$

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

Нормальные величины

Сыворотка крови

Дети 0,12-0,32 ммоль/л
Мужчины 0,24-0,50 ммоль/л
Женщины 0,16-0,44 ммоль/л
Моча 2,36-5,90 ммоль/сут

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

Клинико-диагностическое значение

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

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Синтез пуриновых нуклеотидов:
 - о реакции образования 5-фосфорибозиламина; о источниках атомов азота и углерода пуринового кольца;
 - о реакции синтеза АМФ и ГМФ из ИМФ; о реакции превращения АМФ в АТФ, ГМФ в ГТФ.
2. Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов по механизму отрицательной обратной связи. Регуляция с участием АТФ и ГТФ.
3. Катаболизм пуриновых нуклеотидов: о реакции распада АМФ; о реакции распада ГМФ;
 - о реакции образования мочевой кислоты из гипоксантина и ксантина, роль ксантиноксидазы.
6. Реакции реутилизации аденина, гуанина и гипоксантина.
6. Первичные и вторичные гиперурикемии: о синдроме Леша–Нихана, причины, основы лечения, прогноз; о мочекаменной болезни, причины, основы лечения;
 - о подагре, причины, клинические проявления, основы лечения. Механизм действия аллопуринола при лечении подагры.
7. Синтез пиримидиновых нуклеотидов: о реакции синтеза УМФ и УТФ; о реакции синтеза ЦТФ из УТФ.
8. Регуляция синтеза пиримидиновых нуклеотидов по механизму отрицательной обратной связи.

9. Синтез дезоксирибонуклеотидов. Роль тиоредоксина и НАДФН.
10. Синтез dТМФ. Роль тетрагидрофолиевой кислоты. Причина развития мегалобластической анемии при дефиците фолиевой кислоты.
11. Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов. Конечные продукты процесса.
12. Заболевания, связанные с пиримидиновым обменом. Оротатацидурия, причина, клинические проявления, основы лечения.
13. Количественное определение концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови и моче. Принцип метода, клинико-диагностическое значение, нормальные показатели.

БИОХИМИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 27. БИОХИМИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ.

БИОХИМИЯ КРОВИ.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить способы определения минеральных веществ в биоматериалах.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

Минеральные вещества в организме содержатся в двух состояниях: в виде свободных ионов и в связанной с органическими веществами форме (белками, ферментами, витаминами). Что касается микроэлементов, то все они находятся в связанном состоянии (кобальт — в витамине В₁₂, медь — в тирозиназе и церулоплазмине, цинк — в карбоангидразе, в инсулине). Минеральные вещества связываются с органическими молекулами ковалентными (йод — в тиреоглобулине, в тироксине), электростатическими (магний и кальций — с различными ферментами) и координационными связями (железо — в гемопротеидах).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ К ПЕРОКСИДНОМУ ГЕМОЛИЗУ.

Принцип метода.

Метод основан на определении оптической плотности при 540 нм внеэритроцитарного гемоглобина, поступающего в среду при спонтанном лизисе мембран эритроцитов, который вызван пероксидным окислением липидов кислородом воздуха. Оборудование: штатив с пробирками, пробирки центрифужные, весы центрифужные, центрифуга лабораторная, термостат на 380С, пипетки объемом 0,1 мл, 5 мл и 10 мл, стеклянные палочки, ФЭК, кюветы толщиной слоя 3 мм или 5 мм.

Реактивы:

1. Рабочий раствор хлорида натрия, свежеприготовленный: смешать 25 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 7,4 с 25 мл 17 % раствора хлорида натрия (NaCl), перед употреблением объем смеси довести до 1 литра и насытить кислородом воздуха путем встряхивания.
2. Дистиллированная вода. Исследуемый материал: кровь цельная. Ход работы. В центрифужную пробирку внести 7,5 мл рабочего раствора NaCl и добавить 0,1 мл крови. Сполоснуть микропипетку, втягивая и выдувая жидкость. Образовавшуюся смесь центрифугировать 10 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно отобрать.

К осадку добавить 7,5 мл рабочего раствора NaCl и вновь суспензировать осадок эритроцитов. В три центрифужные пробирки налить по 1 мл приготовленной суспензии эритроцитов. В первые две пробирки прибавить по 4 мл рабочего раствора NaCl, а в третью – 4 мл дистиллированной воды (для полного гемолиза эритроцитов). Пробы перемешать стеклянной палочкой и поставить в термостат на 2 часа при 38 С.

После инкубации содержимое пробирок перемешать стеклянной палочкой и центрифугировать 10 мин при 100 об/мин. Измерить оптическую плотность всех трех пробирок против дистиллированной воды на ФЭКе при 540 нм (зеленый светофильтр). Расчет. Произвести по формуле: $X = (E1 + E2) \times 100 / 2 \times E3$, где X – степень гемолиза в %, E1 и E2 – экстинкции первой и второй проб, E3 – экстинкция третьей пробы. Клиниколабораторное значение. По степени гемолиза эритроцитов можно судить о состоянии антиокислительных систем клетки. В норме спонтанный гемолиз составляет 2 – 10%.

Недостаток витамина E, других антиоксидантов повышает этот показатель. Вывод:

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Обмен железа в организме: потребность, всасывание, транспорт, форма депонирования. Пищевые источники. Симптомы и клинические проявления недостаточности железа.
2. Особенности метаболизма эритроцита (гликолиз, пентозофосфатный путь окисления глюкозы, 2,3-дифосфоглицерат, образование активных форм кислорода, Met-Нбредуктазная система, антиоксидантная система).
3. Строение гема, реакции и основные этапы его синтеза. Регуляция синтеза гема и гемоглобина.
4. Причины порфирий, их клинические проявления, основы лечения порфирий.
5. Строение наиболее представленных в организме гемопротеинов (гемоглобин, миоглобин) и гемсодержащих ферментов (цитохромы, каталаза, пероксидаза). Их функция.
6. Патологические и физиологические типы гемоглобина (метгемоглобин, серповидноклеточный, гликозилированный гемоглобин, карбоксигемоглобин, оксигенированный гемоглобин, карбогемоглобин). Значение определения концентрации гликозилированного гемоглобина, оксигемоглобина и карбогемоглобина.
7. Механизмы транспорта углекислого газа. Как он связывается с гемоглобином? Роль карбоангидразы. Роль эритроцита в изменении концентрации бикарбонат-ионов плазмы.
8. Связывание гемоглобина с кислородом, эффект кооперативности. Кривая насыщения гемоглобина кислородом. Механизм транспорта кислорода. Влияние температуры, величины pH, концентрации CO₂, 2,3-дифосфоглицерата на сродство гемоглобина к кислороду.
8. Схема реакций, происходящих в эритроците в капиллярах легких и тканей.
9. Реакции распада гемоглобина и гема в клетках ретикулоэндотелиальной системы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 28. БИОХИМИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ. БИОХИМИЯ КРОВИ. ОБМЕН ГЕМОГЛОБИНА.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить способы определения минеральных веществ в биоматериалах.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

В обмене ключевого хромопротеина крови гемоглобина, ключевая роль отводится преобразованию гема. Данный процесс представляет собой элегантно организованный ход преобразований белка гемоглобина в безопасный стеркобилин, в ходе которого в крови определяются ряд, через стадию токсичных веществ в показать роль печени в обезвреживании продуктов превращения аминокислот микроорганизмами и, определить содержания фракций билирубина в сыворотке крови, сравнить их соотношение в норме и при патологии.

Печень играет важнейшую роль в обмене веществ, контролируя и регулируя белковый, липидный, углеводный, минеральный обмены. Одна из важнейших функций печени - обезвреживающая. В печени после окисления и конъюгации токсическое вещество становится более гидрофильным и легче выводится из организма. Нарушение обезвреживания билирубина приводит к желтухам разного генеза.

Работа 1. Количественное определение общего, прямого и непрямого билирубина в сыворотке крови по методу Иендрашика.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

При добавлении к сыворотке крови кофеинового реактива билирубин переходит в растворимое диссоциированное состояние. Такой билирубин со смесью диазореактивов дает розово-фиолетовое окрашивание, переходящее в зеленое под действием реактива Фелинга. По интенсивности окраски фотокolorиметрически определяют концентрацию фракций билирубина в пробе.

ХОД РАБОТЫ.

Работу проводят по следующей схеме, используя 3 пробирки с сывороткой крови (А, В, К).

	Реактивы	Общий билирубин (А)	Прямой билирубин (В)	Контроль (К)
1.	Сыворотка крови	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
2.	Кофеиновый реактив	1,75 мл	-	1,75 мл
3.	Физиологический раствор 0,9 %	-	1,75 мл	0,25 мл
4.	Смесь диазореактивов	0,25 мл	0,25 мл	-
Через 10 минут				
5.	Реактив Фелинга	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл

Колориметрировать на ФЭКе при красном светофильтре (длина волны 670 нм) против воды в кюветах толщиной 5 мм. Из показателей, полученных при колориметрии общего и прямого билирубина, вычесть показатель контроля. Расчет провести по калибровочному графику. Найти содержание общего и прямого билирубина в мкМ/л. Для определения уровня непрямого билирубина из общего его содержания вычесть показатель прямого билирубина.

ВЫВОДЫ (сравнить концентрацию общего, прямого, непрямого билирубина с нормальными показателями в крови):

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Функции печени. Участие печени в углеводном обмене. Процессы поддержания гомеостаза глюкозы крови, клинико-лабораторные показатели, нарушения.
2. Участие печени в липидном обмене. Роль печени в синтезе и транспорте эндогенных триацилглицеролов и холестерина, клинико-лабораторные показатели, нарушения. Какие липопротеины образуются в печени?
3. Роль печени в синтезе альбуминов и глобулинов крови, белков свертывающей системы, плазмоспецифичных ферментов, клинико-лабораторные показатели, нарушения.
4. Роль печени в синтезе биологически активных веществ на экспорт (креатин, 25гидроксиколекальциферол), в образовании желчных кислот и желчных пигментов. Состав желчи и ее роль в пищеварении.
5. Непрямой (свободный) билирубин, его строение, реакции образования. Дальнейшая судьба непрямого билирубина.
6. Прямой (связанный) билирубин, его строение, реакции образования, его дальнейшая судьба. Роль фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы. Как выводятся конечные продукты распада гема?
7. Состояния, связанные с избыточным распадом гемоглобина. Причины гемолитической желтухи и ее лабораторные критерии.
8. Состояния, связанные с нарушениями оттока желчи. Причины обтурационной желтухи и ее лабораторные критерии.
9. Состояния, связанные с недостаточностью функции гепатоцитов. Причины паренхиматозной желтухи и ее лабораторные критерии.
10. Физиологические желтухи новорожденных.
11. Патологические желтухи: о гемолитические желтухи, их причины. Физиологические основы применения фенобарбитала; о наследственные нарушения выведения билирубина – синдромы Жильбера-Мейленграхта, Дубина-Джонсона, КриглераНайара.
12. Определение содержания общего билирубина и его фракций в сыворотке крови. Принцип метода, нормальные величины, клинико-диагностическое значение.
13. Обнаружение билирубина и уробилиногена в моче. Принцип метода, нормальные величины, клинико-диагностическое значениеКсенобиотики: свойства, пути поступления в организм.
14. Биотрансформация ксенобиотиков. Фазы биотрансформации. Факторы, влияющие на биотрансформацию.
15. Первая фаза биотрансформации – реакции микросомального окисления. Реакции микросомального окисления, отметьте роль НАДФН, цитохрома P450, цитохрома b5.
16. Вторая фаза биотрансформации – реакции конъюгации. Строение УДФ-глюкуроновой кислоты (УДФГК) и фосфоаденозин- фосфосульфата (ФАФС). Реакции образования прямого билирубина, животного индикана.
17. Причина усиления токсичных свойств соединений в результате биотрансформации.
18. Отличия микросомального от биологического окисления.
19. Примеры биотрансформации некоторых лекарственных средств.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 29. БИОХИМИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ. БИОХИМИЯ МЫШЕЧНОЙ И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить биохимические основы функционирования мышечной ткани. Биохимия миокарда. Лабораторные маркеры заболеваний сердечно-сосудистой системы

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Наиболее часто определение активности АсАТ и АлАТ используется в клинической практике для выявления патологических процессов в миокарде и печени. В миокарде гораздо более высокая активность АсАТ, чем АлАТ. Повышение в крови активности обоих ферментов, особенно АсАТ, в остром периоде инфаркта миокарда является достоверным диагностическим тестом и имеется в 95% случаев. Активность АсАТ достигает максимума через 24–36 часов (обычно повышена в 4–5 раз) и при адекватном лечении снижается к 3–7-м суткам. При стенокардии активность ферментов в крови изменяется незначительно. При поражении печени (токсический, сывороточный и инфекционный гепатит) в сыворотке крови высока активность также обоих ферментов, однако более выражено повышается активность АлАТ, чем АсАТ. При инфекционном гепатите активность ферментов повышается еще до появления желтухи. В половине случаев цирроза печени, однако, наблюдается более высокая активность АсАТ, чем АлАТ.

