

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра биохимии

**МЕТОДИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО
ДЛЯ ПРАКТИКУМА ПО БИОХИМИИ**

Казань – 2008

Печатается по решению секции
научно-методического совета
Казанского государственного университета

Составители:

Доцент, к.б.н. Сиянова Н.С.
к.б.н. Невзорова Т.А.
к.б.н. Неуструева С.Н.

Рецензент

Доцент кафедры биохимии, к.б.н. Темников Д.А.

Методическое руководство для практикума по биохимии: Учебно-методическое руководство / Н.С. Сиянова, Т.А. Невзорова, С.Н. Неуструева. – Казань: КГУ, 2008. – 46 с.

Учебно-методическое руководство предназначено для студентов 2 курса биолого-почвенного факультета, а также студентов и сотрудников высших учебных заведений (биологов, химиков, физиков), желающих получить представление и навыки работы в биохимической лаборатории. Пособие содержит указания к лабораторным работам по курсу «Биохимия», на которых студенты овладевают современными методами экспериментальных исследований, закрепляют теоретические знания, полученные на лекциях, анализируют результаты. В каждой лабораторной работе излагаются принцип метода, последовательность проведения эксперимента.

ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

При работе в биохимической лаборатории студент должен соблюдать следующие правила:

1. Опыты проводить в строгом соответствии с описанием.
2. Прежде чем взять вещество для опыта, надо обратить внимание на этикетку, внимательно прочитать её.
3. Химические реактивы нельзя брать руками. Нужно пользоваться специальными приспособлениями: шпателями, ложечками, лопаточками.
4. Запрещается пробовать на вкус или нюхать какие-либо вещества, пить воду из химической посуды.
5. При нагревании вещества или реакционной смеси над спиртовкой необходимо выполнять следующие условия:
 - а) правильно держать колбу или пробирку — отверстие должно быть направлено в сторону от себя и окружающих;
 - б) не держать пробирку рукой — пользоваться держателями;
 - в) разогревание вести осторожно, слегка встряхивая содержимое пробирки.
6. Особую осторожность следует соблюдать при обращении с концентрированными кислотами и щелочами, огнеопасными веществами:
 - а) кислоты и щёлочи нельзя набирать в пипетку ртом — необходимо пользоваться стеклянной пипеткой с грушей, автоматической пипеткой или цилиндром;
 - б) не выливать в раковину концентрированные кислоты и щёлочи без предварительного их разбавления;
 - в) при работе с огнеопасными веществами (эфир, хлороформ и др.) работу проводить под тягой и вдали от нагревательных приборов.
7. Работу с ядовитыми и сильно пахнущими веществами проводить в вытяжном шкафу.
8. При попадании кислоты на кожу необходимо быстро обмыть это место водой и обработать слабым раствором соды, при попадании серной кислоты необходимо сначала удалить её фильтровальной бумагой; в случае ожога щёлочью, после смывания водой, обработать слабым раствором уксусной кислоты.
9. При термических ожогах обработать кожу спиртом.
10. При возгорании спирта, эфира и других легко воспламеняющихся веществ огонь нельзя тушить водой, следует воспользоваться песком.
11. По окончании работы рабочее место привести в порядок.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

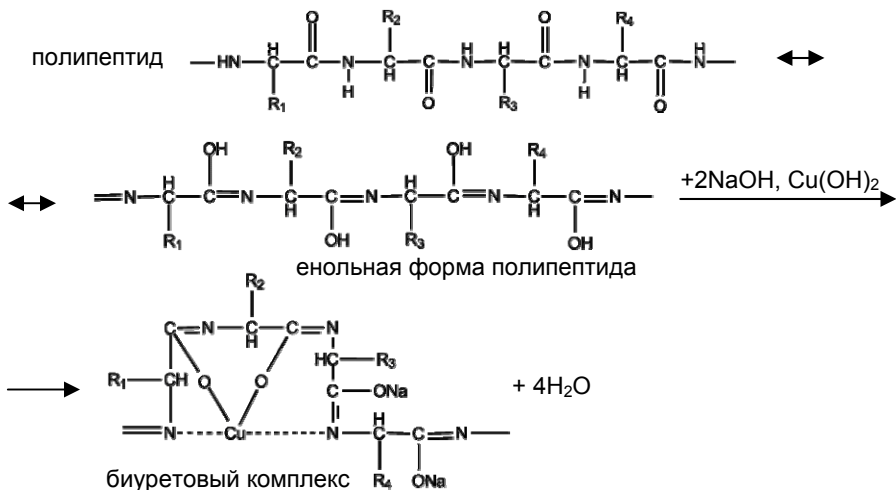
I. ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ

1. Биуретовая реакция на пептидную группу (реакция Пиотровского)

Реакция основана на способности пептидной группы белков и полипептидов образовывать в щелочной среде с ионами Cu^{2+} комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от количества пептидных связей.

Биуретовая реакция положительна с белками и пептидами, имеющими не менее двух пептидных связей. Биуретовую реакцию дают аспарагин, гистидин, а также небелковые вещества, содержащие не менее двух пептидных групп, например, производное мочевины — биурет $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$, давший название этой реакции.

Пептидная группа в щелочной среде присутствует в своей таутомерной енольной форме: $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}- \rightleftharpoons -\text{C}(\text{OH})=\text{N}-$. При избытке щёлочи происходит диссоциация OH-группы, появляется отрицательный заряд, и медь, взаимодействуя с кислородом, образует ковалентную связь, а взаимодействуя с атомами азота, — координационные связи. Схематично реакцию можно представить так:

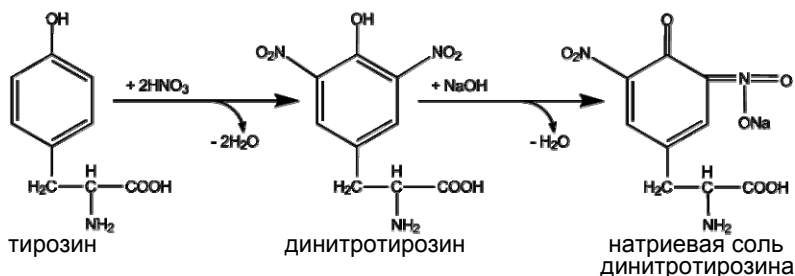


Опыт: в пробирку вносят 1 мл раствора яичного белка, 1-2 мл 10% раствора гидроксида натрия (NaOH) и 1-2 капли 5% раствора сульфата меди (CuSO_4). При встряхивании появляется сине-фиолетовое окрашивание.

Контроль: проделать этот же опыт, заменив NaOH водой. Отметить отличие в окраске смеси при сравнении с цветом раствора в опытной пробирке.

2. Ксантопротеиновая реакция на ароматическое кольцо циклических аминокислот (реакция Мульдера)

Реакция основана на способности присутствующих в молекуле белка ароматических аминокислот (тирозина, фенилаланина и триптофана) образовывать с концентрированной азотной кислотой при подогревании динитропроизводные соединения жёлтого цвета. В щелочной среде они переходят в хиноидные структуры, имеющие оранжевое окрашивание. Например, в реакции с тирозином образуется динитротирозин, добавление гидроксида натрия приводит к образованию натриевой соли хиноидной структуры динитротирозина:



Реакция получила название ксантопротеиновой от греч. xanthos — жёлтый.

К 1 мл раствора яичного белка в вытяжном шкафу приливают 5-6 капель концентрированной азотной кислоты (HNO_3) (набирать пипеткой с резиновой грушей). Выпадает осадок, который при осторожном подогревании (можно на кипящей водяной бане) приобретает жёлтую окраску. После охлаждения в пробирку добавляют по каплям 10% раствор гидроксида натрия до появления оранжевого окрашивания.

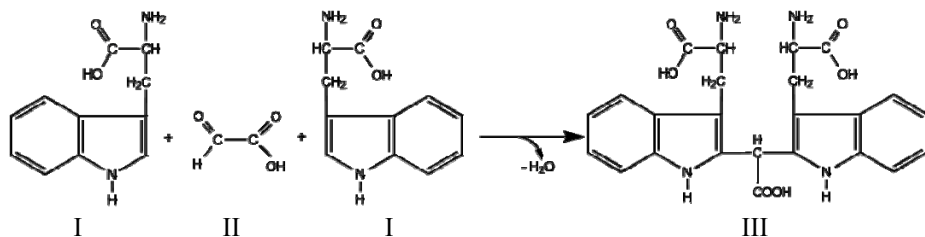
Образование жёлтых пятен на коже при попадании азотной кислоты обусловлено этой реакцией. Ксантопротеиновая реакция не протекает с белками, не содержащими ароматических аминокислот (желатином).

3. Реакция на триптофан (Адамкевича)

Реакция основана на способности триптофана в кислой среде реагировать с глиоксиловой кислотой с образованием соединения, окрашенного в красно-фиолетовый цвет.

При нагревании две молекулы триптофана (I) взаимодействуют с глиоксиловой кислотой (II) с образованием окрашенного соединения (III):

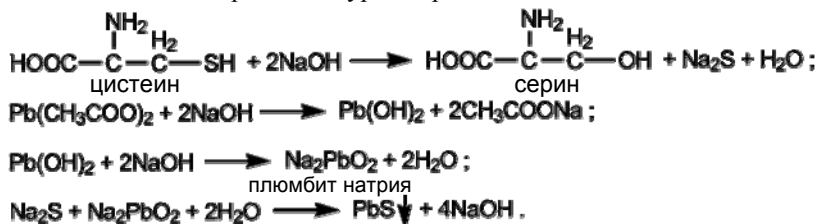
Для проведения реакции используют ледяную (концентрированную) уксусную кислоту, в которой всегда в небольшом количестве присутствует глиоксиловая кислота. В качестве водоотнимающего средства в реакции используется концентрированная серная кислота.



К 1 мл раствора яичного белка приливают 1 мл концентрированной уксусной кислоты (CH₃COOH), 2 капли 5% раствора сульфата меди, перемешивают и осторожно нагревают до растворения выпавшего осадка, после чего содержимое пробирки охлаждают. Очень осторожно по стенке, наклонив пробирку, приливают 1 мл концентрированной серной кислоты (H₂SO₄) (следа за тем, чтобы жидкости не смешивались). При стоянии на границе двух слоев появляется красно-фиолетовое кольцо, которое постепенно распространяется на весь раствор. Появление окраски можно ускорить, поместив пробирку в кипящую водяную баню.

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

Реакция основана на способности белков, содержащих цистин и цистеин, в щелочной среде при нагревании образовывать сульфид натрия (Na₂S), который с плумбитом натрия даёт бурое окрашивание:

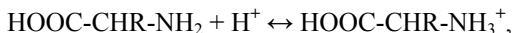


К 1 мл раствора яичного белка прилить 2-3 мл 10% раствора гидроксида натрия и вскипятить. В горячий раствор добавить небольшое количество кристаллического уксуснокислого свинца [Pb(CH₃COO)₂]. Раствор темнеет вследствие образования сульфида свинца (PbS). Интенсивность окрашивания зависит от концентрации раствора белка и содержания в нем цистеина и цистина.

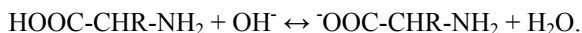
II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ БЕЛКА

Вследствие наличия способных к ионизации концевых групп —COOH и —NH₂, а также боковых групп дикарбоновых и диаминокислот молекулы белков обладают электрическим зарядом — положительным и отрицательным.