Коэффициент де Ритиса (величина отношения АсАТ/АлАТ) при инфаркте миокарда значительно увеличивается, при гепатитах снижается.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Принцип

В результате реакций трансаминирования, происходящих под действием аспаратаминотрансферазы (АсАТ, L-аспартат:2- α -кетоглутарат аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1.) и аланинаминотрансферазы (АлАТ, L-аланин: 2- α -кетоглутарат аминотрансфераза, КФ 2.6.1.2.), из аспарагиновой кислоты и аланина образуются, соответственно, оксалоацетат и пируват. Оксалоацетат, подвергаясь самопроизвольному декарбоксилированию, превращается в пируват. При добавлении кислого 2,4динитрофенилгидразина ферментативная реакция останавливается и образуется гидразон пировиноградной кислоты. Последний в щелочной среде дает бурое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Реактивы

Р-р субстрата АсАТ: смесь альфа-кетоглутаровой кислоты и аспарагиновой кислоты, 2) р-р субстрата АлАТ: смесь альфа -кетоглутаровой кислоты и аланина, 3) р-р 2,4динитрофенилгидразина в 1,0 М НСl, 4) 0,4 М р-р NaOH. Стандартный р-р пировиноградной кислоты, 0,1 ммоль/л. Материал исследования Сыворотка крови.

Проведение анализа

Проведение анализа	Проба 1, стандартная, мл	Проба 2, опытная для АлАТ, мл	Проба 3, опытная для АсАТ, мл
Субстратный раствор АлАТ	0,25	0,25	—
Субстратный раствор АсАТ	—	—	— 0,25

Стандартный раствор пировиноградной кислоты	0,05	—	—
Сыворотка крови	—	0,05	0,05
Инкубируют 30 минут при 37°C			
2,4-ДНФГ	0,25	0,25	0,25
Инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут			
NaOH	2,5	2,5	2,5

Перемешивают. Измеряют оптическую плотность опытных и стандартной пробы против воды при 540 нм (зеленый светофильтр).

Расчет

Активность АлАТ, ммоль/л·ч = $E_{оп2} / E_{ст} \times C_{ст} \times 2$ Активность

АсАТ, ммоль/л·ч = $E_{оп3} / E_{ст} \times C_{ст} \times 2$,

где $E_{оп2}$, $E_{оп3}$ – соответственно, оптическая плотность опытных проб для АлАТ и АсАТ, $E_{ст}$ – оптическая плотность стандартной пробы, $C_{ст}$ – концентрация стандартного раствора, 2 – коэффициент перевода 30 минут в 1 час.

Нормальные величины

Сыворотка крови

Активность АлАТ 0,10–0,68 ммоль/л·ч

Активность АсАТ 0,10–0,45 ммоль/л·ч

Коэффициент де Ритиса (Активность АсАТ / Активность АлАТ) $1,33 \pm 0,40$ Выводы:

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Непрямое окислительное дезаминирование – трансдезаминирование.
2. Особенности непрямого дезаминирования в мышечной ткани – цикл ИМФ-АМФ.
3. Судьба альфа-кетокислот, образовавшихся в процессах дезаминирования, на примере пирувата, оксалоацетата, альфа-кетоглутарата.
4. Реакции декарбоксилирования. Синтез биогенных аминов (на примере альфа-аминомасляной кислоты, гистамина, серотонина, дофамина). Роль этих биогенных аминов.
5. Способы обезвреживания биогенных аминов. Реакции дезаминирования с участием моноаминоксидазы (МАО) и реакции метилирования.
6. Анаболическая роль аминокислот на примере креатина. Строение креатина и креатинфосфата, реакции их синтеза, локализация процесса. Биологическая роль креатинфосфата. В чем причина физиологической креатинурии у детей?
7. Определение активности АсАТ и АлАТ в сыворотке крови. Принцип метода, его клинико-диагностическое значение. Нормальные показатели.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 30. БИОХИМИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ. БИОХИМИЯ МОЧИ.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить физик-химические свойства мочи в норме и при отдельных патологических процессах.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Почки участвуют в регуляции водно-солевого баланса, поддержании кислотноосновного состояния, осмотического давления жидкостей организма, артериального давления, стимуляции эритропоэза.

Объем и состав образуемой в почках мочи может меняться в значительных пределах, отражая состояние водно-солевого обмена и других сторон метаболизма организма. Обследование каждого больного, не только в стационаре, но и в амбулаторных условиях должно сопровождаться обязательным анализом мочи, так как это исследование может помочь в постановке диагноза, а нередко совершенно изменить первоначальные диагностические предположения, оценить эффективность проводимой терапии.

Общий анализ мочи проводят практически всем больным, поступившим в стационар. Изучение физико-химических свойств и химического состава мочи, определение в ней патологических компонентов, правильная интерпретация полученных лабораторных данных имеет большое значение для диагностики заболеваний, а также контроля эффективности лечения.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЧИ.

Оборудование.

Штатив с пробирками; пипетки на 2 мл, 5 мл; предметные стекла; универсальная индикаторная бумага для определения pH; цилиндры на 50-100 мл; урометр (аэрометр); стеклянные палочки.

Определение цвета мочи

Нормальная свежесобранная моча представляет собой прозрачную жидкость соломенно-желтого цвета. Нормальная окраска мочи обусловлена наличием в ней ряда пигментов. Исключение представляет моча при сахарном диабете - бледная моча высокой плотности. При различных заболеваниях окраска мочи может меняться от присутствия в ней тех или иных пигментов: кровяных, желчных, порфиринов и др. Пена нормальной мочи белая, быстро исчезающая при стоянии. При содержании белка в моче пена делается более стойкой.

В чистую пробирку налить 2 мл мочи и рассмотреть на свету. Результаты записать.

Определение прозрачности

В той же пробирке провести определение прозрачности мочи и найденные результаты также записать.

Определение запаха

Склянку с мочой держать на некотором расстоянии от носа и движением ладони руки направлять воздух к носу. При этом ощущается тот или иной запах.

Определение реакции мочи

В норме кислотность мочи зависит от пищи. При обычном питании человека моча имеет слабокислую или нейтральную реакцию (pH 5 - 7). При преобладании в рационе

мясной пищи реакция мочи сдвигается в кислую сторону, при преобладании растительной - в щелочную. Однако реакция мочи может изменяться при заболеваниях, например, при сахарном диабете, подагре реакция сдвигается в кислую сторону, при воспалениях мочевого пузыря моча может иметь щелочную реакцию.

На предметное стекло положить красную и синюю лакмусовые бумажки, стеклянной палочкой нанести на них по капле мочи и наблюдать изменение окраски. Для определения рН мочи можно использовать универсальную индикаторную бумагу, рН-метры.

Определение удельного веса (плотности)

Исследуемую мочу налить в чистый цилиндр объемом 50 мл осторожно опустить в него урометр. Когда он прекратит свое движение (не будет касаться стенок цилиндра), определить удельный вес по шкале урометра. При этом отчет ведут по нижнему мениску жидкости. Если шкала урометра находится вне мениска жидкости, определение удельного веса проводится урометром другого типа.

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЧИ.

Суточное количество мочи составляет 1,0-2 л, в среднем 1500 мл.

Увеличение суточного диуреза (полиурия) наблюдается при схождении отеков, сахарном и несахарном диабете.

Уменьшение суточного диуреза. Наиболее частой причиной является нарастание отеков вне зависимости от их происхождения, а также обильное потоотделение, профузные поносы и рвоты. Выраженное снижение диуреза – олигоурия (менее 600 мл в сутки), отсутствие мочи или ее количество менее 50 мл – анурия наблюдаются при тяжелых кровопотерях, острой сердечной или сосудистой недостаточности (шок), при острых нефритах, нефрозах, при переливании несовместимой крови, при тяжелых хронических заболеваниях почек, а также при полной или частичной закупорке мочеточников.

2. Цвет. Красный, или цвет мясных помоев может быть связан с макрогематурией или гемоглобинурией, наличием в моче порфирина, миоглобина, лекарств или их метаболитов. Темно-желтый, иногда с зеленым или зеленовато - бурый оттенком, обусловлен выделением с мочой билирубина при паренхиматозной и механической желтухе. Зеленовато-желтый связан с большим содержанием гноя в моче. Грязнокоричневый или серый обусловлен содержанием гноя при щелочной реакции мочи. Темный, почти черный обусловлен гомогентизиновой кислотой при алкаптонурии, или меланином при меланоме, меланосаркоме, или гемоглобинурией при острой гемолитической анемии. Беловатый связан с наличием в моче большого количества фосфатов, или выделением жира при инвазии паразита *Filaria*.

3. Прозрачность. Помутнение мочи может быть результатом наличия в ней эритроцитов, лейкоцитов, эпителия, бактерий, жировых капель, выпадения в осадок солей.

4. Плотность. В норме плотность мочи может колебаться от 1,008 до 1,025 г/л. Увеличение плотности $>1,030$ г/л связано с наличием в моче глюкозы, белка, лекарств или их метаболитов, маннитола или декстрана (при их внутривенном вливании). Постоянное снижение плотности $< 1,015$ г/л наблюдается при несахарном диабете, хронической почечной недостаточности, острым поражении почечных канальцев.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОАЛЬБУМИНУРИИ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТПОЛОСОК.

Принцип метода:

Тест-полоска Micral-Testb II служит для специфической детекции человеческого альбумина в моче на основании сочетания хроматографических и иммунологических процессов. Содержащийся в моче альбумин переходит из жидкости в матрикс с конъюгатом. Здесь проходит иммунологическая реакция, в ходе которой человеческий альбумин соединяется с конъюгатом, состоящим из золота, связанного в антителами. Образуется комплекс антиген-антитело. Избыток конъюгата связывается с альбумином, иммобилизованным на диагностической зоне, так что в детекционную зону попадает лишь конъюгированный комплекс антигенантитело. Образуемый цвет (от белого до красного) непосредственно зависит от концентрации альбумина в образце. Через 5 мин производится оценка интенсивности цвета, которая пропорциональна содержанию альбумина. Тест-полоски позволяют выявлять концентрации альбумина в интервале от 0 до > 100 мг/л. Образование окраски более светлой, чем исходная, соответствует 20 мг/л и свидетельствует о физиологической концентрации альбумина в моче. Цвет, образующийся при содержании альбумина более 20 мг/л (пороговое значение для микроальбуминурии), обозначает повышенную экскрецию альбумина с мочой. Уровень альбуминурии – 20 мг/л является пограничным между нормой и патологией.

Оборудование: тест-полоски Micral-Testb II, стаканы для сбора мочи. Исследуемый материал: моча

Ход работы.

1. Погрузите тест полоску в мочу на 5 сек так, чтобы уровень жидкости располагался между двумя черными отметками на тест-полоске. При погружении и извлечении полоски следите за тем, чтобы она не прикасалась к краям посуды (это может повлиять на хроматографический процесс). Не погружайте полоску глубже верхней отметки!
2. Положите полоску на ровную, не впитывающую поверхность, или расположите ее на поверх посуды для сбора мочи.
3. Через 1 мин сравните цвет, образовавшийся в результате реакции, с цветовой шкалой, находящейся на этикетке коробочки для тест-полосок. Оценивайте только преобладающий цвет тест-зоны. Клинико-диагностическое значение. Под микроальбуминурией подразумевается концентрация альбумина в моче от 30 до 300 мг/л, что не определяется обычными аналитическими методами для выявления протеинурии. В тоже время микроальбуминурия является наиболее существенным ранним признаком нефропатии. Выявление микроальбуминурии у больных сахарным диабетом позволяет обнаружить поражение клубочков на стадии, когда еще могут быть приняты меры, влияющие на развития патологического процесса и позволяющие избежать развития почечной недостаточности.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Метаболизм почек. Роль почек в синтезе биологически активных веществ (креатин, эритропоэтин, 1,25-дигидроксиколекальциферол).
2. Роль ферментов в реализации функции почек – глицинамидинтрансфераза, глутаматдегидрогеназа, глутаминаза, щелочная фосфатаза, изоферменты лактатдегидрогеназы.

3. Схема строения нефрона. Процессы образования мочи: фильтрация, реабсорбция и секреция. Места действия и эффект гормонов, регулирующих водно-солевой обмен.
4. Характеристика фильтрации, факторы, влияющие на ее скорость и величину. Оценка скорости фильтрации в клинической практике. Клиренс. Вещества, используемые для определения клиренса.
5. Оценка скорости клубочковой фильтрации в клинколабораторной диагностике. В чем состоит определение клиренса по креатинину?
6. Реабсорбция веществ. Транспорт максимум для глюкозы.
7. Регуляция реабсорбции воды. Роль антидиуретического гормона. Факторы, стимулирующие его синтез и выделение. Метаболические последствия гипофункции антидиуретического гормона, клинические проявления.
8. Регуляция реабсорбции натрия. Активация и функционирование ренин-ангиотензиновой системы. Схема, отражающая роль ренин-ангиотензиновой системы в реабсорбции натрия.
9. Регуляция реабсорбции кальция. Роль 1,25-дигидроксикальциферола, паратгормона и кальцитонина в обмене кальция.
10. Роль почек в поддержании кислотно-основного состояния.
11. Общие свойства мочи здорового человека: количество, цвет, прозрачность, запах, относительная плотность, pH. Как изменяются эти показатели при патологических состояниях?
12. Органические и неорганические компоненты мочи здорового человека.
13. Патологические компоненты мочи – белок, глюкоза, билирубин, кетоновые тела, кровь.
14. Принцип методов определения физико-химических свойств мочи (относительная плотность, величина pH). Клинико-диагностическое значение этих показателей. Нормальные величины.
15. Принцип лабораторного определения компонентов мочи – белок, глюкоза, кетоновые тела, билирубин, уробилиноген, гемоглобин, эритроциты. Клиникодиагностическое значение, нормальные величины

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 31. БИОХИМИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ. БИОХИМИЯ ПИТАНИЯ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить представления о химическом составе желудочного сока.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Путем последовательного действия протеолитических ферментов белки лишаются видовой и тканевой специфичности. 95-97% белков пищи всасывается в виде свободных аминокислот. Ферментный аппарат осуществляет поэтапное, избирательное расщепление пептидных связей. Превращение профермента пепсиногена в активный фермент пепсин происходит в желудке и протекает в присутствии соляной кислоты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕПСИНА

Специальные свойства белков, проявляющих энзиматическую активность, оценивают по удельной каталитической активности данного фермента, выраженной в ЕД/г массы вещества или в ЕД/мл раствора.

Реактивы: 1) ацетатный буфер с pH 4,9 (готовят 0,2 н раствор ацетата натрия и 0,2 н раствор уксусной кислоты; смешивают 480 мл первого и 520 мл второго раствора под контролем pH);

2) молочно-ацетатная смесь (смешивают молоко с ацетатным буфером - 1:1); 3) HCl - 2 н раствор; 4) желудочный сок или раствор пепсина (100 мг пепсина растворяют в 1 н растворе и добавляют 10 - 20 капель 2 н раствора HCl до pH 2,5, через 3 ч раствор доводят до 100 мл 0,1 н раствором HCl и получают раствор пепсина).

Ход работы

В первую пробирку помещают 1 мл желудочного сока, а во вторую - 5 мл молочноацетатной смеси и прогревают 5 мин при 25 °С. Затем быстро переливают молочноацетатную смесь в первую пробирку и включают секундомер. Как только на стенках пробирки полнятся первые хлопья казеина, останавливают секундомер. Для расчета активности пепсина в 1 мл желудочного сока делят число 60 на количество секунд - получают количество единиц пепсина в 1 мл желудочного сока.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕАКЦИИ СРЕДЫ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

Одним из факторов, определяющих скорость переваривания белков в желудке, является кислотность желудочного сока.

Ход работы

Одну каплю нативного желудочного сока наносят стеклянной палочкой на синюю лакмусовую бумажку или на универсальный индикатор, помещённый на предметное стекло. По изменению окраски индикатора определить pH желудочного сока.

РЕАКЦИИ НА СВОБОДНУЮ СОЛЯНУЮ КИСЛОТУ

Для реакции на свободную соляную кислоту в желудочном соке используют бумагу «конго» (фильтровальная бумага, пропитанная 0,1% раствором красного конго и высушенная, конго-натриевая соль сульфокислоты). В сильно кислой среде конго имеет синюю окраску, в слабокислой, нейтральной и щелочной - красную. Зона перехода окраски находится в интервале pH 3,0-5,2. Поэтому красная окраска переходит в синюю только под влиянием сильно диссоциирующих кислот (HCl создаёт в среде pH 1,0 - 2,2), окраска не меняется или меняется слабо от действия разбавленных органических кислот и кислореагирующих солей, так как они создают в среде pH 4,0 и выше. **Ход работы**

Одну каплю нативного желудочного сока наносят стеклянной палочкой на красную бумагу конго. Отметить окраску индикатора.

В одну пробирку налить несколько капель раствора 0,1 н соляной кислоты, во вторую желудочного сока. В обе пробирки добавить по 2 капли раствора деметиламиноазобензола. В обеих пробирках появляется вишнево-красное окрашивание.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Характеристика класса ферментов «Гидролазы».
2. Понятие «азотистый баланс» и причины его изменения (азотистое равновесие, положительный и отрицательный азотистый баланс). Особенности азотистого баланса у детей.
3. Пищевые источники белка. Суточная потребность в белке у детей и взрослых.
5. Биологическая ценность белков. Понятие эталонного белка. Клинические проявления белковой недостаточности у детей. Заболевания «квашиоркор».
4. Механизм синтеза и биологическая роль соляной кислоты желудочного сока. Понятия «гиперхлоргидрия», «гипохлоргидрия», «ахлоргидрия», «ахилия».

5. Переваривание белков в желудке и кишечнике. Характеристика ферментов желудочного сока (пепсин, гастриксин, ренин), панкреатического сока (трипсин, химотрипсин, эластаза, карбоксипептидазы) и кишечного сока (аминопептидазы, дипептидазы) по плану: о место синтеза; о механизм активации; о оптимальные условия для работы; о субстратная специфичность.
6. Всасывание аминокислот в энтероцитах (транслоказа, симпорт с ионами натрия).
7. Возрастные особенности переваривания белков и всасывания аминокислот у детей.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 32. БИОХИМИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ. БИОХИМИЯ ПИЩЕВАРЕНИЯ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить представления о химическом составе желудочного сока.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

В желудочном соке в норме присутствует свободная соляная кислота, которая создает кислую среду в желудке, активирует пепсиноген и создает рН-оптимум для действия пепсина, денатурирует пищевые белки, регулирует работу привратника и обладает бактерицидным действием. Часть соляной кислоты связывается с белками и продуктами их гидролиза, это связанная HCl , со свободной она образует общую HCl .

В желудочном соке присутствуют органические кислоты и кислые фосфаты – это кислореагирующие продукты. Они вместе с общей соляной кислотой дают общую кислотность желудочного сока, которая определяется методом титрования 0,1 н гидроксидом натрия. При титровании всех видов кислотности желудочного сока в одной пробе используется два индикатора: фенолфталеин (одноцветный индикатор с зоной перехода 8,0-10,2), и парадиметиламиноазобензол (двухцветный с зоной перехода 2,9- 4,0).

ТИТРОВАНИЕ КИСЛОТ ЖЕЛУДОЧНОГО СОДЕРЖИМОГО

Принцип определения кислотности желудочного сока основан на титровании свободной соляной кислоты и общих кислореагирующих веществ 0,1 н раствором едкого натра. Пользуясь различными индикаторами, в одной и той же пробе желудочного сока определяют как общую кислотность, так и содержание свободной соляной кислоты. При этом можно вычислить количество связанной соляной кислоты.

Общая кислотность желудочного сока выражается количеством мл 0,1 н раствора едкого натра, пошедшего на титрование 100 мл желудочного сока в присутствии индикатора фенолфталеина.

Свободную соляную кислоту принято выражать количеством мл 0,1 н раствора едкого натра, пошедшего на титрование 100 мл желудочного сока в присутствии индикатора деметиламиноазобензола. В этом случае при титровании нейтрализуется только свободная кислота, так как слабые кислоты находятся в растворе в недиссоциированном состоянии, в реакцию со щелочью не вступают. При рН 3,0, когда окраска индикатора меняется от красной к оранжевой, свободная кислота нейтрализуется щелочью. Титруют на белом фоне.

Ход работы

В колбу наливают 5 мл профильтрованного желудочного содержимого, добавляют 12 капли 1% спиртового раствора фенолфталеина 1-2 капли 0,5% спиртового раствора деметиламиноазобензола и титруют при постоянном помешивании 0,1 н. раствором

гидроксида натрия до перехода первоначального красного цвета в желто-розовый («цвет семги»). Количество щелочи, израсходованной на титрование, соответствует количеству свободной соляной кислоты и выявляется индикатором диметиламиноазобензолом.

Не доводя уровня щелочи в бюретке до первоначального, продолжают титрование до перехода окраски в стойкий красный цвет. Общее количество щелочи, считая от начального уровня ее в бюретке, соответствует общей кислотности и выявляется индикатором фенолфталеином.

В другую колбу отмеривают 5 мл желудочного содержимого, добавляют 1-2 капли 1% водного раствора ализаринсульфоновокислого натрия и титруют при постоянном помешивании до перехода первоначальной желтой окраски в фиолетовую. Количество щелочи, использованной на титрование, соответствует сумме всех веществ, дающих кислую реакцию, кроме связанной соляной кислоты, и выявляется индикатором ализаринсульфоновокислым натрием. В каждой порции извлеченного желудочного содержимого определяют свободную соляную кислоту, общую кислотность и, в случае необходимости, связанную соляную кислоту. Результаты титрования записать в таблицу.

Расчет. Результаты титрования выражают в мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия, затраченных на нейтрализацию свободной соляной кислоты и других кислореагирующих соединений в 100 мл желудочного содержимого (условные титрационные единицы). Так как для титрования берут 5 мл желудочного содержимого, а расчет ведут на 100 мл, то количество потраченной щелочи умножают на 20. Одна условная титрационная единица соответствует концентрации соляной кислоты, равной 1 ммоль/л.

Формулы для расчета:

Количество свободной HCl:

где a – количество 0,01N NaOH, пошедшего на титрование до 1 пункта; 0,5 – объем исследуемого желудочного сока.

$$HCl_{своб.} \square \frac{a \square 10}{0,5}$$

Количество общей HCl:

$$HCl_{общ.} \square \frac{b \square 10}{0,5}$$

где b – среднее арифметическое количество щелочи, пошедшее на титрование до 2 и 3 пунктов.

Количество связанной HCl:

$$HCl_{связ.} = HCl_{общ.} - HCl_{своб.}$$

Общая кислотность (ОК):

$$K \square 10$$

$$OK \square \frac{K \square 10}{0,5}$$

где k – количество 0,01N NaOH, пошедший на титрование до

3 пункта.

Пример расчета Первая

порция (первая колба):

1. 1,5мл 0,1 н. NaOH (желто-розовый цвет). Свободная соляная кислота— $1,5 \square 20 = 30$ титр. ед. (30 ммоль/л).

2. 2,6 мл 0,1 н. NaOH (красный цвет).

Общая кислотность — $2,6 \times 20 = 52$ титр. ед. (52 ммоль/л). Вторая порция (вторая колба): 2 мл 0,1 н. NaOH (фиолетовый цвет).

Все вещества, дающие кислую реакцию, кроме связанной соляной кислоты, $2,0 \times 20 = 40$ титр. ед. (40 ммоль/л).

Связанная соляная кислота — $52 - 40 = 12$ титр. ед. (12 ммоль/л).

Нормальные величины: свободная соляная кислота — 20—40 титр. ед. (20—40 ммоль/л), общая кислотность — 40—60 титр. ед. (40—60 ммоль/л), связанная соляная кислота — 4—20 титр. ед. (4—20 ммоль/л).