В кислой среде белки имеют суммарный положительный заряд:



а в щелочной — отрицательный:



При определённом значении рН среды величина положительных и отрицательных зарядов становится одинаковой и суммарный заряд белка оказывается равным нулю (изоэлектрическое состояние белка). Значение рН, при котором белок находится в изоэлектрическом состоянии, называется *изоэлектрической точкой белка* (ИЭТ). Заряженность молекулы белка является одним из факторов его устойчивости в растворах, так как мешает слипанию белковых частиц и выпадению их в осадок. В ИЭТ растворы белков неустойчивы и белки легко выпадают в осадок (особенно в присутствии водоотнимающих веществ — этиловый спирт, ацетон и др.). Наличие гидратной оболочки у белковой молекулы является другим фактором устойчивости этих молекул в растворе. Поэтому для определения ИЭТ белка определяется рН раствора, при котором наблюдается наиболее полное и быстрое выпадение белка в осадок. Для получения растворов с различной величиной рН пользуются буферными растворами.

Метод основан на способности растворённого белка в ИЭТ переходить в неустойчивое состояние и выпадать в осадок, что проявляется выраженном помутнении раствора. При добавлении этилового (водоотнимающего средства) процесс осаждения белка ускорится.

Ход работы: в шести пронумерованных пробирках готовят буферные смеси с разным значением рН (см. табл.1).

Табл. 1. Приготовление буферных систем для определения ИЭТ:

№ пробирки	Состав буферной смеси (мл)		рН смеси	Степень помутнения
	0,2 М CH ₃ COOH	0,2 М CH ₃ COONa		
1	1,9	0,1	3,4	
2	1,8	0,2	3,8	
3	1,4	0,6	4,4	
4	1,0	1,0	4,7	
5	0,6	1,4	5,1	
6	0,2	1,8	5,7	

Содержимое пробирок взбалтывают и в каждую добавляют по 0,5 мл 0,1% раствора сывороточного альбумина (можно взять 1% раствор желатина). Смесь в пробирках снова встряхивают.

В каждую пробирку добавляют по 1 мл этилового спирта и оценивают степень мутности проб.

ИЭТ белка определяется по значению рН раствора в той пробирке, где наблюдается наиболее сильное помутнение.

III. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ

Денатурация белка – нарушение нативной пространственной структуры белковой молекулы (разрушение четвертичного, третичного и вторичного уровней организации). Денатурация приводит к изменению биологических и физико-химических свойств белка (в частности, его растворимости). При этом белок становится менее гидрофильным и легко осаждается. Денатурация чаще всего необратима, но в ряде случаев удаление денатурирующих факторов приводит к восстановлению исходной конформации молекулы белка и его природных свойств — ренатурации.

1) *Высаливание* – процесс осаждения белков солями щелочных и щелочно-земельных металлов (Na_2SO_4 , NaCl , KCl , MgSO_4 , MgCl_2 и др.). Этот процесс является обратимым и сохраняет нативные свойства белков. Высаливание можно проводить также и нейтральными солями, например, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Все вещества этого типа нейтрализуют заряд белковых частиц и вызывают их дегидратацию, что ведёт к осаждению белка без изменения нативной структуры. Белки отличаются друг от друга зарядом и гидрофильностью, поэтому можно разделить белки, используя для их осаждения разные концентрации солей.

К 1 мл раствора белка прибавляют кристаллический серноокислый аммоний ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) до насыщения. При этом белок выпадает в осадок. Обратимость процесса высаливания (растворение осадка белка) проверить добавлением дистиллированной воды.

2) *Денатурация белка солями тяжёлых металлов*. Катионы тяжёлых металлов образуют прочные связи с полярными группами белка, в результате чего разрушается пространственная структура и происходит осаждение денатурированного белка. При добавлении избытка солей тяжёлых металлов (кроме AgNO_3 и HgCl_2) происходит растворение первоначально образующегося осадка из-за адсорбции иона металла и приобретения вследствие этого белковой молекулой положительного заряда.

К 1 мл раствора яичного белка приливают 1-2 капли 5% раствора сульфата меди и сразу перемешивают. Выпадает осадок, не растворяющийся при добавлении воды.

3) *Денатурация белка концентрированными минеральными кислотами*. Минеральные кислоты вызывают нейтрализацию зарядов белковых молекул, что приводит к денатурации и осаждению белка. При избытке всех минеральных кислот, за исключением азотной, выпавший осадок белка растворяется (за счёт перезарядки белка). Реакция с концентрированной азотной кислотой используется для обнаружения белка в моче (проба Геллера).

В пробирку наливают 1 мл концентрированной азотной кислоты (HNO_3) и осторожно, держа пробирку под углом 45° , настилают 1 мл раствора яичного белка. На границе двух слоев жидкостей образуется осадок денатурированного белка в виде белого кольца.

4) *Тепловая денатурация белка.* Почти все белки денатурируют при нагревании ($+50$ - 55°C и выше). Механизм тепловой денатурации связан с усилением теплового движения полипептидных цепей. Это приводит к разрыву водородных и гидрофобных связей. При выпадении в осадок денатурированного при нагревании белка важную роль играет концентрация водородных ионов. Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в ИЭТ белка.

В сильноокислых (за исключением азотной, трихлоруксусной и сульфосалициловой кислот) и сильнощелочных растворах денатурированный при нагревании белок не выпадает в осадок, так как молекулы белка перезаряжаются (или происходит усиление имеющегося заряда) и несут в первом случае положительный, во втором случае отрицательный заряд, что повышает их устойчивость в растворе в результате электростатических сил отталкивания и обуславливает наличие гидратной оболочки вокруг молекулы.

Ход работы: в четыре пронумерованные пробирки наливают по 1 мл 1% раствора сывороточного альбумина.

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

В пробирку №2 добавляют 1 каплю 0,2М раствора уксусной кислоты и нагревают. Выпадает осадок белка вследствие того, что подавляется кислотная диссоциация, и белок приближается к изоэлектрическому состоянию.

В пробирку №3 добавляют несколько капель концентрированной уксусной кислоты и содержимое нагревают. Осадка белка не образуется даже при кипячении, так как в сильноокислой среде молекулы белка перезаряжаются, приобретая положительный заряд.

В пробирку №4 добавляют 1 каплю 10% раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок белка не образуется даже при кипячении, так как в щелочной среде отрицательный заряд на частице белка усиливается.

Занятие 2

РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Разделение аминокислот методом хроматографии на бумаге проводится с целью идентификации аминокислот, находящихся в растворе.

Метод основан на различной растворимости отдельных аминокислот в двух частично смешивающихся жидкостях, одной из которых является вода, другой — водонасыщенный органический растворитель (смесь бутилового

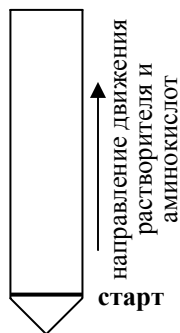
спирта с уксусной кислотой). Водная фаза неподвижна, так как в данном случае сорбирована на инертном носителе — целлюлозе, которая в насыщенной влагой атмосфере (хроматографической камере) удерживает до 20% воды, оставаясь внешне сухой. Подвижной фазой является насыщенный водой органический растворитель. Смесь аминокислот наносят на полоску хроматографической бумаги, конец которой опускают в органический растворитель. Растворитель поднимается по полоске бумаги, растворяет нанесённые на бумагу аминокислоты и увлекает их за собой. Скорость перемещения аминокислот по бумаге зависит от степени их растворимости в подвижной и неподвижной фазах. Чем больше растворимость аминокислоты в водной фазе и меньше в органическом растворителе, тем медленнее движется аминокислота по бумаге с органическим растворителем. По ходу передвижения растворителя смесь аминокислот будет разделяться, причём те из них, которые растворяются в органическом растворителе лучше, продвигаются вдоль бумаги дальше; те же, которые растворяются в нём хуже, проходят от места нанесения более короткий путь.

Для каждой аминокислоты характерен свой коэффициент скорости движения — R_f , который легко определить практически:

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное аминокислотой, мм}}{\text{расстояние, пройденное фронтом растворителя, мм}}.$$

R_f постоянен для данных условий опыта. R_f используют при идентификации веществ при их анализе методом распределительной хроматографии на бумаге. Для этого сравнивают R_f аминокислот исследуемой смеси с R_f известных стандартных аминокислот.

Ход работы: для разделения смеси аминокислот вырезают полоску хроматографической бумаги длиной 15 см и шириной 1,5 см (в зависимости от величины хроматографической камеры). Хроматографическую бумагу можно брать только пинцетом. Один из концов полоски «заостряют», отрезая от него кусочки ножницами, и на нём проводят простым карандашом линию на расстоянии 2 см от края (линия старта). Этот конец бумаги зажимают между двумя стеклянными пластинками и проводят стеклянной палочкой, смоченной раствором смеси аминокислот, по начерченной линии. После подсыхания полоски вновь наносят порцию аминокислот. Эту процедуру повторяют 3-4 раза.



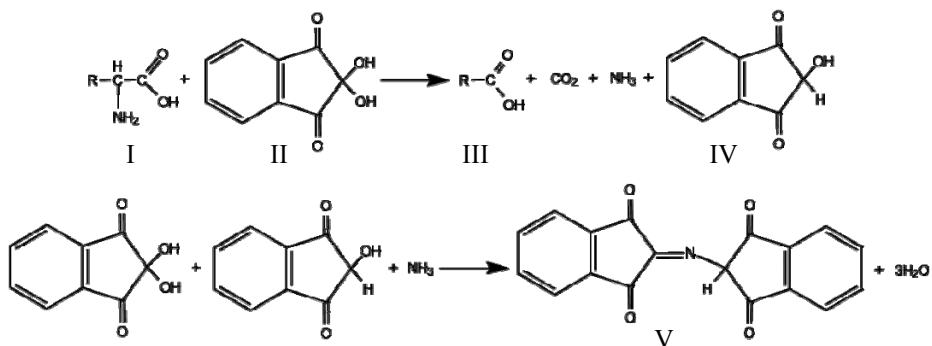
Аналогично подготовить к хроматографии полоски бумаги с нанесёнными растворами стандартных известных аминокислот.

В качестве хроматографической камеры могут использоваться большие пробирки, стеклянные цилиндры. На дно хроматографической камеры осторожно, не смачивая стенок, наливают с помощью пипетки 1-2 мл смеси

бутанола, уксусной кислоты и воды (4:1:5). Хроматограмму закрепляют с помощью пробки в хроматографической камере, при этом заостренный конец хроматограммы должен быть погружен в растворитель на 1 см, линия старта не должна погружаться в растворитель. Хроматографирование проводят в течение 1,5-2 часов. Затем хроматограмму вынимают из камеры, отмечают границу фронта продвижения растворителя и высушивают под тягой.

Детекция аминокислот. На высушенную хроматограмму наносят с помощью пульверизатора 0,5% раствор нингидрина в ацетоне так, чтобы вся хроматограмма была равномерно (без потёков) смочена раствором. Как только ацетон испарится, хроматограмму помещают в сушильный шкаф при температуре 70°C на 15 мин. Отдельные аминокислоты обнаруживаются в виде цветных (синих или фиолетовых) пятен.

Принцип окрашивания аминокислот нингидрином. При нагревании аминокислоты (I) с раствором нингидрина (II) происходит распад аминокислоты с образованием двуокиси углерода, аммиака и соответствующего альдегида (III), при этом нингидрин восстанавливается (IV). Восстановленный нингидрин конденсируется с аммиаком и окисленной молекулой нингидрина, образуя окрашенный продукт сине-фиолетового цвета (V):



Идентификацию аминокислот осуществляют по значению R_f . Для этого измеряют с точностью до миллиметра расстояние, пройденное растворителем от линии старта до границы фронта растворителя. С такой же точностью измеряют расстояние от точки нанесения аминокислот до центра цветного пятна. Путём деления величины пути, пройденного аминокислотой на хроматограмме, на величину пути, пройденного растворителем, находят значение коэффициента R_f .

Таким же образом вычисляют R_f для стандартных известных аминокислот (хроматограммы с известными аминокислотами ставятся параллельно). Сравнивая R_f известных аминокислот с R_f аминокислот смеси, определяют последние.

Занятие 3

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА

Часто в исследованиях для определения концентрации белка применяют метод Лоури. Метод высокочувствительный, но малоспецифичный, так как с реактивом Фолина (используемым в этом методе) дают реакцию свободные ароматические аминокислоты и многие другие соединения, содержащие фенольную группу.

Для быстрого установления содержания белка широко используют прямую спектрофотометрию образцов при определённых длинах волн. Однако этим методом можно лишь ориентировочно определять концентрацию белков, потому что они между собой могут сильно отличаться содержанием ароматических аминокислот, обуславливающих светопоглощение при 280 нм.

1. Количественное определение белка по методу Лоури

Метод основан на измерении интенсивности окраски, которую даёт раствор белка в цветных реакциях — биуретовой и реакции Фолина.

При взаимодействии белка со щелочным раствором медного купороса образуются комплексные соединения (биуретовая реакция), которые своими тирозиновыми и цистеиновыми радикалами восстанавливают смесь фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета (реакция Фолина). Интенсивность окраски комплекса, которая зависит от количества белка в исследуемой пробе, измеряется на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром.

В работе используются следующие реактивы:

- А — 2% раствор Na_2CO_3 в 0,1 н NaOH;
- В — 0,5% раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 % растворе виннокислого среднего Na, K;
- С — щелочной раствор меди, полученный сливанием 50 мл реактива А и 1 мл реактива В (в день определения);
- D — реактив Фолина (приготовленный разводят в 2 раза).

Чтобы определить содержание белка в исследуемой пробе, необходимо построить калибровочную кривую (зависимость интенсивности окраски комплекса от количества белка). Для построения калибровочной кривой используют ряд растворов сывороточного альбумина с известными концентрациями. Для этого сначала готовят исходный раствор с концентрацией белка 0,5 мг в 1 мл, растворяя 5 мг альбумина в 10 мл дистиллированной воды. Затем из этого раствора готовят разбавленные растворы, наливая в пробирку №1-6 указанное в таблице 2 количество исходного раствора белка и воды.

Ход работы. В восьми пронумерованных пробирках готовят смеси из раствора белка и воды (см. табл.2). Содержимое пробирок встряхивают и в каждую пробирку добавляют 5 мл реактива С. Смесь тщательно

перемешивают и через 10 минут приливают к ней 0,5 мл раствора D. Снова перемешивают. Пробирки помещают в темноту. Через 30 минут измеряют оптическую плотность каждого раствора на ФЭЖе с красным светофильтром относительно контроля (пробирка №7, в которую также добавляют все указанные выше реактивы). Строят калибровочную кривую, откладывая по горизонтальной оси (абсцисс) концентрации растворов белка, а по вертикальной оси (ординат) — соответствующие им значения оптической плотности. Далее, измерив оптическую плотность исследуемого раствора, используют калибровочную кривую для определения концентрации белка в исследуемой пробе (пробирка №8), с которой тоже проведены указанные выше цветные реакции.

Табл. 2. Приготовление разбавленных растворов

№ пробирки	Концентрация раствора белка (мкг в 1 мл)	Количество исходного раствора белка (мл)	Количество H ₂ O (мл)	Оптическая плотность
1	50	0,1	0,9	
2	100	0,2	0,8	
3	150	0,3	0,7	
4	200	0,4	0,6	
5	250	0,5	0,5	
6	300	0,6	0,4	
7	-	-	1,0	0,0
опыт		1 мл исследуемого раствора белка	-	

2. Спектрофотометрический метод определения содержания белка

Метод основан на светопоглощении при 280 нм ароматических радикалов тирозина, триптофана и в меньшей степени фенилаланина, содержащихся в белке. Однако при данной длине волны поглощают и нуклеиновые кислоты, хотя их максимум поглощения приходится на 260 нм. В связи с этим измерение оптической плотности раствора белка проводят при 260 и 280 нм (чтобы сделать поправку на примесь нуклеиновых кислот и нуклеотидов). Метод неприменим к материалу, где содержание нуклеиновых кислот превышает 20%.

Ход работы. Измеряют оптическую плотность исследуемого раствора белка против контрольного раствора на спектрофотометре в кювете толщиной 1 см при двух длинах волн — 260 нм (E_{260}) и 280 нм (E_{280}).

Расчёт концентрации белка проводят по формуле, эмпирически полученной Кальваром:

$$X = 1,45 \cdot E_{280} - 0,74 \cdot E_{260},$$

где x - концентрация белка в растворе, г/л.

Занятие 4

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные соединения — полинуклеотиды. Нуклеотиды содержат пуриновое (аденин или гуанин) или пиримидиновое (цитозин, тимин или урацил) основание, углевод (рибозу или дезоксирибозу) и фосфорную кислоту.

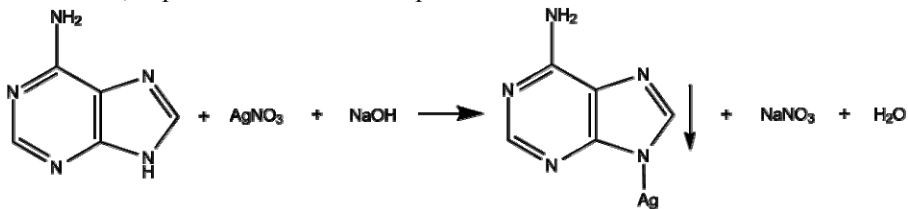
Различают два типа нуклеиновых кислот: ДНК (дезоксирибонуклеиновые кислоты) и РНК (рибонуклеиновые кислоты). Различие в углеводных компонентах: в ДНК — дезоксирибоза, в РНК — рибоза, а также в том, что в ДНК содержится тимин, а в РНК — урацил вместо тимина.

I. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА КОМПОНЕНТЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Для изучения химического состава нуклеиновых кислот проводят кислотный гидролиз дрожжей, богатых нуклеопротеинами (сложные белки, небелковым компонентом которых являются нуклеиновые кислоты) и в полученном *гидролизате* выявляют компоненты этих кислот при помощи следующих качественных реакций.

1. Проба на пуриновые основания

Метод основан на способности пуриновых оснований с аммиачным раствором нитрата серебра образовывать осадок серебряных солей пуриновых оснований, окрашенных в светло-коричневый цвет:



В пробирку вносят 0,5 мл гидролизата дрожжей, добавляют 2 мл 10% NaOH и 10 капель 1% раствора AgNO₃. Через несколько минут выпадает осадок серебряных производных пуриновых оснований.

2. Реакция на дезоксирибозу и рибозу с дифениламином

Дифениламин с дезоксирибозой даёт синее окрашивание, а с рибозой— зелёное. При нагревании дезоксирибозы в кислой среде образуется фурфурол, оксилевулиновый альдегид и сходные хромогены, которые, конденсируясь с дифениламином, образуют соединения, окрашенные в синий цвет.

К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 20 капель 1% раствора дифениламина и кипятят на водяной бане в течение 15 минут. Появляется сине-зелёное окрашивание.

Проделать реакцию, заменив гидролизат дрожжей растворами ДНК и РНК.

3. Реакция на рибозу с орцином

Рибозу можно обнаружить по реакции с орцином. При нагревании с соляной кислотой рибоза дегидратируется и превращается в фурфурол, который конденсируется с орцином с образованием соединения, окрашенного в зелёный цвет. Дезоксирибоза не даёт этой реакции.

К 1 мл раствора орцина добавляют 0,5 мл гидролизата дрожжей, 1 мл концентрированной соляной кислоты и нагревают до кипения. Появляется зелёное окрашивание.

Проделать реакцию с растворами РНК и ДНК. Сравнить полученные результаты.

4. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

Фосфорную кислоту обнаруживают по реакции с молибдатом аммония, в результате которой образуется молибдатофосфат аммония:



К 0,5 мл гидролизата дрожжей добавляют 10 капель молибденового реактива (раствор молибденовокислого аммония в азотной кислоте) и кипятят. При этом жидкость окрашивается в лимонно-жёлтый цвет (не осадок). Охлаждают пробирку под краном, выпадает лимонно-жёлтый осадок молибдатофосфата аммония.

II. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (По А. С. Спирину)

Этот метод основан на регистрации светопоглощения нуклеиновыми кислотами. Нуклеиновые кислоты имеют максимум поглощения света при 260 нм, который обусловлен присутствием в них азотистых оснований. Все свободные основания полинуклеотидов обладают тем же максимумом светопоглощения, за исключением цитозина, зона наибольшего поглощения которого находится при 270 нм. Поэтому по интенсивности светопоглощения азотистых оснований нуклеотидов можно определить содержание нуклеиновых кислот в экстрактах из биологического материала или растворах.

Однако светопоглощение природной ДНК на 40-50% ниже, чем составляющих её нуклеотидов. Этот так называемый "гипохромный эффект" связан с двуспиральной структурой природной ДНК. Гипохромный эффект характерен также и для РНК, содержащих биспиральные участки.

Учитывая эти особенности нуклеиновых кислот, А.С. Спирин разработал метод измерения светопоглощения гидролизатов ДНК и РНК при двух длинах волн — 270 и 290 нм (чтобы сделать поправку на примесь белков), поскольку при этих условиях на определение концентрации нуклеиновых кислот практически не влияют различия в нуклеотидном составе.

Ход работы. В одну пробирку вносят 0,5 мл раствора ДНК, в другую — тот же объём раствора РНК, добавляют в каждую пробирку по 1,5 мл дистиллированной воды и по 1,5 мл 1М раствора хлорной кислоты (HClO_4). Измеряют оптическую плотность полученных растворов при 270 нм и 290 нм в кювете толщиной 1 см, используя в качестве контроля 1М раствор хлорной кислоты, для последующего расчёта гипохромного эффекта. После чего пробирки с растворами ДНК и РНК закрывают обратным холодильником и ставят на гидролиз (на кипящую водяную баню на 20 мин).

Гидролизаты охлаждают, объём доводят дистиллированной водой до 3,5 мл. Определяют светопоглощение содержимого каждой пробы на спектрофотометре при 270 и 290 нм.

$$\text{Содержание ДНК рассчитывают по формуле: } X_1 = \frac{(E_{270} - E_{290}) \cdot 10,1}{0,19}.$$

$$\text{Содержание РНК рассчитывают по формуле: } X_2 = \frac{(E_{270} - E_{290}) \cdot 10,5}{0,19},$$

где x_1 и x_2 — концентрации ДНК и РНК, мг/л; E_{270} — оптическая плотность гидролизата при 270 нм; E_{290} — оптическая плотность гидролизата при 290 нм; 0,19 — удельная экстинкция, соответствующая 1 мг фосфора нуклеиновых кислот в 1 л раствора; 10,1 и 10,5 — коэффициенты пересчёта содержания фосфора на концентрацию нуклеиновых кислот, исходя из теоретического содержания фосфора в ДНК 9,9% и в РНК 9,5%.

Рассчитать гипохромный эффект для ДНК и РНК, т.е. определить, на сколько процентов светопоглощение ($E_{270} - E_{290}$) растворов ДНК и РНК до прогрева меньше оптической плотности ($E_{270} - E_{290}$) их гидролизатов.

III. ОСАЖДЕНИЕ ДНК ИЗ РАСТВОРА

К раствору ДНК добавляют 2-х кратный объём холодного этанола при постоянном помешивании. Осадок ДНК наматывают на стеклянную палочку.