Таблица. Определение кислотности желудочного сока

Объем жидкости, взятой для анализа	натрия, израсходованного на титрование, мл			Количество титрационных единиц (ммоль/л)		
	до желто-розового цвета	до красного цвета	до фиолетового цвета	свободная кислота	общая кислотность	связанная кислота

Количество 0,1н. раствора гидроксида

Диагностическое значение: Общая кислотность желудочного сока может как повышаться (гиперацидное состояние), так и снижаться (гипоацидное), вплоть до исчезновения (анацидное состояние). Гиперацидное состояние вызывается в основном избытком свободной соляной кислоты, т.е. возникает гиперхлоргидрия. Снижение НСІ в желудочном соке — это гипохлоргидрия, отсутствие — ахлоргидрия. Изменение кислотности желудочного сока имеет место при язвенной болезни, гастритах, при раке, злокачественном малокровии.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Гидролиз белков. Протеолитические ферменты желудочного сока.
2. Состав желудочного сока. Роль соляной кислоты в переваривании белков.
3. Какова роль энтеропептидаз и экзопептидаз ЖКТ?
4. Проферменты ферментов ЖКТ.
5. Общая характеристика процесса «гниения белков» в толстом кишечнике. Причины и последствия этого процесса. Вещества, образующиеся при гниении белков.
6. Реакции превращения аминокислот под действием ферментов микрофлоры толстого кишечника: о реакции образования крезол и фенола; о реакции образования скатола и индола; о реакции образования кадаверина и путресцина; о источниках метилмеркаптана и сероводорода.
7. Обезвреживание в печени токсичных продуктов гниения белков в толстом кишечнике: микросомальное окисление и реакции конъюгации. Какие ферменты участвуют в микросомальном окислении? Строение УДФ-глюкуроновой кислоты (УДФГК) и фосфоаденозинфосфосульфата (ФАФС). Примеры реакций, в том числе образование животного индикана.
8. Качественные реакции на свободную соляную кислоту. Принцип методов. Нормальная величина pH желудочного сока, клинко-диагностическое значение определения pH в желудочном соке.

9. Качественная реакция на молочную кислоту в желудочном соке. Принцип метода и нормальные показатели. Клиникодиагностическое значение.
10. Обнаружение крови в желудочном соке. Принцип метода. Нормальные показатели. Клинико-диагностическое значение.

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

Перечень основной литературы:

1. Биохимия : учебное пособие / В. В. Лелевич, И. О. Леднева, Н. Э. Петушок, А. Г. Виницкая ; под редакцией В. В. Лелевича. — Гродно : ГрГМУ, 2022. — 412 с. — ISBN 978-985-595-696-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/283535>
2. 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>
3. Шахристова, Е. В. Лекции по биохимии для студентов лечебного и педиатрического факультетов : учебное пособие / Е. В. Шахристова, Е. А. Степовая, О. Л. Носарева. — Томск : СибГМУ, 2022. — 285 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/283445>

Перечень дополнительной литературы:

1. Биологическая химия : учебное пособие / Д. А. Беева, Р. А. Мукожева, А. А. Беев, М. М. Мурзаканова. — Нальчик : КБГУ, 2022 — Часть 2 — 2022. — 115 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/293462>
2. Биохимические функции витаминов. Классификация и номенклатура ферментов : учебное пособие / Е. В. Шахристова, Е. А. Степовая, О. Л. Носарева, А. А. Садыкова. — Томск : СибГМУ, 2020. — 89 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/276308>
3. Биохимия витаминов и низкомолекулярных антиоксидантов : учебное пособие / Е. Н. Лебедева, М. М. Павлова, Л. В. Амелина [и др.] ; под редакцией А. В. Сгибнева. — Оренбург : ОрГМУ, 2022. — 138 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/340532>
4. Биохимия и основы патологии липидного обмена : учебное пособие / составители А. В. Еликов, П. И. Цапок. — Киров : Кировский ГМУ, 2014. — 131 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/136050>
5. Биохимия почек и мочи : учебно-методическое пособие. — Оренбург : ОрГМУ, 2019. — 50 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/161661>
6. Болдырева, Ю. В. Сборник тестовых заданий по биологической химии : учебное пособие / Ю. В. Болдырева. — Тюмень : ТюмГМУ, 2023. — 207 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/415028>
7. Лабораторный практикум по биохимии : учебное пособие / О. Л. Носарева, Е. А. Степовая, Т. С. Федорова [и др.]. — 2-е изд. — Томск : СибГМУ, 2016. — 201 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/105908> (дата обращения: 10.02.2025).
8. Сборник тестов по биохимии для студентов лечебного и педиатрического факультетов : учебное пособие / Е. А. Степовая, Е. В. Шахристова, О. Л. Носарева [и др.]. — Томск : СибГМУ,

2017. — 127 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. —

URL: <https://e.lanbook.com/book/113514>

9. Словарь биохимических терминов : учебное пособие / В. Г. Соловьев, С. П. Калашникова, Л. Г. Никонова, М. А. Гагаро. — Ханты-Мансийск : Ханты-Мансийская ГМА, 2019. — 36 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. —

URL: <https://e.lanbook.com/book/247175>

10. Шатова, О. П. Биохимия соединительной ткани : учебное пособие / О. П. Шатова ; под редакцией А. В. Шестопалова. — Москва : РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2020. — 56 с. —

ISBN 978-5-88458-474-7. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. —

URL: <https://e.lanbook.com/book/175220>

11. Ясько, М. В. Химия нуклеиновых кислот. Матричные биосинтезы : учебное пособие / М. В. Ясько, В. И. Бахтаирова, И. Э. Егорова. — Иркутск : ИГМУ, 2016. — 59 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. —

URL: <https://e.lanbook.com/book/158723>

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 «Биохимия»

Введение

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

Целью данного пособия является формирование общепрофессиональных компетенций будущего специалиста по направлению подготовки 31.05.01 Лечебное дело

Знания, полученные в ходе освоения дисциплины, применяются при изучении дисциплин «Патологическая физиология, клинических дисциплин, при прохождении практики, а также в дальнейшей профессиональной деятельности.

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

В ходе организации самостоятельной работы решаются следующие задачи:

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

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

Общая характеристика самостоятельной работы студента при изучении дисциплины «Биохимия»

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

В ходе организации самостоятельной работы решаются следующие задачи:

- Показать связь между структурой и функцией белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов; биологическое значение витаминов.
- Сформировать у студентов представления о процессах переноса и реализации генетической информации, нарушение которых приводит к наследственным заболеваниям человека; основах биоэнергетики; метаболических путях и основных механизмах регуляции обмена углеводов, липидов, аминокислот, нуклеотидов. □ Ознакомить со способами

обезвреживания токсических веществ в организме, применяя знания механизмов обезвреживания эндогенных веществ и чужеродных соединений.

- Обучить технике современного биохимического анализа, методам оценки и выбору методов анализа, адекватных поставленной задаче.

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

Методические рекомендации по изучению теоретического материала

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

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

Методические указания по подготовке к лабораторным занятиям

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

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

Методические рекомендации по подготовке к индивидуальным заданиям

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

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

Методические рекомендации при подготовке к докладам

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

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

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

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

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

Методические указания
для обучающихся по выполнению курсовых работ по дисциплине
«Биохимия»

Пояснительная записка

В соответствии с программой обучения студентов по специальности 31.02.01 Лечебное дело и 34.02.01 Сестринское дело каждый студент пишет курсовую работу по проблематике одной или нескольких дисциплин/ профессиональных модулей. Курсовая работа — одна из важных форм обучения студента. В процессе выполнения курсовой работы студент приобретает навыки самостоятельной научной работы, осваивает современные методы ведения исследовательской деятельности, учится работать с литературой и нормативными актами, развивает творческое мышление и умение аргументировано отстаивать свою точку зрения. Одним из главных итогов работы студента является усвоение им основных достижений современной науки по избранной теме. Нередко курсовая работа становится основой для написания в будущем выпускной квалификационной работы.

Цели курсовой работы:

1. Систематизация и углубление теоретических и практических знаний по дисциплинам/ профессиональным модулям специальностей 31.02.01 Лечебное дело, 34.02.01 Сестринское дело их применение при решении поставленных задач.
2. Приобретение навыков самостоятельной работы по применению теоретических знаний на практике.
3. Владение методикой исследования в различных областях науки. Важной особенностью курсовой работы является комплексный, всесторонний подход к повышению уровня и качества подготовки специалистов-медиков, способных творчески и углубленно заниматься познавательной деятельностью, уметь обобщать, делать выводы и внедрять полученные результаты в практику здравоохранения.

Этапы написания курсовой работы

Первый этап

— подготовительный, включает в себя разработку программы исследовательской деятельности;

— выбор темы курсовой работы и утверждение ее руководителя;

— изучение методических рекомендаций по выполнению курсовой работы;

— составление плана курсовой работы и обсуждение его с руководителем (план составляется на основе анализа имеющихся материалов);

— составление списка литературы по теме курсовой работы. Тема курсовой работы должна быть актуальной, как в научном, так и в практическом отношении. Студент может сам предложить заинтересовавшую его тему, либо выбрать из списка предложенных преподавателями тем. В процессе работы возможна корректировка темы исследования. Студент составляет и согласовывает с научным руководителем график консультаций. В процессе написания курсовой работы студент должен показать умение использовать общетеоретические, методологические и специальные знания по выбранной проблематике. Успешность курсовой работы во многом зависит от правильного алгоритма выполнения всех этапов исследования. При определении круга источников студент с помощью руководителя составляет первоначальный список литературы (источников) по теме работы. Затем студент ведет самостоятельный поиск литературы в справочно-библиографическом отделе библиотеки, а также в сети Internet. Важно выявить наиболее полный круг источников, что позволит комплексно исследовать тему. На основе проведенного поиска составляется список источников, который в процессе работы над темой может изменяться и дополняться.

Второй этап включает в себя:

— определение методов исследования (анкетирование, интервьюирование, анализ отчетных документов, историй болезни, наблюдение и др.), базы исследования.

- изучение методических и специальных литературных источников, составление литературного обзора (работа с каталогами библиотек, библиографическими указателями) 5 – изучение теории и истории вопроса, опыта решения данной проблемы на практике и анализ базовых понятий (понятия, на которых строится исследование). Написание первой (теоретической) главы.
- Написание Введения к курсовой работе.

При работе с литературой рекомендуется следующий порядок: прочитать титульный лист и оглавление, затем ознакомиться с предисловием, введением, заключением книги. В оглавлении важно отметить те разделы и параграфы, которые представляют интерес для раскрытия темы. В предисловии можно найти ответы на такие вопросы, как цель написания книги, основные направления исследования, общий характер работы. Целесообразно при ознакомлении делать выписки, обращая внимание на внешние признаки в тексте.

Рекомендуется основные источники прочитать дважды. Первое чтение должно быть более глубоким, сплошным, а повторное – просмотрным, выборочным. Читая монографии, необходимо проводить анализ и синтез прочитанного, сопоставлять ранее известное с новыми данными. Затем необходимо выразить свое критическое отношение к изучаемому материалу. Важным этапом написания курсовой работы является правильное конспектирование. Существует несколько способов записи: аннотация, план, выписка цитат, тезисы, конспект. Наиболее полно изученную литературу отражает конспект.

Конспектировать лучше на отдельных листах, озаглавленных для каждого вопроса курсовой работы. Запись ведется таким образом, чтобы часть правой стороны листа оставалась свободной для заметок, которые вносятся при последующей проработке источника литературы, и для изложения собственных мыслей и критических замечаний.

Различают три вида конспектов: систематический, свободный и тематический, или сводный конспект. Систематическим называется такой конспект, в котором фактический материал излагается в последовательности книги. В свободном конспекте запись делается по плану курсовой работы. В тематическом конспекте обобщается содержание нескольких источников. Самым продуктивным и сложным является тематический конспект. После того, как работа с источниками завершена, необходимо проанализировать и систематизировать весь материал.

Третий этап – основной, включает:

- проведение собственных исследований;
- систематизация и первичная обработка материала; 6
- обсуждение полученных результатов исследований с обоснованием каждого вывода с руководителем; – сравнение полученных результатов с поставленными целями и задачами, литературными данными;
- подготовка общих выводов по теме курсовой работы, предложений и рекомендаций.
- Написание второй главы.

Четвертый этап — итоговый, предполагающий оформление результатов, включает в себя:

- написание Заключения;
- окончательное оформление курсовой работы;
- составление отзыва руководителем; – подготовка презентации к защите; – защита курсовой работы.

План курсовой работы

После ознакомления с первоначальным кругом источников студент составляет план курсовой работы и согласовывает его с руководителем. Этот план, по мере накопления материала, может быть в дальнейшем уточнен, дополнен и даже изменен. Окончательный вариант плана составляется тогда, когда круг источников по теме определен наиболее полно. План —

логическая основа работы, он позволяет систематизировать собранный материал. Названия глав формулируются таким образом, чтобы тема была раскрыта полно и последовательно. Каждая глава должна быть разделена на подразделы. Следует избегать дублирования в названиях подразделов или формулировок, выходящих за рамки исследования. Обычно работа состоит из двух глав, но если этого требуют интересы исследования, то их количество может быть больше двух.