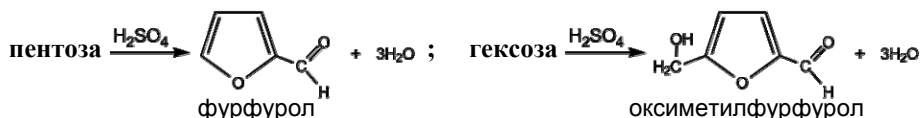
КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА МОНОСАХАРИДЫ И ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

I. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА МОНОСАХАРИДЫ

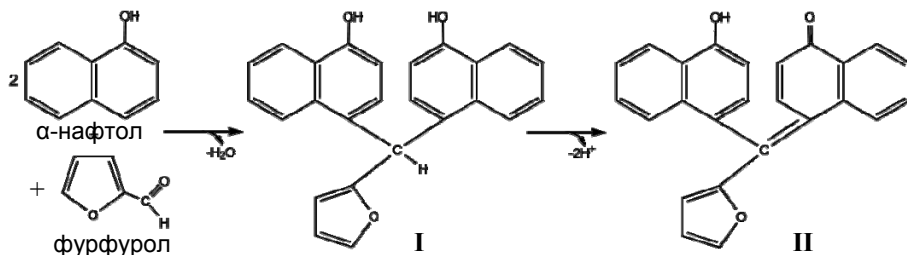
По химическому строению моносахариды представляют собой альдегидо- или кетомногоатомные спирты. По числу атомов углерода моносахариды подразделяют на триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы и т.д. Наиболее распространёнными в природе являются пентозы и гексозы.

1. Реакция Молиша с α -нафтолом

Чувствительной реакцией на моносахариды является реакция с α -нафтолом. При взаимодействии их с концентрированной серной кислотой образуются фурфурол или оксиметилфурфурол:



В присутствии α -нафтола как фурфурол, так и оксиметилфурфурол дают лейкосоединение **I** триарилметанового характера (бесцветное), а это лейкосоединение окисляется серной кислотой в окрашенное хиноидное соединение **II** (красно-фиолетового цвета):

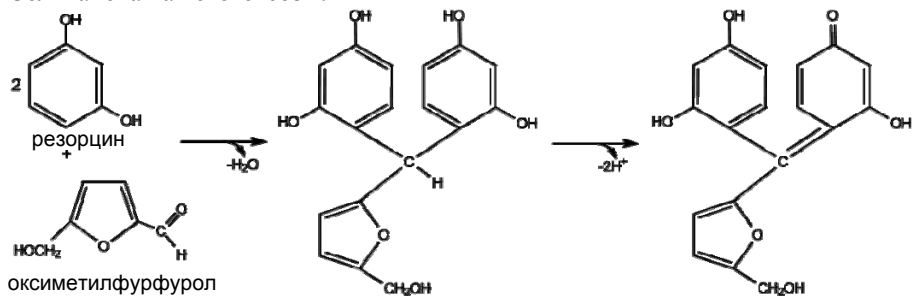


В пробирку помещают 1 мл 1% раствора глюкозы, 2 капли 10% спиртового α -нафтола и по стенке пробирки осторожно приливают 2 мл концентрированной H_2SO_4 . Серная кислота опускается на дно пробирки и на границе двух жидкостей образуется кольцо красно-фиолетового цвета.

2. Реакция Селиванова на кетогексозы

При нагревании с соляной кислотой кетогексоза превращается в оксиметилфурфурол, который с резорцином образует соединение красного цвета. Альдогексозы также дают эту реакцию, но реакция у них протекает

значительно медленнее, что обуславливает специфичность реакции Селиванова на кетогексозы.

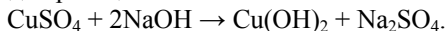


В две пробирки наливают по 2 мл реактива Селиванова (раствор резорцина в соляной кислоте), в одну из них прибавляют 2 капли 1 % раствора фруктозы, в другую – 2 капли 1 % глюкозы, нагревают до кипения. В пробирке с фруктозой появляется красное окрашивание.

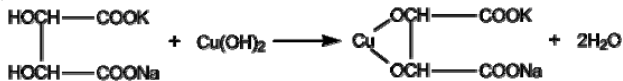
3. Реакции на восстанавливающие свойства моносахаридов

Все моносахариды, имеющие свободную карбонильную группу (альдегидную или кетонную), обладают способностью в щелочной среде при нагревании восстанавливать окисные формы металлов в закисные или даже до свободного состояния. Моносахариды при этом образуют соответствующие кислоты. Это свойство моносахаридов используется для некоторых качественных и количественных реакций.

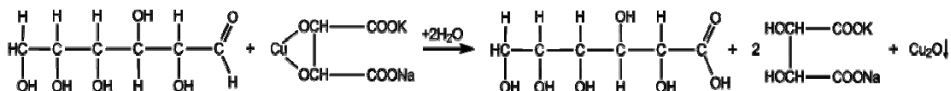
1) *Реакция Фелинга* — восстановление гидрата окиси меди. Реакция заключается в восстановлении моносахаридами гидрата окиси меди в закись меди. При проведении реакции используется реактив Фелинга, представляющий собой смесь медного купороса (CuSO_4) с сегнетовой солью (K, Na - виннокислый) в щелочной среде. При смешивании медного купороса со щёлочью происходит реакция:



В присутствии сегнетовой соли в щелочной среде гидрат окиси меди не выпадает в осадок, так как образуется растворимое комплексное соединение окисной меди с сегнетовой солью:

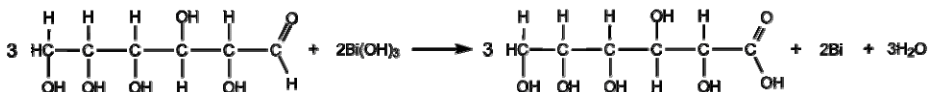


При взаимодействии моносахаридов с фелинговой жидкостью происходит их окисление и образуется закись меди (Cu_2O) красного цвета:



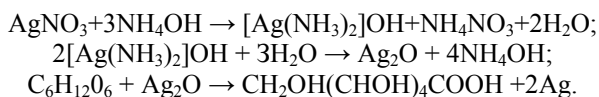
К 1-2 мл 1% раствора глюкозы приливают равный объём реактива Фелинга и смесь нагревают на кипящей водяной бане. Выпадает красный осадок Cu_2O .

2) *Реакция Ниландера – восстановление гидрата окиси висмута.* Заключается в восстановлении моносахаридами гидрата окиси висмута в металлический висмут. Реактив Ниландера содержит основной азотнокислый висмут, сегнетову соль и едкий натр. Сегнетова соль добавляется для того, чтобы гидрат окиси висмута, образованный при взаимодействии азотнокислого висмута и щёлочи, оставался в растворе.



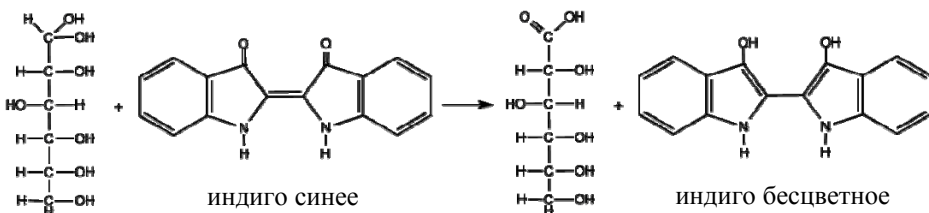
В пробирку наливают 1-2 мл 1% раствора глюкозы и 0,5-1 мл реактива Ниландера, прогревают на кипящей водяной бане до появления тёмно-бурого окрашивания, что свидетельствует об образовании металлического висмута.

3) *Реакция серебряного зеркала по Толленсу – восстановление окиси серебра.* Заключается в восстановлении моносахаридами аммиачного раствора окиси серебра до металлического серебра:



В пробирку наливают 2 мл 1% раствора глюкозы и 1 мл аммиачного раствора азотнокислого серебра. Осторожно нагревают. Стенки пробирки покрываются слоем металлического серебра.

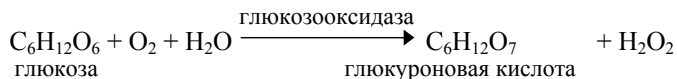
4) *Реакция Мульдера на восстановление индиго.* Основана на способности моносахаридов восстанавливать (обесцвечивать) индиго синее (в этой реакции принимает участие гидратная форма моносахарида):



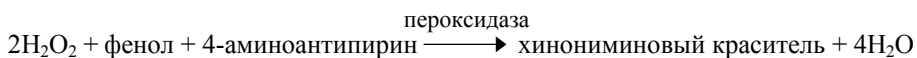
В пробирку наливают 2 мл 1% раствора глюкозы, прибавляют 4-5 капель соды и 2 капли раствора индиго синего и нагревают – происходит обесцвечивание краски. Если жидкость охладить и взболтать, то вновь появляется синее окрашивание, так как индиго бесцветное окисляется за счёт кислорода воздуха.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫМ МЕТОДОМ

Глюкозооксидаза окисляет D-глюкозу до глюкуроновой кислоты с образованием в эквимольном количестве перекиси водорода:



H_2O_2 под действием пероксидазы реагирует с 4-аминоантипирином и фенолом с образованием соединения красного цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы в анализируемом образце и измеряется фотометрически при длине волны 510 (470-540) нм.



Ход работы. В пробирку №1 (опыт) наливают 0,03 мл сыворотки крови, в пробирку №2 (стандарт) – 0,03 мл стандартного раствора глюкозы с концентрацией 10 ммоль/л, в пробирку №3 (контроль) – 0,03 мл дистиллированной воды. Затем во все пробирки добавляют по 3 мл рабочего реактива субстратно-ферментной смеси (фосфатный буфер, содержащий глюкозооксидазу, пероксидазу, 4-аминоантипирин и фенол). Содержимое пробирок тщательно перемешивают и инкубируют в течение 15 минут при температуре +37°C или в течении 30 минут при комнатной температуре. Через 5-10 минут после начала инкубации пробирки интенсивно встряхивают.

После окончания инкубации измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб на спектрофотометре при длине волны 510 нм или на фотозлектроколориметре (красный светофильтр — 470-540 нм) в кюветах с толщиной 10 или 5 мм против контроля (пробирка №3).

Окраска устойчива в течение 1 часа после окончания инкубации.

Расчёт. Содержание глюкозы в опытной пробе рассчитывают по стандартному раствору глюкозы по формуле:

$$C = \frac{E_0}{E_K} \times 10,$$

где: C - концентрация глюкозы в опытной пробе, ммоль/л;

E_0 - оптическая плотность опытной пробы, опт. ед.;

E_K - оптическая плотность стандартной пробы, опт. ед.;

10 - концентрация глюкозы в стандартном растворе, ммоль/л.

Нормальное содержание глюкозы в сыворотке крови и плазмы крови человека, определяемое глюкозооксидазным методом, колеблется в пределах 3,9 – 6,1 ммоль/л.

ОЛИГОСАХАРИДЫ. ПОЛИСАХАРИДЫ

I. ОЛИГОСАХАРИДЫ

Олигосахариды (от греч. «олигос» - немногий) – вещества, образованные из нескольких остатков молекул моносахаридов (от 2 до 10). В зависимости от числа остатков моносахаридов, входящих в молекулы олигосахаридов, последние делят на дисахариды, трисахариды и т.д. Широко распространённой группой являются дисахариды.

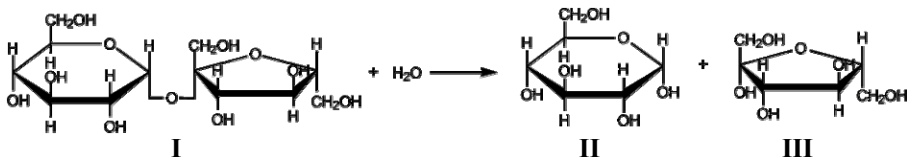
1. Восстанавливающие свойства дисахаридов

Дисахариды построены по типу гликозидов. Это означает, что при образовании дисахаридов одна молекула моносахарида образует связь с другой молекулой за счёт своего гликозидного гидроксила. Вторая молекула моносахарида участвует в образовании связи двумя путями: 1) спиртовым гидроксилом; 2) гликозидным гидроксилом. В первом случае в молекуле дисахаридов остаётся свободным гликозидный гидроксил, благодаря чему эти дисахариды обладают восстанавливающими свойствами (мальтоза, лактоза, целлобиоза). Во втором случае в молекуле дисахаридов нет свободного гликозидного гидроксила, вследствие чего он лишён восстанавливающих свойств (сахароза, трегалоза).

В две пробирки наливают по 2 мл 1% раствора дисахаридов: в первую — сахарозы, во вторую — мальтозы. Проводят реакцию Фелинга. В пробирке с сахарозой восстановление гидрата окиси меди в закись меди не наблюдается, в пробирке с мальтозой, обладающей восстанавливающими свойствами, наблюдается образование закиси меди (красное окрашивание).

2. Кислотный гидролиз сахарозы

При нагревании с кислотами или под действием соответствующих ферментов происходит гидролиз дисахаридов — распад на две молекулы моносахаридов. Сахароза (I) при гидролизе распадается на α -D-глюкопиранозу (II) и β -D-фруктофуранозу (III), которые можно обнаружить в реакции Фелинга:



В пробирку наливают 2 мл 1% раствора сахарозы, 1 мл 10% раствора серной кислоты и кипятят 1-2 мин. После охлаждения раствор нейтрализуют сухим бикарбонатом натрия (Na_2CO_3), добавляя его небольшими порциями до тех пор, пока не прекратится выделение углекислого газа (CO_2). Проводят

реакцию Фелинга. Положительная реакция указывает на образование моносахаридов, так как сама сахароза не восстанавливает гидрат окиси меди.

II. ПОЛИСАХАРИДЫ

Полисахариды – углеводы, образованные из большого числа остатков молекул моносахаридов (сотни и тысячи). Полисахариды отличаются друг от друга химической природой повторяющихся единиц моносахаридов, степенью разветвления и длиной цепи. В полисахаридах гликозидный гидроксил одной молекулы моносахарида соединён со спиртовым гидроксилом второй молекулы через гликозидную связь. Полисахариды имеют свободный гликозидный гидроксил на большое число связанных молекул моносахарида, поэтому практически они не проявляют восстанавливающих свойств. Гидролиз полисахаридов приводит к образованию моносахаридов, обладающих восстанавливающими свойствами.

1. Гидролиз крахмала

Крахмал – химически неоднородное вещество. Его образуют молекулы двух типов: амилоза и амилопектин. Амилоза представляет собой неразветвлённый полимер, который состоит из остатков α -D-глюкопиранозы (от 1000 до 4000 остатков), соединённых 1,4-гликозидными связями. Амилопектин – разветвлённый полимер, который также состоит из остатков α -D-глюкопиранозы. В пределах каждой короткой цепи глюкозидные остатки соединены 1,4-гликозидными связями; друг с другом цепи соединяются посредством 1,6-гликозидных связей.

Крахмал с трудом растворяется в воде, йодом окрашивается в синий цвет в результате образования комплексных соединений. Под действием фермента амилазы крахмал расщепляется с образованием, в конечном счёте, мальтозы. При кипячении с кислотами крахмал превращается в глюкозу. При гидролизе крахмала в качестве промежуточных продуктов образуются полисахариды разной молекулярной массы - декстрины. На первых стадиях гидролиза получают декстрины, мало отличающиеся от крахмала по размерам молекулы и по свойствам. С йодом они дают фиолетовую окраску (амилодекстрины). По мере дальнейшего гидролиза молекулярная масса декстринов понижается, увеличивается их восстанавливающая способность, от йода они окрашиваются в красно-бурый цвет (эритродекстрины), жёлтый (флаводекстрины) и, наконец, перестают давать реакцию с йодом (ахродекстрины и мальтодекстрины).

Ход работы. В пробирку наливают 10 мл 1% крахмального клейстера, прибавляют 2-3 мл фермента амилазы (глицериновая вытяжка амилазы из солода) и ставят в водяную баню при 40-45°C. Через каждые 2 мин отбирают из пробирки 0,5-1 мл гидролизата, переносят в чистые пробирки и прибавляют несколько капель раствора йода. Пробу гидролизата берут до тех пор, пока

жёлтая окраска йода не будет изменяться. Пробирки в порядке взятых проб сохраняют в штативе. По окончании гидролиза с 2 мл гидролизата проводят реакцию Фелинга. Реакцию Фелинга и окрашивание йодом проводят также с негидролизированным крахмалом.

2. Растворение целлюлозы

Целлюлоза представляет собой неразветвлённый полимер, который состоит из остатков β -D-глюкопиранозы (1400-10000), соединённых 1,4-гликозидными связями.

В воде, спирте и других обычных растворителях целлюлоза нерастворима. Она растворяется в концентрированных растворах некоторых солей ($ZnCl_2$, $SnCl_2$ и др.), а также в некоторых щелочных жидкостях, например, аммиачном растворе гидрата окиси меди (реактив Швейцера).

Ход работы. В пробирку наливают 4-5 мл реактива Швейцера, погружают в него небольшой кусочек хлопковой ваты (или измельченной фильтровальной бумаги) и помешивают стеклянной палочкой до растворения. Получается прозрачная густая вязкая жидкость. В стеклянный стакан с 50 мл тёплой воды, подкисленной 2-3 мл концентрированной серной кислоты, выливают тонкой струёй раствор целлюлозы. Целлюлоза выделяется из раствора в виде нитей.

3. Гидролиз целлюлозы

При кислотном гидролизе целлюлозы образуется β -D-глюкоза.

В пробирку помещают кусочек хлопковой ваты (или измельченной фильтровальной бумаги), заливают его 72% раствором серной кислоты, растирают стеклянной палочкой в течение 20 мин, после чего раствор осторожно разводят водой в 3 раза, тщательно перемешивают и выдерживают в кипящей водяной бане 30 мин. После этого раствор охлаждают, перемешивают, берут $\frac{1}{4}$ объёма гидролизата с остатками ваты, нейтрализуют 40% раствором NaOH и проводят реакцию Фелинга. Положительная реакция свидетельствует о том, что при гидролизе целлюлозы образуется восстанавливающий сахар — β -D-глюкоза.

Можно провести более чувствительную реакцию на восстановление индиго.

Занятие 7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КРАХМАЛА В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Крахмал является оптически активным веществом, так как содержит хиральные атомы углерода, поэтому раствор крахмала вращает плоскость поляризации света. Метод определения содержания крахмала основан на

гидролизе крахмала соляной кислотой с последующим определением угла вращения плоскости поляризованного света гидролизатом на поляриметре. По этому методу крахмал определяется вместе с сахарами, которые в картофеле составляют до 1,5% (на сухой вес).

Ход работы. 5 г свежих клубней картофеля помещают в фарфоровую ступку, добавляют 5 мл 5% соляной кислоты, растирают до однородной массы, переносят в колбу ёмкостью 150 мл и приливают 25 мл 1 % соляной кислоты, одновременно ополаскивая ступку. Колбу ставят на 30 минут на кипящую водяную баню. Затем содержимое колбы переносят в мерную колбу ёмкостью 100 мл и добавляют 35 - 40 мл дистиллированной воды. После охлаждения приливают в колбу 1 мл раствора сульфата цинка (30 г на 1 л воды), а затем 1 мл железистосинеродистого калия (жёлтая кровяная соль, $K_4[Fe(CN)_6]$, 15 г на 100 мл воды), доливают воды до метки, перемешивают и фильтруют в сухую колбу. Берут нужное количество прозрачного фильтрата и определяют угол вращения в поляриметре, предварительно определив «ноль» на приборе.

$$\text{Расчёт проводится по формуле: } C = \frac{\alpha \cdot 100 \cdot 100}{[\alpha]_D^{20} \cdot l \cdot p},$$

где C – содержание крахмала во взятой навеске в % от сырого веса клубня;

α – угол вращения, найденный при отсчёте в поляриметре;

100 – коэффициент для выражения концентрации крахмала в г на 100 см³;

100 – коэффициент для пересчёта содержания крахмала в % от сырого веса клубня;

$[\alpha]_D^{20}$ – удельное вращение крахмала картофеля = 195,4 (для этих условий гидролиза); l – длина трубки = 2 дм; p – навеска клубней в г.

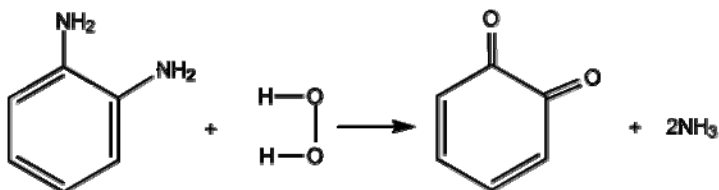
Удельное вращение — это угол вращения плоскости поляризации раствором, содержащим 1 г/см³ оптически активного вещества при толщине слоя 1 дм.

Занятие 8

ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ

1. Определение начальной скорости ферментативной реакции

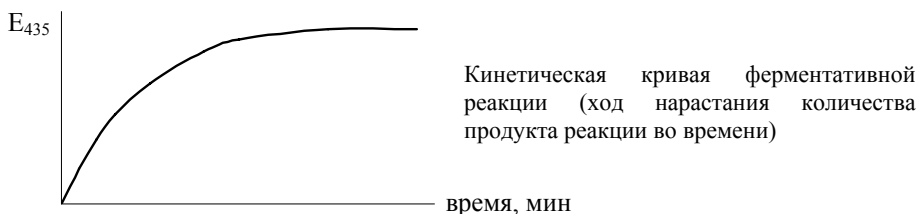
Каталитическая активность пероксидазы хрена определяется фотометрической регистрацией продукта окисления ортофенилендиамина, имеющего максимум поглощения при 435 нм.



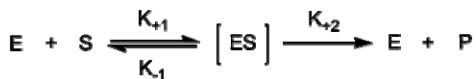
Ход работы. В две пробирки вносят по 0,1 мл пероксидазы (ПХ) + 0,5 мл ортофенилендиамина (ОФД), растворённого в фосфатно-цитратном буфере pH 5,0 (ФЦБ) + 3,4 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Раствор ОФД готовят перед внесением в пробирки: 4 мг ОФД растворяют при тщательном перемешивании в 10 мл ФЦБ.

Содержимое пробирки №1 переливают в контрольную кювету ФЭКа, пробирки №2 – в опытную. Прибор настраивают на «0» по контрольной кювете, после чего в опытную кювету, стоящую во 2-ом кюветодержателе, добавляют 0,2 мл H_2O_2 (готовят перед определением: 20 мкл 30%-ного раствора H_2O_2 доводят водой до 10 мл), перемешивают наконечником и начинают записывать показатели ФЭКа при 435 нм через 10, 20, 30, 60 сек, 2, 4, 6 мин и т.д. до выхода реакции на плато. По полученным результатам строят график зависимости E_{435} от времени.