Работа с теоретическим материалом

Определив круг источников, составив план, студент переходит к углубленному изучению материала. Начинать изучение темы лучше всего с чтения соответствующих разделов учебников. Затем следует переходить к чтению более сложного материала - общей и специальной литературы. Читая материал, надо стараться извлечь из него только такую информацию, которая необходима для работы.

Во время чтения уясняются все незнакомые термины. Для этого используются словари и справочники. 7 В процессе работы возникает необходимость сделать какие-либо сноски. При этом целесообразно сноски делать на отдельном листе бумаги. На каждом листе должны быть указаны полные и точные данные источника, из которого сделана выписка (фамилия и инициалы автора, название работы, место и год издания, номер страницы и т.п.). Проведя такую предварительную и, пожалуй, наиболее трудоемкую работу, можно переходить к написанию отдельных подразделов курсовой работы. Обычно в первой части главы излагают общую постановку вопроса, а затем переходят к рассмотрению его отдельных сторон. Изложение материала должно быть логичным, последовательным, а выводы — обоснованными. Изложение материала следует стремиться к ясности языка, четкости стиля, необходимо также избегать повторов. Для подтверждения собственных мыслей автор может использовать цитаты из различных источников.

При этом любая цитата должна быть приведена со ссылкой на источник. Ссылаться на источник нужно и тогда, когда в тексте курсовой работы приводятся конкретные цифры, факты, схемы и т.п. из других работ. Завершая параграф необходимо сформулировать вывод, который вытекает из содержания данного раздела. Это потом пригодится и при написании заключения. Окончив работу над всеми параграфами, их перечитывают целиком. Это позволит выявить повторы, противоречия, нарушения логики. Здесь вносятся в текст необходимые дополнения и изменения, восполняются пробелы, осуществляется редактирование, проверяются сноски и т.п.

Написание Введения и Заключения

После написания подразделов работы следует приступить к подготовке введения, в котором должна быть обоснована актуальность избранной темы, показано ее теоретическое и практическое значение, а также приведена краткая характеристика степени разработанности избранной темы в современной науке. Во введении также формулируются цели и задачи работы, предмет и объект, а также методы исследования. Подготовка введения требует внимания потому, что в нем в концентрированной форме представлены основные идеи курсовой работы.

Актуальность исследования содержит положения и доводы, свидетельствующие в пользу научной и прикладной значимости решения проблемы, исследуемой в курсовой работе. При написании этой части 8 введения следует воспользоваться обоснованием актуальности темы курсовой работы в процессе выбора и утверждения темы. Актуальность может раскрываться через статистические данные за последние три года по теме исследования, ссылки на нормативно-правовые документы системы здравоохранения. Цели и задачи исследования содержат формулировку главной цели, которая видится в решении основной проблемы курсовой работы.

Цель работы — это решение проблемы, ответ на вопрос, который был сформулирован в разделе «актуальность». Цель не должна формулироваться как процесс (например: изучение последствий абортов), а как результат (например: провести анализ..., определить влияние..., доказать..., выявить основные...).

Она должна быть достижима и проверяема. В соответствии с основной целью следует выделить 2-3 целевые задачи, которые необходимо решить для достижения главной цели исследования. Формулирование задач исследования полезно еще и в том отношении, что каждая из крупных целевых задач способна формировать отдельную главу курсовой работы. Задачи вытекают из цели: «Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи» и формулируются в виде глаголов: изучить, доказать, показать, выявить, определить, провести мониторинг и т.д. Задачи определяют структуру работы. В идеале — 1 задача = 1 главе курсовой работы.

Пример Тема: Реализация программы модернизации здравоохранения Красноярского края на территории г. Минусинска Цель работы: определить эффективность реализации программы модернизации здравоохранения на территории Красноярского края. Поставленная цель определяет следующий круг задач: – Рассмотреть основные положения Программы модернизации здравоохранения Красноярского края. – Изучить этапы реализации Программы в Красноярском крае. – Выявить основные перспективы развития Программы на территории Красноярского края Объект исследования представляет область научной работы, в пределах которой выявлена и существует исследуемая проблема (Например, тема курсовой работы «Реализация национального проекта «Здоровье» в Минусинском районе», объектом является «национальный проект «Здоровье») Предмет исследования более конкретен, чем объект. Именно на предмет исследования ориентируется курсовая работа, вследствие чего он непосредственно отражается в теме курсовой работы.

Благодаря его формулированию в курсовой работе из общей системы, представляющей объект исследования, выделяется часть системы или процесс, протекающий в системе, являющийся непосредственным предметом исследования. (например: «итоги реализации проекта «Здоровье»). Завершающим этапом является подготовка заключения, излагаются основные выводы, вытекающие из содержания работы. В заключении курсовой работы обычно отмечается как выполнены задачи и достигнута ли цель, поставленная во введении, содержатся основные результаты проведенного исследования, а также выводы, сделанные автором на их основе. Выводы должны соответствовать поставленным задачам, допускается несколько выводов на одну задачу. Обосновывается, какие следствия, вплоть до их практического или теоретического использования, можно получить из данной работы.

Количество выводов не должно быть меньше поставленных задач. Выводы должны быть четкими, ясными, отражать полученные результаты. По сделанным выводам необходимо сделать рекомендации с возможностью их применения на практике. Заключение, как правило, не должно превышать 2-3 страниц. 5.

Методы исследования

Одна из классификаций методов исследования:

1. Анализ представляет собой расчленение явления или процесса на составные части (некоторые свойства, признаки и т.д.) и их разностороннее изучение. Этот метод исследования, бесспорно, является самым часто используемым при написании курсовых работ и ВКР.
2. Аналогия – это метод научного познания, который основан на сходстве объектов исследования по некоторым признакам. При этом на основании признаков одного объекта выводится заключение о сходстве по другому объекту.
3. Дедукция – метод исследования, при котором по множеству частных признаков делается заключение об общей совокупности исследуемых признаков.
4. Индукция – способ рассуждения, обратный дедукции, то есть от общего к частному.

5. Классификация представляет собой деление изучаемых объектов на несколько отдельных групп в зависимости от какого-либо признака.
6. Моделирование – создание и исследования копии или модели исследуемого объекта, которая имитирует оригинал. При этом модель должна соответствовать объекту исследования в изучаемых свойствах, но может отличаться по ряду некоторых признаков, что обуславливает удобство модели при исследовании изучаемого признака или объекта.
7. Наблюдение – это метод научного познания, состоящий из действий, направленных на восприятие явлений действительности. При использовании наблюдения получают информацию о свойствах и отношениях исследуемых объектов.
8. Метод обобщения похож на метод дедукции. При применении этого метода научного познания делаются выводы об общих свойствах исследуемых объектов.
9. Метод прогнозирования представляет собой заключение о тенденциях развития исследуемого объекта.
10. Синтез наряду с анализом также часто используется при написании курсовых работ и ВКР. Данный метод состоит в соединении некоторых исследуемых признаков или свойств объекта в единое целое.
11. Эксперимент – это испытание изучаемых признаков в и управляемых исследователем условиях.

Список литературы

В конце курсовой работы должен быть приведен список литературы. Список литературы в алфавитном порядке должен содержать следующие источники: – Монографии и учебники — указывается фамилия(и) автора(ов), полное наименование работы, место издания, название издательства, год издания. – Научные статьи — указывается автор(ы), полное название статьи, наименование источника, год выпуска, номер издания. – Интернет-ресурсы. Если источник опубликован под редакцией автора, то сначала указывается название источника, затем - фамилия ответственного редактора.

Список литературы должен содержать только те источники, которые были использованы автором при написании работы. При использовании материалов сети Internet должен быть указан полный Ip-адрес источника. 11

Оформление курсовой работы

Титульный лист оформляется по образцу (приложение 1). На второй, следующей за титульным листом, странице помещается план работы. На последующих страницах идет текст основных глав и подразделов работы. Затем - заключение, приложения (если имеются) и список литературы. Каждый подраздел работы должен начинаться с заглавия (названия). Необходимо правильно оформить научный аппарат.

Каждая цитата, цифра, факт на каждой странице должны сопровождаться ссылкой на источник этой информации (например: □3, С.34□). Ссылка на источник оформляется по тем же правилам, что и список литературы с обязательным указанием страницы источника. Приложения размещаются после списка литературы. Как правило, в приложения выносятся большие таблицы, схемы, вопросы анкеты, алгоритмы выполнения манипуляций, иллюстрации и проч. Каждое приложение должно быть пронумеровано и начинаться с новой страницы. Особое внимание при написании работы необходимо уделить правильному ее оформлению! Курсовая работа должна быть отредактирована и тщательно вычитана. Оформление работы должно отвечать действующим требованиям к изложению текстов. Общий объем работы не должен превышать 30-40 страниц компьютерного текста, выполненного на одной стороне листа формата А4. Текст печатается через 1,5 интервала. Используется шрифт Times New Roman черного цвета, кегль - 14.

Напечатанный текст должен иметь поля: верхнее - 20 мм, правое - 10 мм, левое - 30 мм, нижнее - 20 мм. Страницы должны иметь сквозную нумерацию, включая приложения (номер указывается в центре нижнего поля), при этом титульный лист считается первой страницей,

содержание – второй, введение – третьей и так далее. Номер страницы на титульном листе не проставляется. Таблица должна иметь заголовок, который помещается под словом «Таблица» в центре.

Защита курсовой работы

После полного завершения курсовая работа в установленные сроки представляется руководителю для написания отзыва. В отзыве руководитель делает вывод о готовности работы к защите. Курсовая работа в завершённом виде должна быть представлена руководителю не позднее, чем за две недели до установленного срока защиты курсовой работы. Не допускаются к защите и возвращаются для повторного написания: – курсовые работы, полностью или в значительной степени выполненные не самостоятельно; – работы, в которых выявлены существенные ошибки, недостатки, свидетельствующие о том, что основные вопросы темы не усвоены; – работы, характеризующиеся низким уровнем грамотности и небрежным оформлением.

К числу основных недостатков, которые следует учесть каждому студенту, можно отнести: – отсутствие убедительных доказательств, обоснований, выводов и рекомендаций; – нарушение последовательности изложения, частые повторения, нечеткие формулировки, оговорки, грамматические ошибки; – отсутствие четкости в определении основного содержания курсовой работы. При защите курсовой работы студент должен кратко изложить её основное содержание, охарактеризовать использованные источники, сформулировать основные выводы и предложения, ответить на вопросы руководителя и других присутствующих на защите лиц. Отведенное время для защиты курсовой работы 5-7 минут.

Курсовая работа оценивается с учётом качества её написания и результатов защиты: «отлично», «хорошо», «удовлетворительно», «неудовлетворительно». При определении оценки курсовой работы учитываются:

- степень разработки темы;
- полнота охвата научной литературы;
- использование данных российского и зарубежного опыта медицинской практики;
- правильность и научная обоснованность выводов;
- аккуратное оформление курсовой работы.

Возможные критерии оценки:

- «отлично» выставляется студенту, показавшему глубокие знания, применённые им при самостоятельном исследовании избранной темы, способному обобщить практический материал и сделать на основе анализа выводы;
- «хорошо» выставляется студенту, показавшему в работе и при её защите полное знание материала, всесторонне осветившему вопросы темы, но не в полной мере проявившему самостоятельность в исследовании;
- «удовлетворительно» выставляется студенту, раскрывшему в работе основные вопросы избранной темы, но не проявившему самостоятельности в анализе или допустившему отдельные неточности в содержании работы;
- «неудовлетворительно» выставляется студенту, не раскрывшему основные положения избранной темы и допустившему грубые ошибки в содержании работы, а также допустившему плагиат.

При получении неудовлетворительной оценки работа должна быть переработана с учетом высказанных замечаний и представлена на защиту в сроки, установленные руководителем. Оценка за курсовую работу выставляется преподавателем, под руководством которого была выполнена курсовая работа, после защиты на титульном листе работы, в зачётную книжку и в ведомость. После защиты курсовые работы хранятся в течение двух лет.