Рассчитать начальную скорость реакции, то есть скорость реакции в начальный период, когда количество субстрата или продукта реакции изменяется пропорционально времени (*lga*). Начальную скорость реакции выразить в изменении оптической плотности продукта реакции за 1 мин:



2. Влияние концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции



Для односубстратной реакции зависимость начальной скорости от концентрации субстрата выражается уравнением Михаэлиса-Ментен:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]},$$

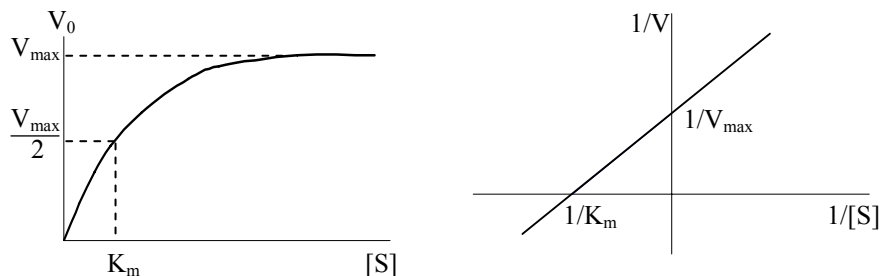
где V_0 – начальная скорость реакции при концентрации субстрата $[S]$;

V_{\max} – максимальная скорость реакции, наблюдаемая при насыщении всех активных центров субстратом;

K_m – константа Михаэлиса-Ментен, численно равная концентрации субстрата, при которой наблюдается половина максимальной скорости:

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}}.$$

Графическое выражение уравнения Михаэлиса-Ментен:



В случае односубстратной реакции задача сводится к тому, чтобы получить серию данных, характеризующих зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата, и к соответствующей графической обработке этих данных. В более часто встречающихся случаях двух- или трёхсубстратной реакции эксперимент ставят таким образом, что меняют концентрации только одного из субстратов, обеспечивая присутствие другого (других) в насыщающей концентрации.

В данной работе исследуется зависимость скорости реакции, катализируемой пероксидазой хрена (ПХ), от концентрации одного из субстратов – перекиси водорода при насыщающей концентрации другого субстрата – ортофенилендиамина (ОФД). Каталитическую активность ПХ определяют фотометрической регистрацией продукта окисления ортофенилендиамина, имеющего максимум поглощения при 435 нм. Ферментативная реакция останавливается раствором серной кислоты. При добавлении в реакционную смесь равного объема 0,1 М H_2SO_4 максимум спектра поглощения сдвигается на 50 нм в длинноволновую область, поэтому регистрацию оптической плотности проводят при 490 нм. рН-оптимум каталитической активности пероксидазы при использовании в качестве субстрата ОФД равен 5. В анализе необходимо использовать свежеприготовленные растворы субстратов и избегать воздействия на них сильного освещения.

Ход работы. В серию пробирок №1-8 (см. табл. 3) вносят фермент (ПХ), ФЦБ+ОФД, дистиллированную воду в количествах, указанных в нижеприведённой таблице, и тщательно перемешивают, после этого вносят второй субстрат – перекись водорода (см. табл. 3), перемешивают и инкубируют в течение 30 секунд. Для остановки реакции через 30 секунд в

каждую пробирку добавляют по 4,0 мл 0,1 М H₂SO₄, перемешивают и измеряют оптическую плотность при 490 нм. По полученным данным строят график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата и определяют K_m и V_{max}.

Для более точного определения величин K_m и V_{max} используют преобразования уравнения Михаэлиса-Ментен, предложенные Лайнувером-Берком:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Строят график зависимости $\frac{1}{V}$ от $\frac{1}{[S]}$ и графически определяют $\frac{1}{V_{\max}}$ и $\frac{1}{K_m}$.

Рассчитывают V_{max} и K_m.

Табл. 3. Приготовление реакционных смесей ферментативной реакции

№ пробирки	количество фермента (ПХ) (мл)	ФЦБ + ОФД, мл	H ₂ O, мл	H ₂ O ₂		E ₄₉₀
				мл	мМ	
1	0,1	0,5	3,4	0,0	0,0	
2	0,1	0,5	3,3	0,1	0,44	
3	0,1	0,5	3,2	0,2	0,88	
4	0,1	0,5	3,0	0,4	1,76	
5	0,1	0,5	2,8	0,6	2,64	
6	0,1	0,5	2,6	0,8	3,52	
7	0,1	0,5	1,8	1,6	7,04	
8	0,1	0,5	0,0	3,4	14,96	

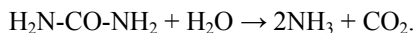
Занятие 9

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

1. Специфичность действия уреазы (КФ 3.5.1.5)

Специфичность — одно из замечательных свойств ферментов, обеспечивающих возможность координации сложнейших внутриклеточных процессов. Степень специфичности весьма разнообразна.

Уреаза обладает абсолютной специфичностью, то есть действует только на один субстрат — мочевины, разлагая её на аммиак и диоксид углерода:



Ацетамид ($\text{NH}_2\text{-CO-CH}_3$), несмотря на гомологичное с мочевиной строение, не разлагается уреазой. Активная уреаза содержится в семенах сои, арбуза.

Ход работы. В пробирку №1 наливают 5 мл 2% раствора мочевины, в пробирку №2 — столько же 2% раствора ацетамида; в каждую пробирку добавляют по 1 г соевой муки, перемешивают, подвешивают смоченную водой лакмусовую бумагу и закрывают пробками. Через несколько минут в пробирке №1 можно обнаружить по запаху или посинению лакмусовой бумаги выделение аммиака; в пробирке №2 реакция отрицательна. Если затем добавить в обе пробирки по 2-3 капли фенолфталеина, то в пробирке №1 раствор окрашивается в малиновый цвет, что указывает на подщелачивание среды аммиаком.

2. Влияние температуры на активность β-фруктофуранозидазы (КФ 3.2.1.26; сахараза, инвертаза)

На активность ферментов оказывает влияние температура: низкая температура снижает активность, а повышение температуры от минимальной до оптимальной увеличивает активность ферментов. Высокие температуры (для большинства ферментов выше +60°C) ингибируют фермент, вызывая его денатурацию.

β-Фруктофуранозидаза вызывает гидролитическое расщепление сахарозы на глюкозу и фруктозу по уравнению: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Этот фермент обычно получают из дрожжей и плесневых грибов.

Ход работы. В четыре пронумерованные пробирки наливают по 1 мл вытяжки фермента, а в другие четыре пробирки - по 5 мл раствора сахарозы. Пробирки №1 ставят в сосуд со снегом или толчёным льдом (0°C), пробирки №2 оставляют при комнатной температуре, пробирки №3 ставят в водяную баню, нагретую до +35°C, пробирки №4 тщательно кипятят (+100°C). Пробирки выдерживают при соответствующей температуре 10 минут. После этого добавляют во все пробирки по 5 мл раствора сахарозы (соответствующей температуры) и выдерживают 15 мин пробирку №1 в сосуде со снегом, пробирку №2 - при комнатной, №3 – при +35°C, пробирку №4 – на кипящей водяной бане (100°C). Продукты гидролиза сахарозы ферментом (глюкоза и фруктоза) восстанавливают в реакции Фелинга гидроокись меди до закиси меди в щелочной среде (см. занятие 5, реакция Фелинга). По истечении 15 минут во все пробирки приливают по 5 мл реактива Фелинга и нагревают в кипящей водяной бане. Выпадает красный осадок Cu_2O , по количеству которого судят о влиянии температуры на активность β-фруктофуранозидазы.

3. Влияние pH среды на активность амилазы (КФ 3.2.1.1. α -амилаза; КФ 3.2.1.2. β -амилаза)

Для большинства ферментов имеется определённое значение pH, при котором их активность максимальна. Оптимум pH для действия амилазы на крахмал можно определить при различных значениях pH среды. О степени расщепления полисахарида можно судить по реакции крахмала с раствором йода. При оптимальном значении pH расщепление крахмала произойдет полностью (окраска с йодом отсутствует). По мере удаления от точки оптимального значения pH в кислую или щелочную область расщепление крахмала произойдет только частично до стадии декстринов (красно-бурая или фиолетовая окраска в реакции с йодом) или крахмал не будет расщепляться (синяя окраска смеси с йодом).

Ход работы. В три пронумерованные пробирки наливают по 1 мл буферной смеси: в пробирку №1 — с pH 5,6, в пробирку №2 — с pH 6,8 и в пробирку №3 — с pH 7,8. Затем в каждую пробирку вносят по 1 мл 0,5% раствора крахмала и по 1 мл раствора амилазы солода, перемешивают и ставят в водяную баню при температуре 37°C. Через каждые 1-2 минуты проводят капельную пробу с раствором йода: из всех пробирок берут по одной капле инкубационной смеси, наносят на предметное стекло (на белом фоне) и добавляют по капле раствора йода. По мере гидролиза крахмала синяя окраска будет постепенно изменяться до фиолетовой, фиолетово-красной, красно-бурой и жёлтой, свидетельствующей о завершении гидролиза крахмала. Отмечают, какое значение pH среды для действия амилазы будет оптимальным.

4. Влияние активаторов и ингибиторов на активность α -амилазы слюны (КФ 3.2.1.1.)

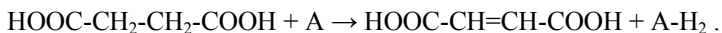
Большое влияние на активность ферментов оказывают активаторы и ингибиторы – ионы металлов или органические вещества (иногда довольно сложного состава).

Получение ферментного препарата амилазы слюны: ополаскивают рот водой для удаления остатков пищи, затем набирают 10-20 мл дистиллированной воды, выдерживают во рту 2-3 минуты и сливают в стакан.

Ход работы. В три пронумерованные пробирки приливают по 1 мл раствора амилазы слюны. В пробирку №1 добавляют 2 капли 1% раствора хлорида натрия, в пробирку №2 – 2 капли 1% раствора сульфата меди. Затем в каждую пробирку приливают по 2 мл 0,5% раствора крахмала, перемешивают и ставят пробирки в штатив при комнатной температуре. Через каждые 2-3 минуты из всех пробирок берут пробы по 1-2 капли на предметные стёкла, добавляют по 1 капле раствора йода, устанавливают степень гидролиза крахмала по окраске йодом в разных вариантах опыта и по полученным результатам судят о влиянии хлорида натрия и сульфата меди на активность α -амилазы слюны.

5. Влияние малоната на активность сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1.)

Сукцинатдегидрогеназа, коферментом которой является ФАД, катализирует окисление янтарной кислоты до fumarовой, перенося два атома водорода на какой-либо акцептор (А):



Метод основан на использовании в качестве акцептора водорода метиленовой сини, которая восстанавливается, переходя в бесцветную лейкоформу. Малонат (HOOC-CH₂-COOH) является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы. Его структура сходна со структурой субстрата (янтарной кислотой) этого фермента, т.о. малонат связывается в активном центре фермента и тормозит протекание нормальной реакции.

Ход работы. В три пронумерованные пробирки наливают по 3,5 мл растёртой водной взвеси дрожжей (источник фермента). Затем добавляют по 0,5 мл 2% раствора сукцината натрия (субстрат). Во вторую пробирку вносят 0,5 мл, а в третью 2 мл 0,05% раствора малоната натрия (ингибитор). Общий объём смеси всех пробирок доводят дистиллированной водой до 6 мл. После чего в каждую пробирку вносят по 0,5 мл 0,2% раствора метиленовой сини, содержимое пробирок перемешивают, прибавляют несколько капель вазелинового масла (для предотвращения контакта с воздухом) и ставят все пробирки в водяную баню или термостат при +37°C. Через 5-10 минут отмечают степень обесцвечивания метиленовой сини и записывают результаты.

В пробирке №1 (контроль) за счёт деятельности сукцинатдегидрогеназы янтарная кислота окисляется, при этом восстанавливается метиленовая синь, которая из окрашенного состояния переходит в неокрашенное. В пробирке №2 наряду с субстратом присутствует конкурентный ингибитор — малонат, но в недостаточной концентрации, чтобы вызвать сильное подавление активности фермента. В пробирке №3 содержание ингибитора в 4 раза больше, чем в пробирке №2, что вызывает более отчётливое ингибирование фермента.

Занятие 10

ОБЩИЕ СВОЙСТВА ЛИПИДОВ

Липиды – это природные органические соединения, к которым относятся нейтральные липиды, воска, фосфолипиды, гликолипиды, стероиды. Несмотря на то, что они различны по своему составу, их объединяют в одну группу, прежде всего, по растворимости. Все липиды нерастворимы в воде, а растворимы в органических растворителях: эфире, хлороформе, бензине, спирте.

Нейтральные липиды – это сложные эфиры трёхатомного спирта глицерина и высших жирных кислот, называемые ацилглицеринами. Часто нейтральные липиды называют просто жирами.

1. Растворимость жиров

В ряд пробирок наливают по 2-3 мл воды, спирта, хлороформа, эфира, ацетона, во все прибавляют по 1-2 капли масла. Сравнивают растворимость жира в воде и органических растворителях.

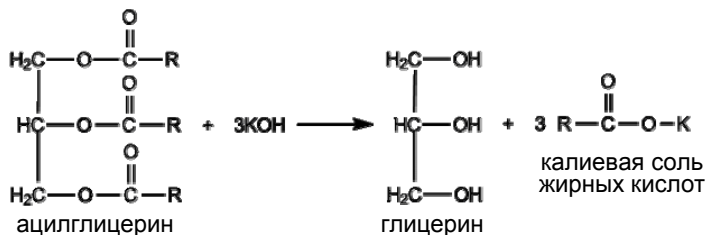
2. Эмульгирование жиров

Жиры не растворяются в воде. При смешивании жиров с водой образуются эмульсии, стойкость которых зависит от среды, в которой она образуется. Наличие в воде веществ-эмульгаторов (мыла, желчные кислоты, карбонаты) делает эмульсии более стойкими. Образование эмульсий обусловлено тем, что в поверхностный водный слой, окружающий жировые капельки устремляются поверхностно-активные частицы эмульгаторов, которые обволакивают капельки жира и препятствуют их слиянию.

В четыре пробирки наливают по 3 мл воды и добавляют по 2-3 капли масла. Затем во вторую пробирку вносят 3-4 капли 10% раствора соды, в третью - желчи, в четвёртую - белка. Все пробирки закрывают, взбалтывают и оставляют на 5 мин отстояться. Сравнивают стойкость эмульсии.

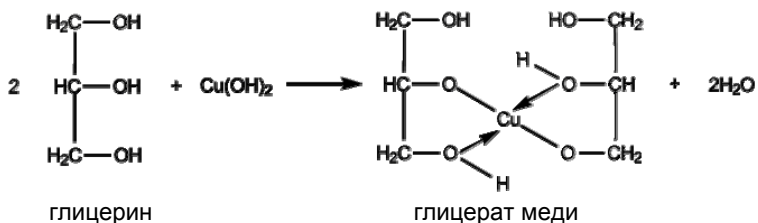
3. Гидролиз жира и открытие в гидролизате его составных частей

Гидролиз, или омыление, жиров едкими щелочами приводит к образованию глицерина и солей высших жирных кислот:



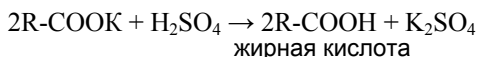
В пробирку набирают 20 капель масла и 2-3 капли спиртового раствора КОН. Пробирку нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником 15-20 мин до образования однородного раствора. К полученному гидролизату добавляют 6-8 мл воды, взбалтывают и используют для открытия глицерина и жирных кислот.

1) *Открытие глицерина.* К 2-3 мл гидролизата добавляют равный объём 10% раствора щёлочи (NaOH) и несколько капель 2% раствора CuSO₄. Встряхивают. Наблюдается появление слабо-синей окраски в результате образования глицерата меди.

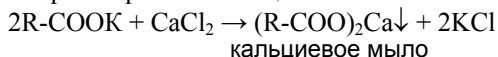


Стрелками в формуле глицерата меди показано образование ковалентных связей медь – кислород по донорно-акцепторному механизму.

2) *Открытие жирных кислот.* Оставшийся гидролизат разливают в две пробирки. В первую добавляют равный объем 10% H_2SO_4 и помещают в кипящую баню до образования на поверхности раствора слоя жирных кислот:



3) *Получение нерастворимого кальциевого мыла.* Во вторую пробирку добавляют 5-6 капель 10% CaCl_2 . Пробирку встряхивают. Наблюдается появление осадка – нерастворимого кальциевого мыла:



4. Определение кислотного числа жира

Кислотное число характеризует кислотность жира и измеряется количеством мг KOH , необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира. При хранении масла наблюдается гидролиз ацилглицеринов, который приводит к накоплению свободных жирных кислот, т. е. к возрастанию кислотности. Повышенная кислотность жира указывает на снижение его качества.

В первую колбу помещают 1 г свежего масла, во вторую — 1 г прогорклого масла. В каждую колбу наливают по 10 мл смеси эфира и спирта (1:1). После растворения жира вносят 1-2 капли фенолфталеина и оттитровывают 0,1 н спиртовым раствором KOH до слабо-розового окрашивания. Кислотное число вычисляют по формуле:

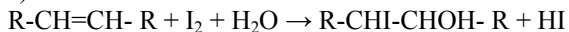
$$X = \frac{V \cdot 5,6}{a},$$

где V – количество мл 0,1 н раствора KOH , израсходованного на титрование навески жира; a – навеска жира, г; 5,6 – количество мг KOH , содержащееся в 1 мл 0,1 н раствора.

5. Определение йодного числа рефрактометрическим методом (по Ермакову)

Йодное число показывает, сколько граммов йода может быть связано 100 г жира и характеризует степень непредельности жиров (наличие

двойных связей).



Йодное число определяется по показателю преломления масла на рефрактометре.

Ход работы. Измеряют на рефрактометре показатель преломления растительного масла. Для расчёта йодного числа используют формулу, предложенную автором метода:

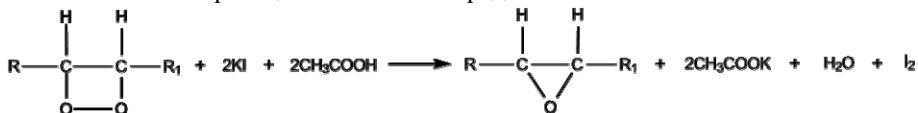
$$I = \frac{(n_D^{20} - 1.4595) \cdot 100}{0.0118},$$

где n_D^{20} - показатель преломления данного масла.

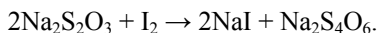
6. Определение перекисного числа

В присутствии кислорода воздуха входящие в состав жиров кислоты могут частично окисляться и образовывать перекиси. Это явление наблюдается при порче жиров, а также при их высыхании. Таким образом, перекисное число служит показателем окислительных изменений жиров. Обычно перекисное число выражается в граммах йода, который выделяется из KI перекисями, содержащимися в 100 г жира.

Определение перекисного числа основано на том, что перекиси жира в кислой среде способны реагировать с йодистым калием, выделяя из него йод. Схематически эта реакция может быть представлена так:



Выделяющийся йод оттитровывают раствором гипосульфита:



По количеству гипосульфита, затраченному на связывание выделившегося йода, вычисляют перекисное число.

Ход работы. На аналитических весах взвешивают около 1 г жира и помещают его в коническую колбу ёмкостью 150-200 мл. В другую колбу (контроль) наливают 2-3 мл воды. В обе колбы наливают по 10 мл хлороформа и растворяют жир. Затем в колбы добавляют по 20 мл ледяной уксусной кислоты и по 1 мл раствора йодистого калия. Смесь тщательно перемешивают и оставляют на 3 мин. Затем в колбы прибавляют по 1 мл 1% раствора крахмала и выделившийся йод титруют 0,01 н раствором гипосульфита до исчезновения синей окраски.

Вычисление результатов проводят по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 0.001269 \cdot 100}{H},$$

где:

X – перекисное число;

a – количество 0,01 н раствора гипосульфита, израсходованное на титрование йода, выделившегося в результате реакции жира с йодистым калием (мл);

b – количество 0,01 н раствора гипосульфита, израсходованное в контрольном определении (мл); T – поправка к титру раствора гипосульфита;

H – навеска жира; 0,001269 – титр 0,01 н раствора гипосульфита.

7. Определение числа омыления и эфирного числа

Числом омыления называется количество миллиграммов KOH, необходимое для нейтрализации всех жирных кислот, содержащихся в 1 г жира, как свободных, так и входящих в состав триацилглицеринов. Эфирным числом называется количество миллиграммов KOH, необходимое для нейтрализации жирных кислот, которые отщепляются при омылении триацилглицеринов, содержащихся в 1 г жира.

1) *Определение числа омыления.* Отвешивают в колбу на аналитических весах 1 г масла (опыт), вливают 20 мл спиртового раствора KOH, соединяют с обратным холодильником и ставят на кипящую водяную баню на 40-50 мин. Колбу отделяют от холодильника, охлаждают, добавляют 2 капли раствора фенолфталеина, 10 мл воды, перемешивают и титруют из бюретки 0,5 н раствором HCl до исчезновения окраски. То же самое проделывают с контрольной колбой, в которой масло заменено 1 мл воды. По разности титрования контрольной и опытной колб рассчитывают число омыления:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 28}{H},$$

где V_1 – количество миллилитров 0,5 н раствора HCl, израсходованное на контрольное титрование; V_2 – то же на опытное титрование; H – навеска масла; 28 – количество миллиграммов KOH, содержащееся в 1 мл 0,5 н раствора.

2) *Определение эфирного числа.* Эфирное число жира рассчитывают путём вычитания из числа омыления величины кислотного числа.

Занятие 11

ВИТАМИНЫ

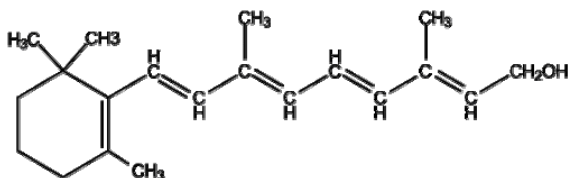
Витамины – низкомолекулярные органические вещества различной химической природы, абсолютно необходимые для нормальной жизнедеятельности любого организма. Многие из них являются составной частью ферментов и выполняют каталитические функции.

Для обнаружения витаминов в пищевых продуктах или других биологических объектах обычно пользуются качественными реакциями, основанными на образовании характерного окрашенного продукта реакции витамина с каким-либо химическим реактивом.

I. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ

1. Качественная реакция на ретинол (витамин А) с концентрированной серной кислотой

Витамин А имеет несколько витамеров, из которых наиболее распространённым является А₁ (ретинол, антиксерофтальмический витамин):



Витамин А хорошо растворим в жирах и жирорастворителях: бензине, хлороформе, ацетоне и др.

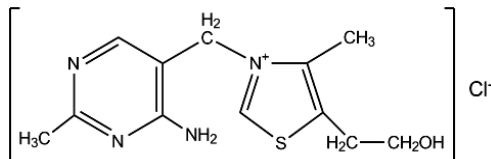
Предполагают, что витамин А участвует в окислительно-восстановительных процессах, входит в состав зрительного пурпура – родопсина, находящегося в палочках сетчатки и принимающего участие в процессе зрения.