Вопросы и темы, которые можно использовать для написания курсовых работ

ВВЕДЕНИЕ В БИОХИМИЮ. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ВОПРОСЫ КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

АМИНОКИСЛОТЫ И ПЕПТИДЫ ВОПРОСЫ

1. Напишите структурную формулу тетрапептида (Н) тир-глу-гли-вал (ОН) и последовательно подействуйте на него химотрипсином и карбоксипептидазой А. Назовите образовавшиеся продукты реакций.
2. Напишите структурные формулы всех аминокислот состава $C_3H_7NO_2$ и назовите их.
3. Приведите структурные формулы всех аминотрикарбоновых кислот.
4. Напишите изомерные аминокислоты, отличающиеся строением скелета.
5. Приведите примеры аминокислот, у которых преобладают: а) кислотные свойства; б) основные свойства.
6. Напишите уравнения реакций, доказывающих амфотерность аланина.
7. Приведите уравнение реакции образования соединений с пептидной связью.
8. Сколько дипептидов может быть получено из трех аминокислот.
9. Сколько трипептидов может быть получено из двух аминокислот?

10. Напишите, какие аминокислоты можно получить, замещая один из атомов водорода в метильной группе аланина различными группировками.
11. Напишите химические формулы гетероциклических аминокислот. Дайте им названия по тривиальной и рациональной номенклатурам. Укажите, какие реакции возможны по радикалам названных аминокислот.
12. Напишите и дайте название тетрапептиду из валина, лизина, глутаминовой кислоты и триптофана.
13. Объясните принципы цветных реакций на белки и аминокислоты: биуретовой, нингидриновой, ксантопротеиновой, на тирозин, на серосодержащие аминокислоты.
14. Напишите тетрапептид

Асн-фен-глу-гис	Тир-цис-лиз-вал	Вал-три-гли-арг
-----------------	-----------------	-----------------
15. Напишите тетрапептид

Ала-тир-лиз-глу	Гис-ала-лиз-мет	Асп-гис-тир-тре
-----------------	-----------------	-----------------
16. Напишите тетрапептид

Асп-вал-мет-сер	Тре-цис-глу-иле	Лей-лиз-три-асп
-----------------	-----------------	-----------------
17. Напишите тетрапептид

Гис-асп-ала-лиз	Глу-мет-лей-ала	Фен-тре-гли-цис
-----------------	-----------------	-----------------
18. Напишите названия и формулы всех трипептидов, которые можно получить из следующих аминокислот: глицина, фенилаланина, лейцина. (В молекулу трипептида можно брать каждую из названных аминокислот только по одному разу).
19. Напишите химические формулы серосодержащих аминокислот и дайте им названия по тривиальной и рациональной номенклатурам. Укажите, какие реакции возможны по радикалам названных аминокислот.
20. Напишите названия и формулы всех трипептидов, которые можно получить из следующих аминокислот: валина, триптофана, аспарагиновой кислоты. (В молекуле трипептида можно брать каждую из аминокислот только по одному разу.)
21. Напишите реакцию взаимодействия с азотистой кислотой ряда аминокислот: а) оксализина; б) тирозина; в) глицина.
22. Напишите реакцию взаимодействия аминокислоты с формальдегидом.
23. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$. А. Содержание углерода (%) в белках. Б. Содержание азота (%) в белках.
24. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.
 А. Содержание отрицательно заряженных групп в молекуле аминокислоты в изоэлектрической точке. Б. Содержание положительно заряженных групп в молекуле аминокислоты в изоэлектрической точке.
25. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$. А. Растворимость альбуминов в воде. Б. Растворимость глобулинов в воде.
26. Фосфопротеиды содержат в качестве небелковой части остаток фосфорной кислоты, которая образует сложноэфирные группировки за счет гидроксильных групп серина, треонина, тирозина, входящих в состав полипептидной цепи. Напишите схему реакций присоединения фосфорной кислоты к следующим фрагментам рибонуклеазы: а) Сер-Гли-Тре-Сер-Глу; б) Тир-Лпз-Сер-Гли-Тре.

27. Напишите уравнения реакций синтеза следующих дипептидов: а) глицилглицина, б) аланилвалина, в) глициллейцина, г) валилсерина.
28. Напишите уравнения реакций синтеза следующих трипептидов: а) глицилаланилаланина, б) глицилглицилаланина, в) аланилцистеинилвалина, г) изолейцилвалилглутамин.
29. Сколько различных трипептидов можно синтезировать из аминокислот глицина, валина и серина, если использовать каждую аминокислоту только один раз?
30. Какое из указанных веществ является пептидом? Дайте ему название: а) $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ б) $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ в) $\text{CH}_3-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ г) $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$.
31. Напишите и назовите формулы дипептидов, которые могут быть получены из аминокислот: а) треонина и цистеина, б) фенилаланина и аспарагина, в) аргинина и лейцина.
32. Напишите формулы следующих трипептидов:
а) аланилглицилаланина, б) лейцилглицилаланина, в) аланиллейцилглицина.
33. Напишите названия и формулы всех трипептидов, которые можно получить из следующих аминокислот: а) аланин, аланин, аланин, б) глицин, глицин, аланин, в) глицин, лейцин, аланин. В молекулу три пептида можно брать каждую из названных трех молекул только по одному разу.
34. Напишите структурную формулу тирозина. Дайте название этой аминокислоте по номенклатуре ИЮПАК.
35. Напишите формулу метионина. Название аминокислоты по номенклатуре ИЮПАК.
36. Напишите структурную формулу пентапептида следующего строения: Цис - Арг - Фен - Глу - Три.

БЕЛКИ, СВОЙСТВА, СТРОЕНИЕ, СТРУКТУРЫ Вопросы

1. Что такое белок и какова его биологическая роль? Как связаны аминокислоты между собой в молекуле белка?
2. В каких пределах варьируется молекулярный вес белков? Методы определения молекулярного веса белков.
3. Какие свойства положены в основу классификации белков?
4. Назовите связи, стабилизирующие первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры.
5. Чем обусловлены реакции осаждения белков? При каких температурных условиях возможно осаждение белков?
6. Что такое изоэлектрическая точка? Почему она различна у разных белков? Назвать белки основного и кислого характера.
7. Что такое денатурация и ренатурация? Чем может быть вызвана денатурация белков?
8. Методы количественного определения аминокислот.
9. При помощи каких цветных реакций можно установить различные аминокислоты?
10. Классификация аминокислот. Физические свойства аминокислот. Химические свойства аминокислот.
11. Очистка белков от низкомолекулярных примесей.
12. Теоретические основы хроматографического разделения аминокислот.

13. Какими методами можно освободить раствор белка от низкомолекулярных веществ? Как доказать, что при диализе белок остается в целлофановом мешочке, а ионы соли находятся в диализирующей жидкости?
14. Физические свойства белковых веществ.
15. Способы гомогенизации биологического материала. Как осуществляется экстракция белков? Методы фракционирования белков. Методы очистки белков.
12. Какие существуют группы сложных белков? Какова их роль в организме и где они встречаются?

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ Вопросы

1. Перечислите основные отличия РНК от ДНК.
 2. Какие продукты образуются при: а) частичном; б) полном гидролизе нуклеиновых кислот?
 3. Какой из нуклеозидов имеет наименьшее число атомов кислорода в молекуле? Напишите его структурную формулу.
 4. Какой из нуклеотидов имеет наименьшее число атомов кислорода в молекуле? Напишите его структурную формулу.
 5. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А к Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$.
А. Содержание ДНК в ядре. Б. Содержание ДНК в других субклеточных структурах.
 6. Напишите формулы следующих нуклеозидтрифосфатов: а) ГТФ - гуанозинтрифосфат, б) УТФ - уридинтрифосфат, в) ЦТФ - цитидинтрифосфат.
 7. Напишите уравнение реакции кислотного гидролиза аденозин-5-трифосфата в соответствии со схемой: $АТФ \rightarrow \text{пирофосфат} + \text{аденин} + \text{рибозо-5-фосфат}$.
 8. Мононуклеотиды под влиянием ферментов отщепляют или присоединяют фосфатные группы. Под влиянием аденилаткиназы идет реакция: $АТФ + АМФ \rightarrow 2АДФ$ Напишите полное уравнение этой реакции.
 9. Нуклеотиды под влиянием ферментов подвергаются гидролизу. Аденозинмонофосфат при участии фермента АМФ-нуклеозидазы образует аденин и D-рибозо-5-фосфат. Напишите уравнение этой реакции.
 10. Нуклеотиды под влиянием ферментов распадаются, при этом отщепляются остатки фосфорной кислоты и получаются соединения, состоящие из основания и углевода. Такие вещества: из гуаниловой - гуанозин, из цитидиловой - цитидин, из уридиловой - уридин. Напишите формулы названных нуклеозидов.
 11. При кислотном гидролизе нуклеозидов: аденозина, гуанозина, цитидина и уридина образуются основания (соответственно аденин, гуанин, цитозин, урацил) и D-рибоза. Напишите уравнения этих реакций.
 12. Нуклеозиды и основания, входящие в состав мононуклеотидов, подвергаются гидролизу при воздействии на них соответствующих ферментов. При этом выделяется аммиак. Напишите уравнения реакций гидролиза оснований:
- а) цитозин + $H_2O \rightarrow$
 - б) аденин + $H_2O \rightarrow$
 - в) гуанин + $H_2O \rightarrow$
13. Напишите уравнение реакции гидролиза аденозина в соответствии со схемой:
 $\text{аденозин} + H_2O \rightarrow \text{инозин} + NH_3$
 14. Напишите уравнение реакции гидролиза цитидина в соответствии со схемой:

цитидин + H₂O → уридин + NH₃

15. Напишите уравнение реакции гидролиза гуанозина в соответствии со схемой: гуанозин + H₂O → ксантозин + NH₃
16. Напишите формулы следующих моонуклеотидов: а) инозин-5-фосфат, б) ксантозин-3-фосфат, в) тимидин-3-фосфат.
17. Напишите уравнения реакций распада моонуклеотида в соответствии со схемой: аденозин → гипоксантин → мочевая кислота.
18. Напишите в двух таутомерных формах каждое из следующих оснований: гуанин, урацил, тимин и цитозин.
19. В составе моонуклеотидов встречаются две пентозы: D-рибоза и D-дезоксирибоза. Напишите их формулы.
20. Напишите формулу моонуклеотида, в котором основанием является урацил, а углеводом дезоксирибоза.
21. Напишите формулу динуклеотида, входящего в состав ДНК, в котором в качестве оснований были бы аденин и гуанин.
22. Для удобства написания формул нуклеозидов пользуются их сокращенными буквенными обозначениями: А - аденозин, Г - гуанозин, Т - дезокситимидин, Ц - цитидин, У - уридин. Напишите используя условное написание для нуклеозидов и обозначая остаток фосфорной кислоты буквой р (малое), полинуклеотидную цепочку записывают в таком виде: рАрЦрЦрТрАрГрА.
23. Напишите формулу фрагмента ДНК, выраженную сокращенной формулой - рАрЦрТ, и схему реакции расщепления этого фрагмента до нуклеозидов.

ВИТАМИНЫ Вопросы

1. Предскажите химические свойства ценного фармацевтического сырья — никотиновой кислоты. Напишите по одному уравнению реакции, характеризующий свойства функциональной группы, гетероатома и ароматической системы.
2. Сколько изопреновых единиц содержится в молекуле:
а) β-каротина; б) витамина Е; в) витамина А.
3. Что такое витамины? Когда и кем они открыты? Классификация витаминов.
4. Какие витамины относятся к группе жирорастворимых? Примеры.
5. Какова структура витаминов группы "А" и их физико-химические свойства? Какие из известных провитаминов обладают наибольшей активностью витамина А и как они используются в организме?
6. Витамин D, его химическое строение, биологическая роль, источник и провитамины. Какие стероиды и при каких условиях синтезируются в организме? Какие витамины группы "D" в организме?
7. Каковы физико-химические свойства никотиновой кислоты?
8. Каково строение рибофлавина? Его распространение в природе и участие в обмене веществ?
9. Какова химическая природа тиамина? Пищевые источники этого витамина.
10. Какие свойства аскорбиновой кислоты и 2,6-дихлорфенолиндофенола лежат в основе количественного определения витамина С? Почему титрование витамина С ведут в кислой среде? Какие продукты образуются при окислении витамина С?
11. В чем заключается принцип метода количественного определения витамина Р?

12. В чем биологическая роль водорастворимых витаминов?
13. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.
 А. Суточная потребность человека в витамине А. Б. Суточная потребность человека в витамине С.
14. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме $A > B$, $B > A$; $A = B$. А. Количество витаминер у витамина Д? Б. Количество витаминер у витамина К.

УГЛЕВОДЫ Вопросы

1. Укажите какие из пар сахаров представляют собой анамеры, эпимеры или пару альдозокетоза и напишите их формулы: а) α -глюкоза - β -глюкоза
 б) глюкоза – галактоза
 в) глицероальдегид - дегидроксиацетон
 г) глюкоза - манноза
 д) глюкоза – фруктоза
2. Выберите правильный ответ и напишите структурные формулы:
 Представителями пентоз являются:
 а) диоксиацетон б) рибоза
 в) сахароза г) фруктоза
3. Выберите правильный ответ и напишите структурные формулы:
 Представителями гексоз являются: а)
 целлюлоза б) глюкоза
 в) лактоза г) галактоза
4. Подберите названия к перечисленным углеводам и напишите их формулы:
 а) лактоза; б) мальтоза; в) сахароза; г) ни один из углеводов
- 1) глюкоза- α 1,2-фруктоза; 2) глюкоза- α 1,4-глюкоза; 3) фруктоза- α 1,6-галактоза; 4)
 галактоза- α 1,4-глюкоза
5. Нарисуйте проекционные формулы Фишера следующих моносахаридов:
 а) L- глюкозы; б) α - D – глюкофуранозы; в) D – галактозы; г) α - L- галактопиранозы; д) L- маннозы; е) α - D – маннопиранозы.
6. Нарисуйте формулы Хеуорса и кресловидные конформации для следующих моно и дисахаридов:
 а) α -D-глюкопиранозы; б) α -L-фруктофуранозы; в) α -L-маннопиранозы; г) O- α -L-глюкопиранозил-(1,4)- α -D-маннопиранозы; д) O- α -D-глюкофуранозил-(1,1)- α -L-галактопиранозы.
7. Почему фруктоза дает положительную реакцию с реактивом Фелинга, а сахароза нет? Приведите примеры реакций.
8. Напишите структурные формулы:
 рибозо-5-фосфата, ксилулозо-5-фосфата, глюкозо-6-фосфата, галактозо-1-фосфата, фруктозо-1,6-дифосфата.
9. Напишите структурную формулу дисахарида, состоящего из двух остатков глюкозы, связанных между собой α -1,4-гликозидной связью. Как называется этот дисахарид?

10. Какие химические реакции подтверждают тот факт, что глюкоза - вещество с двойственной химической функцией?
11. Приведите реакции, с помощью которой можно различить глюкозу и фруктозу. 12. Напишите уравнение реакции брожения глюкозы, при котором не выделяются газообразные продукты.
13. Дезоксиуглеводы - это аналоги углеводов, в которых одна группа -ОН заменена на атом водорода. Определите молекулярную формулу дезоксирибозы. Напишите уравнения ее реакций водородом и аммиачным раствором оксида серебра.
14. Приведите структурную формулу мальтозы, которая представляет собой дисахарид, образованный двумя остатками α -глюкозы связанными между собой через первый и четвертый атомы углерода.
15. Какие продукты могут образоваться при частичном и полном гидролизе крахмала.
16. На чём основаны методы определения углеводов?
17. Хроматографические основы определения углеводов.
18. Классификация углеводов. Значение углеводов для человека.
19. Дайте общую характеристику углеводов, укажите их классификацию.
20. Для какого типа строения дисахаридов - мальтозного (а) или трегалозного (б) - характерны редуцирующие свойства?
21. Дайте характеристику гомополисахаридов, назовите представителей. Напишите формулы.
22. Какие вещества относятся к гетерополисахаридам? Укажите их состав.
23. Чем объяснить, что дисахарид лактоза может существовать в двух аномерных формах, а у другого дисахарида - сахарозы - аномерных форм не обнаружено?
24. Какими особенностями строения обусловлены различия в свойствах полисахаридов целлюлозы и гликогена?
25. С помощью каких химических реакций можно из глюкозы получить фруктозу?
26. Среди углеводов различают моносахариды - соединения, не способные к гидролизу на простые составные части, и ди- и полисахариды - более сложные соединения, способные к такому гидролизу. Какие из перечисляемых ниже углеводов относятся к дисахаридам - углеводам, распадающимся при гидролизе на два моносахарида: фруктоза, мальтоза, крахмал, сахароза?
27. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $A < A$, $A = B$.
А. Количество глюкозы, полученной при гидролизе 1 моль лактозы. Б. Количество глюкозы, полученной при гидролизе 1 моль мальтозы.
28. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $A < A$, $A = B$.
А. Число α -1,4-гликозидных связей в молекуле гликогена. Б. Число α -1,6-гликозидных связей в молекуле гликогена.
29. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $A < A$, $A = B$.
А. Содержание амилозы в крахмале. Б. Содержание амилопектина в крахмале.
30. А. Что такое кольчатоцепная таутомерия? Б. Напишите формулы моносахаридов в циклической форме (проекционные формулы Хеуорса): а) пентоз; б) гексоз.
31. Напишите структурные формулы: а) α -D-глюкопиранозы; б) α -D-глюкопиранозы.
32. Напишите структурные формулы дисахаридов: а) трегалозы; б) мальтозы.

33. Напишите строение: а) амилозы; б) амилопектина; в) целлюлозы.
34. Напишите строение: а) хитина; б) гиалуроновой кислоты; в) хондроитинсульфата; г) гепарина.
35. Напишите формулы: а) D-глицеральдегид- β -фосфата; б) дигидроксиацетонфосфата.
36. Напишите структурные формулы: а) β -рибофуранозы; б) β -дезоксирибофуранозы.
37. Напишите формулы: а) D- и L-глицеринового альдегида, б) диоксиацетона.
38. Напишите формулу β - и α -рибозы. Напишите формулу дезоксирибозы в ее открытой и в циклической форме.
39. Напишите формулы β - и α -глюкозы.
40. Напишите циклические формулы (в виде формул Хеуорзса) следующих гексоз: а) фруктозы, б) маннозы, в) галактозы.
41. β -D-Фруктофураноза в растворе находится в равновесии с β -D-фруктопиранозой. Напишите обе эти формулы.
42. Важную роль в обмене играют фосфорные эфиры глюкозы. Напишите в циклической форме формулы: а) глюкозо-1-фосфата, б) глюкозо-6-фосфата.
43. При брожении дрожжевого сока накапливается эфир фруктозо-1,6-дифосфат, являющийся обязательным продуктом распада глюкозы. Напишите формулу фруктозо-1,6-дифосфата.
44. Напишите уравнение окисления мальтозы аммиачным раствором окиси церберы.
45. Напишите формулы мальтозы и целлобиозы, используя пиранозные циклы. Укажите в этих молекулах их восстанавливающиеся и невосстанавливающиеся концы.
46. Под влиянием сахаразы свекловичный или тростниковый сахар распадается на моносахариды. Напишите уравнение гидролиза свекловичного сахара.
47. Мальтоза, получаемая из крахмала, гидролизует под влиянием фермента β -глюкозидазы, образуя глюкозу. Напишите уравнение гидролиза мальтозы.
48. Сколько разных форм глюкозы вам известно? Напишите их структурные формулы. Различаются ли разные формы глюкозы составом молекул или их строением?
49. Глюкозидаза гидролизует глюкозиды: β -D-глюкозид + $H_2O \rightarrow$ спирт + D-глюкоза. Напишите уравнение гидролиза β -D-этилглюкозида.
50. Фермент трегалаза осуществляет гидролиз трегалозы: трегалоза + $H_2O \rightarrow$ глюкоза. Напишите уравнение этой реакции.
51. Напишите фрагмент молекулы крахмала (из четырех-пяти звеньев) и уравнение гидролиза крахмала до образования мальтозы. Обратите внимание на расположение кислородных мостиков и группы $-CH_2OH$ в соседних глюкозных звеньях молекулы крахмала. Укажите редуцирующийся и нередуцирующийся концы фрагмента молекулы крахмала и мальтозы.
52. Молекулы гликогена построены из звеньев глюкозы и обладают разветвленным строением. Первый атом углерода одного звена глюкозы связан с шестым атомом углерода другой цепи. У гликогена боковые цепи следуют друг за другом на расстоянии от 3 до 5 звеньев. Напишите фрагмент разветвленной формулы гликогена.
53. Лактоза - дисахарид, содержащийся в молоке, под влиянием β -глюкозидазы гидролизует до составляющих ее моносахаридов - галактозы и глюкозы. Напишите уравнение гидролиза лактозы.

ЛИПИДЫ Вопросы

1. Изобразите формулы следующих соединений: а) олеолиноленостеарин, б) пальмитохолестерин. К какой группе природных соединений относятся данные вещества? Что общего между ними и чем они отличаются друг от друга?
2. Приведите схему гидролиза триолеина.
3. Какое общее свойство объединяет вещества, относящиеся к группе липидов?
4. Перечислите основные свойства лецитина.
5. С помощью каких реакций можно обнаружить холестерин?
6. Какой химический процесс лежит в основе прогоркания жиров?
7. Определение понятия "липиды". Биологическая роль липидов. На чем основа классификация липидов?
8. От чего зависит жирнокислотный состав ацилглицеринов?
9. Характеристика фосфолипидов, какие их свойства используют при выделении?
10. Какова химическая природа желчных кислот?
11. Почему растительные масла, как правило, жидкие при комнатной температуре, а животные жиры твердые?
12. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.
А. Устойчивость восков к действию света и окислителей. Б. Устойчивость жиров к действию света и окислителей.
13. В составе триацилглицеролов имеется пальмитиновая (П), олеиновая (О) и стеариновая (С) кислоты. Укажите все возможные виды триацилглицеролов (используя сокращенные обозначения).
14. Сколько изопреновых единиц содержится в структуре: а) сквалена; б) β -каротина; в) витамина А?
15. Какие продукты образуются в результате мягкого щелочного гидролиза: а) 1-стеароил-2,3-дипальмитоилглицерола; б) 1-стеароил-2-элаидолфосфатидилинозита; в) 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидил-холина?
16. Напишите формулы следующих триглицеридов:
а) тристеарина, б) трипальмитина, в) триолеина.
17. Напишите формулы смешанных триглицеридов: а) диолеопальмитина, б) пальмитолеостеарина, в) дипальмитостеарина.
18. Молекулы нейтральных жиров могут содержать три различные жирные кислоты. Напишите формулу такого триглицерида.
19. Под влиянием катализатора (никеля или омедненного никеля) остатки непредельных кислот, входящих в состав жиров, присоединяют водород. В результате этой гидрогенизации жидкие жиры становятся твердыми. Напишите уравнения гидрирования следующих триглицеридов: а) олеодистеарина, б) диолеопальмитина, в) олеолиноленостеарина.
20. Ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав животных жиров, всегда являются только цис-изомерами. Напишите структурные формулы цис-изомеров трех непредельных кислот, входящих в состав жира.
21. Жироподобные вещества - фосфатиды являются производными фосфатидной кислоты. Сама фосфатидная кислота является производным глицерина, в котором имеются два

остатка жирных кислот и один остаток фосфорной кислоты. Напишите формулу фосфатидной кислоты.

22. Фосфатиды являются производными фосфатидной кислоты, в которых группа -ОН фосфорной кислоты образует эфир с аминоспиртами (холином, коламином) или аминокислотой. Напишите формулы следующих фосфатидов: а) лецитина (фосфатидилхолин), б) кефалина (фосфатидилколамин), в) серинфосфатида (фосфатидилсерин).
23. Напишите уравнение реакции гидролиза тристеарина.
24. Гидролиз лецитина идет в три стадии: 1) отщепление жирных кислот, 2) отщепление холина, 3) отщепление фосфорной кислоты. Напишите уравнения реакции последовательного расщепления лецитина.
25. Под влиянием некоторых ферментов (змеиного яда) от молекулы лецитина отщепляется ненасыщенная кислота и образуется лизолецитин. Он обладает сильным гемолитическим действием, разрушает эритроциты крови. Напишите уравнение реакции образования лизолецитина.
26. В пчелином воске содержится эфир пальмитиновой кислоты и мирицилового спирта. Напишите формулу этого эфира.
27. В нервных окончаниях вырабатывается ацетилхолин (медиатор - передатчик нервного возбуждения). Ацетилхолин является уксуснокислым эфиром холина. Напишите формулу ацетилхолина.
28. Главным звеном в молекуле стерина желчных кислот и других веществ является циклопентан пергидрофенантрен. Холевая кислота является 3,7,12-триоксихолановой кислотой, а дезоксихолевая - 3,12-диоксихолановой. Напишите формулы холевой и дезоксихолевой кислот.
29. Парная кислота гликохолевая является соединением холевой и гликокола. Напишите формулу гликохолевой кислоты.
30. Гликодезоксихолевая кислота, участвующая в эмульгировании жиров, является соединением дезоксихолевой кислоты с гликоколом. Напишите формулу гликодезоксихолевой кислоты.
31. Желчные парные кислоты таурохолевая и тауродезоксихолевая являются соединением соответственно холевой и дезоксихолевой кислот с таурином. Напишите их формулы. 32. Из фитостерина (растительные стерин) особый интерес представляет эргостерин (содержится в грибах, дрожжах). По своему строению он отличается от холестерина тем, что имеет не одну, а три двойные связи в молекуле (между 5-м и 6-м, 7-м и 8-м, 22-м и 23-м атомами углерода). Напишите формулу эргостерина.
33. Сколько разных взаимных расположений радикалов может быть у простого эфира, полученного из глицерина и имеющего 3 разные группы -OR₁; -OR₂; -OR₃?
34. Напишите структурные формулы двух возможных изомеров жира, в состав которого входят один остаток пальмитиновой и 2 остатка стеариновой кислоты.
35. В состав свиного жира входят триглицериды: трипальмитин, триолеин, пальмитодиолеин, пальмитостеариолеин. Напишите формулы перечисленных триглицеридов.
36. В кокосовом и пальмовом маслах найдены стеародипальмитин, олеодипальмитин, мириодипальмитин и пальмитодимиристин. Напишите формулы перечисленных триглицеридов.
37. Напишите формулы лауриновой, миристиновой, пальмитоолеиновой, арахидоновой кислот.

38. Напишите формулы холестана, холестанола, холестерина, холевой кислоты. Укажите возможную генетическую взаимосвязь между перечисленными соединениями.
39. Напишите формулы холестеролпальмитата, эргостеролстеарата и стигмастерололеата.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ Вопросы

1. Химическая природа гормонов. Кто из ученых занимался изучением гормонов. Применение гормонов.
2. Принцип действия гормонов. Характеристика гормонов по классам.
3. Стероидные гормоны. Примеры, значение.
4. Пептидные гормоны. Примеры, значение.
5. Прочие гормоны. Примеры, значение.
6. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$; $B > A$; $A = B$.
А. Содержание гидроксильных групп в молекуле кортикостерона. Б. Содержание гидроксильных групп в молекуле альдостерона.
7. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.
А. Содержание спиртовых групп в молекуле альдостерона. Б. Содержание спиртовых групп в молекуле гидрокортизона.
8. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.
А. Число аминокислотных остатков в составе молекулы окситоцина. Б. Число аминокислотных остатков в составе молекулы вазопрессина.
9. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.
А. Количество аминокислотных остатков в молекуле гастриксина. Б. Количество аминокислотных остатков в молекуле глюкагона.
10. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.
А. Количество аминокислотных остатков в субъединице молекулы инсулина. Б. Количество аминокислотных остатков в молекуле паратгормона.
11. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$. А. Содержание йода в тироксине. Б. Содержание йода в йодтиронине.
12. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте раздела, и дайте ответ в форме: $A > B$, $B > A$; $A = B$.
А. Число двойных связей в молекуле простагландина А. Б. Число двойных связей в молекуле простагландина Е.

БИОХИМИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ.

Вопросы

1. Обмен железа в организме: потребность, всасывание, транспорт, форма депонирования.
2. Пищевые источники железа. Симптомы и клинические проявления недостаточности железа.

3. Особенности метаболизма эритроцита (гликолиз, пентозофосфатный путь окисления глюкозы, 2,3-дифосфоглицерат, образование активных форм кислорода, Met-Hb-редуктазная система, антиоксидантная система).
4. Строение гема, реакции и основные этапы его синтеза.
5. Регуляция синтеза гема и гемоглобина.
6. Причины порфирий, их клинические проявления, основы лечения порфирий.
7. Строение наиболее представленных в организме гемопroteинов (гемоглобин, миоглобин) и гемсодержащих ферментов (цитохромы, каталаза, пероксидаза). Их функция.
8. Патологические и физиологические типы гемоглобина (метгемоглобин, серповидноклеточный, гликозилированный гемоглобин, карбоксигемоглобин, оксигенированный гемоглобин, карбогемоглобин).
9. Значение определения концентрации гликозилированного гемоглобина, оксигемоглобина и карбогемоглобина.
10. Механизмы транспорта углекислого газа. Как он связывается с гемоглобином? Роль карбоангидразы. Роль эритроцита в изменении концентрации бикарбонат-ионов плазмы.
11. Связывание гемоглобина с кислородом, эффект кооперативности.
12. Кривая насыщения гемоглобина кислородом. Механизм транспорта кислорода.
13. Влияние температуры, величины pH, концентрации CO₂, 2,3-дифосфоглицерата на сродство гемоглобина к кислороду
14. Схема реакций, происходящих в эритроците в капиллярах легких и тканей.
15. Реакции распада гемоглобина и гема в клетках ретикулоэндотелиальной системы.
16. Физиологические желтухи новорожденных.
17. Патологические желтухи: о гемолитические желтухи, их причины.
18. Наследственные нарушения выведения билирубина – синдромы Жильбера-Мейленграхта, Дубина-Джонсона, Криглера-Найара.
19. Определение содержания общего билирубина и его фракций в сыворотке крови. Принцип метода, нормальные величины, клинико-диагностическое значение.
20. Обнаружение билирубина и уробилиногена в моче. Принцип метода, нормальные величины, клинико-диагностическое значение
21. Ксенобиотики: свойства, пути поступления в организм.
22. Биотрансформация ксенобиотиков. Фазы биотрансформации. Факторы, влияющие на биотрансформацию.
23. Первая фаза биотрансформации – реакции микросомального окисления. Реакции микросомального окисления, отметьте роль НАДФН, цитохрома P450, цитохрома b5.
24. Вторая фаза биотрансформации – реакции конъюгации. Строение УДФ-глюкуроновой кислоты (УДФГК) и фосфоаденозин- фосфосульфата (ФАФС).
25. Реакции образования прямого билирубина
26. Причина усиления токсичных свойств соединений в результате биотрансформации.
27. Отличия микросомального от биологического окисления.
28. Примеры биотрансформации некоторых лекарственных средств.
29. Реакции декарбоксилирования. Синтез биогенных аминов (на примере альфа-аминомасляной кислоты, гистамина, серотонина, дофамина). Роль этих биогенных аминов.
30. Способы обезвреживания биогенных аминов. Реакции дезаминирования с участием моноаминоксидазы (МАО) и реакции метилирования.

31. Анаболическая роль аминокислот на примере креатина. Строение креатина и креатинфосфата, реакции их синтеза, локализация процесса.
32. Биологическая роль креатинфосфата. В чем причина физиологической креатинурии у детей?
33. Определение активности АсАТ и АлАТ в сыворотке крови. Принцип метода, его клиникодиагностическое значение. Нормальные показатели.
34. Схема строения нефрона. Процессы образования мочи: фильтрация, реабсорбция и секреция.
35. Места действия и эффект гормонов, регулирующих водно-солевой обмена.
36. Характеристика фильтрации, факторы, влияющие на ее скорость и величину. Оценка скорости фильтрации в клинической практике. Клиренс. Вещества, используемые для определения клиренса.
37. Оценка скорости клубочковой фильтрации в клинколабораторной диагностике. В чем состоит определение клиренса по креатинину?
38. Реабсорбция веществ. Транспорт максимум для глюкозы.
39. Регуляция реабсорбции воды. Роль антидиуретического гормона. Факторы, стимулирующие его синтез и выделение.
40. Метаболические последствия гипофункции антидиуретического гормона, клинические проявления.
41. Регуляция реабсорбции натрия. Активация и функционирование ренин-ангиотензиальдостероновой системы. Схема, отражающая роль ренин-ангиотензиальдостероновой системы в реабсорбции натрия.
42. Регуляция реабсорбции кальция. Роль 1,25-дигидроксикальциферола, паратгормона и кальцитонина в обмене кальция.
43. Роль почек в поддержании кислотно-основного состояния.
44. Общие свойства мочи здорового человека: количество, цвет, прозрачность, запах, относительная плотность, рН. Как изменяются эти показатели при патологических состояниях?
45. Органические и неорганические компоненты мочи здорового человека.
46. Патологические компоненты мочи – белок, глюкоза, билирубин, кетоновые тела, кровь.
47. Принцип методов определения физико-химических свойств мочи (относительная плотность, величина рН). Клинико-диагностическое значение этих показателей. Нормальные величины.
48. Принцип лабораторного определения компонентов мочи – белок, глюкоза, кетоновые тела, билирубин, уробилиноген, гемоглобин, эритроциты. Клинико-диагностическое значение, нормальные величины
49. Переваривание белков в желудке и кишечнике.
50. Характеристика ферментов желудочного сока (пепсин, гастриксин, ренин), панкреатического сока (трипсин, химотрипсин, эластаза, карбоксипептидазы) и кишечного сока (аминопептидазы, дипептидазы) по плану: о место синтеза; о механизм активации; о оптимальные условия для работы; о субстратная специфичность.
51. Всасывание аминокислот в энтероцитах (транслоказа, симпорт с ионами натрия).
52. Возрастные особенности переваривания белков и всасывания аминокислот у детей.
53. Качественные реакции на свободную соляную кислоту. Принцип методов.

54. Нормальная величина рН желудочного сока, клинико-диагностическое значение определения рН в желудочном соке.
55. Качественная реакция на молочную кислоту в желудочном соке. Принцип метода и нормальные показатели. Клиникодиагностическое значение.
56. Обнаружение крови в желудочном соке. Принцип метода. Нормальные показатели. Клинико-диагностическое значение.

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

Перечень основной литературы:

1. Биохимия : учебное пособие / В. В. Лелевич, И. О. Леднева, Н. Э. Петушок, А. Г. Виноцкая ; под редакцией В. В. Лелевича. — Гродно : ГрГМУ, 2022. — 412 с. — ISBN 978-985-595-696-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/283535>
2. 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>
3. Шахристова, Е. В. Лекции по биохимии для студентов лечебного и педиатрического факультетов : учебное пособие / Е. В. Шахристова, Е. А. Степовая, О. Л. Носарева. — Томск : СибГМУ, 2022. — 285 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/283445>

Перечень дополнительной литературы:

1. Биологическая химия : учебное пособие / Д. А. Беева, Р. А. Мукожева, А. А. Беев, М. М. Мурзаканова. — Нальчик : КБГУ, 2022 — Часть 2 — 2022. — 115 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/293462>
2. Биохимические функции витаминов. Классификация и номенклатура ферментов : учебное пособие / Е. В. Шахристова, Е. А. Степовая, О. Л. Носарева, А. А. Садыкова. — Томск : СибГМУ, 2020. — 89 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/276308>
3. Биохимия витаминов и низкомолекулярных антиоксидантов : учебное пособие / Е. Н. Лебедева, М. М. Павлова, Л. В. Амелина [и др.] ; под редакцией А. В. Сгибнева. — Оренбург : ОрГМУ, 2022. — 138 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/340532>
4. Биохимия и основы патологии липидного обмена : учебное пособие / составители А. В. Еликов, П. И. Цапок. — Киров : Кировский ГМУ, 2014. — 131 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/136050>
5. Биохимия почек и мочи : учебно-методическое пособие. — Оренбург : ОрГМУ, 2019. — 50 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/161661>
6. Болдырева, Ю. В. Сборник тестовых заданий по биологической химии : учебное пособие / Ю. В. Болдырева. — Тюмень : ТюмГМУ, 2023. — 207 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/415028>
7. Лабораторный практикум по биохимии : учебное пособие / О. Л. Носарева, Е. А. Степовая, Т. С. Федорова [и др.]. — 2-е изд. — Томск : СибГМУ, 2016. — 201 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/105908> (дата обращения: 10.02.2025).

8. Сборник тестов по биохимии для студентов лечебного и педиатрического факультетов : учебное пособие / Е. А. Степовая, Е. В. Шахристова, О. Л. Носарева [и др.]. — Томск : СибГМУ, 2017. — 127 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/113514>
9. Словарь биохимических терминов : учебное пособие / В. Г. Соловьев, С. П. Калашникова, Л. Г. Никонова, М. А. Гагаро. — Ханты-Мансийск : Ханты-Мансийская ГМА, 2019. — 36 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/247175>
10. Шатова, О. П. Биохимия соединительной ткани : учебное пособие / О. П. Шатова ; под редакцией А. В. Шестопалова. — Москва : РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2020. — 56 с. — ISBN 978-5-88458-474-7. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/175220>
11. Ясько, М. В. Химия нуклеиновых кислот. Матричные биосинтезы : учебное пособие / М. В. Ясько, В. И. Бахтаирова, И. Э. Егорова. — Иркутск : ИГМУ, 2016. — 59 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/158723>