Реакция Друммонда. В сухой пробирке смешивают 1 каплю рыбьего жира с 5 каплями хлороформа и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Рыбий жир можно заменить раствором ретинола. Жидкость приобретает фиолетово-красный цвет, переходящий в бурый.

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

2. Качественные реакции на тиамин (витамин В₁)

Витамин В₁ (тиамин, антиневритный витамин) является соединением, содержащим тиазоловое и пиримидиновое кольца.



Наличие серы и азота в молекуле дало основание назвать его тиаминном.

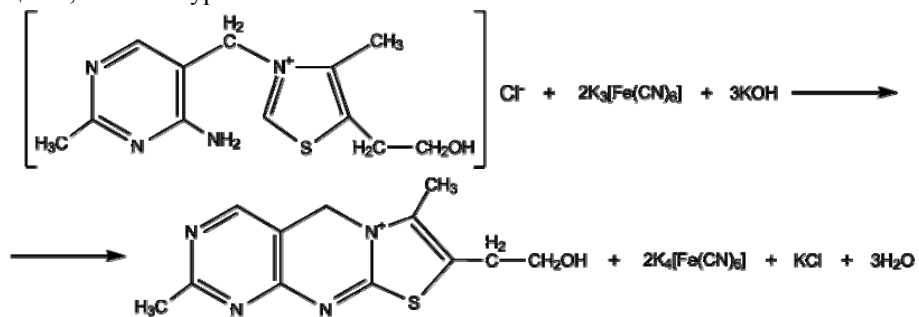
Витамин В₁ играет важную роль в процессах превращения углеводов, так как входит в состав фермента пируватдекарбоксилазы, расщепляющего образующуюся при диссимиляции углеводов пировиноградную кислоту на

уксусный альдегид и CO_2 . Витамин B_1 входит в состав пируватдекарбоксилазы в виде фосфорного эфира — тиаминпирофосфата.

1) *Диазореакция на тиамин.* Тиамин в щелочной среде с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

К 5 каплям 1% раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 5 капель нитрита натрия (азотистокислого натрия). Получается диазореактив. К этому реактиву добавляют на кончике стеклянной палочки небольшое количество тиамин в порошке и затем добавляют 5-7 капель 10% раствора соды. Появляется оранжевое окрашивание.

2) *Реакция окисления тиамин в тиохром.* Тиамин (I) под действием железосинеродистого калия окисляется в тиохром (II) — пигмент жёлтого цвета, согласно уравнению:

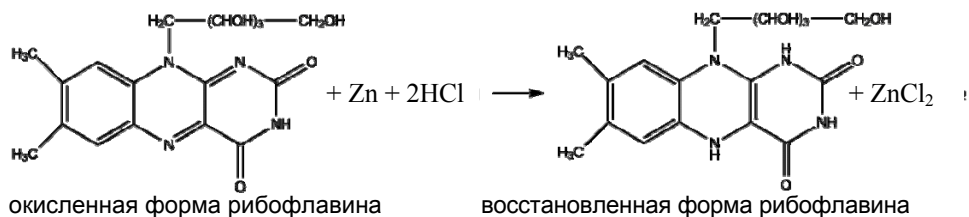


1 каплю 5% раствора тиамин (или небольшое количество тиамин - на кончике стеклянной палочки - растворяют в очень небольшом объёме воды) смешивают в пробирке с 5-10 каплями 10% раствора гидроксида натрия и затем добавляют 1-2 капли 5% раствора железосинеродистого калия. Нагревание смеси приводит к её окрашиванию в жёлтый цвет в результате окисления тиамин в тиохром, который в щелочном растворе при облучении ультрафиолетом обладает интенсивной синей флуоресценцией.

3. Качественная реакция восстановления рибофлавина (витамина B_2)

В виде фосфорного эфира рибофлавин входит в состав окислительно-восстановительных ферментов, участвующих в переносе водорода.

Реакция на витамин B_2 основана на его способности легко восстанавливаться:



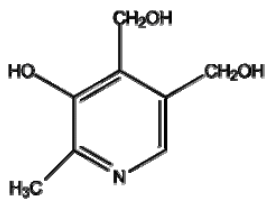
жёлтого цвета

бесцветного

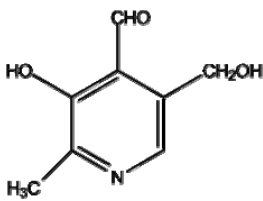
В пробирку наливают 10 капель раствора рибофлавина, добавляют 10 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с рибофлавином, и раствор изменяет окраску из жёлтой в розовую, а затем обесцвечивается. При встряхивании обесцвеченный раствор вновь окисляется кислородом воздуха и рибофлавин жёлтого цвета.

4. Феррихлоридная проба на пиридоксин (витамин В₆)

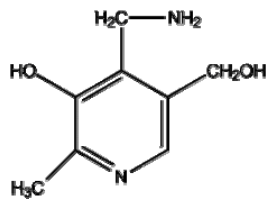
Активностью витамина В₆ обладает группа веществ, производных пиридина и носящих общее название пиридоксин. К ним относятся отличающиеся только характером замещения радикала в 4-м положении:



пиридоксол



пиридоксаль



пиридоксамин.

Каждое из этих соединений может превратиться в фосфопиридоксаль, который является составной частью ферментов, катализирующих реакции белкового обмена: реакции переаминирования, декарбоксилирования аминокислот и некоторые другие.

Витамин В₆ с хлорным железом образует соединение типа фенолята железа, окрашенное в красный цвет.

К 5 каплям 1% раствора витамина В₆ приливают такое же количество 1% раствора хлорного железа, перемешивают. Смесь окрашивается в красный цвет.

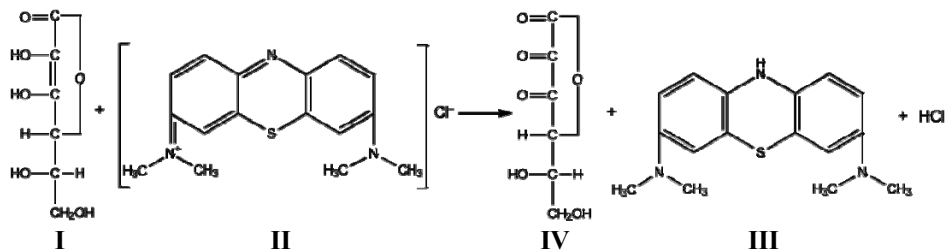
5. Качественные реакции на аскорбиновую кислоту (витамин С)

Витамин С (аскорбиновая кислота, антицинготный витамин) является лактоном L-дикетоглуоновой кислоты. Аскорбиновая кислота в организме является участником окислительно-восстановительных систем.

Аскорбиновая кислота – окисленное производное шестиатомного спирта сорбита – содержит диенольную группу —C=C— , которая обуславливает способность витамина С легко подвергаться окислению с одновременным восстановлением других соединений. Реакции на аскорбиновую кислоту основаны на её способности легко окисляться.

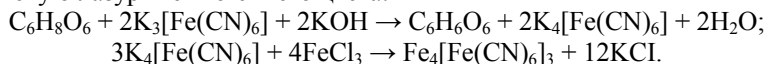
1) Восстановление метиленовой сини аскорбиновой кислотой.

Аскорбиновая кислота (I) обесцвечивает раствор метиленовой сини (II), восстанавливая краску в лейкосоединение (III), окисляясь в дегидроаскорбиновую кислоту (IV):



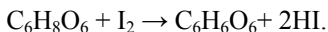
В двух пробирках смешивают по 1 капле 0,01% раствора метиленовой сини и 10% раствора бикарбоната натрия, добавляя затем в одну из них 5 капель аскорбиновой кислоты, а в другую – столько же дистиллированной воды. Нагревание пробирок приводит к обесцвечиванию жидкости в пробирке с аскорбиновой кислотой.

2) *Восстановление феррицианида калия аскорбиновой кислотой.* Аскорбиновая кислота восстанавливает железосинеродистый калий $K_3[Fe(CN)_6]$ в железистосинеродистый калий $K_4[Fe(CN)_6]$, который образует с хлорным железом плохо растворимую в воде соль трёхвалентного железа – берлинскую лазурь тёмно-синего цвета:



К 5 каплям 1% раствора витамина С приливают 1 каплю 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю 5% железосинеродистого калия, перемешивают, после чего добавляют 3 капли 10% раствора соляной кислоты и 1 каплю 1% раствора хлорного железа. Выпадает синий осадок берлинской лазури. Для контроля проделывают те же реакции, добавляя вместо раствора витамина С дистиллированную воду. В этом случае берлинская лазурь не образуется (отметить цвет раствора в контрольной пробирке).

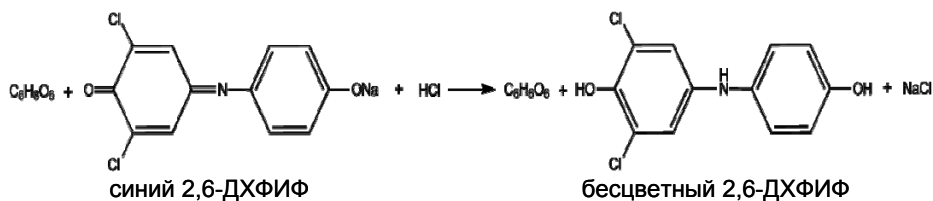
3) *Йодная проба на аскорбиновую кислоту.* Раствор йода в йодиде калия при добавлении к нему раствора аскорбиновой кислоты обесцвечивается за счёт восстановления аскорбиновой кислотой молекулярного йода и образования йодисто-водородной кислоты:



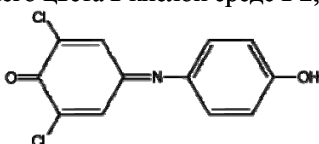
В две пробирки наливают по 10 капель дистиллированной воды и по 1-2 капли раствора йода в растворе йодида калия. В одну пробирку добавляют 10 капель раствора аскорбиновой кислоты, в другую – столько же дистиллированной воды. В пробирке с аскорбиновой кислотой раствор йода обесцвечивается.

II. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Принцип метода количественного определения витамина С основан на его способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол (2,6-ДХФИФ):



Количественное определение витамина С проводят, титруя исследуемый раствор, подкисленный соляной кислотой, щелочным раствором 2,6-ДХФИФ. Пока в титруемом растворе содержится витамин С, приливаемый щелочной раствор 2,6-ДХФИФ будет обесцвечиваться за счёт образования восстановленной формы. Как только всё количество витамина С, имеющееся в исследуемом растворе, окислится, 2,6-ДХФИФ не будет восстанавливаться, и титруемый раствор приобретёт розовую окраску за счёт перехода щелочного раствора 2,6-ДХФИФ синего цвета в кислой среде в 2,6-ДХФИФ красного цвета:



Зная количество 2,6-ДХФИФ, израсходованное на титрование, и его титр по аскорбиновой кислоте, вычисляют содержание аскорбиновой кислоты в исследуемом растворе.

Ход работы. Точную навеску одного из исследуемых материалов (сухих ягод шиповника – 1 г, хвои – 1 г, капусты – 5 г, картофеля – 5 г) тщательно растирают в фарфоровой ступке с 4 мл 2% соляной кислоты, добавив немного измельчённого стекла. Затем без потерь переносят содержимое ступки в мерную колбу на 25 мл, несколько раз смывая ступку водой и сливая её по стеклянной палочке в ту же колбу, и доводят дистиллированной водой до метки. Полученную смесь оставляют на 5-10 мин. Содержимое колбы тщательно перемешивают, фильтруют через бумажный фильтр, и фильтрат используют для определения витамина С. Экстракт, полученный из картофеля, не фильтруют.

Для титрования отмеривают в коническую колбочку определённый объём фильтрата (шиповника – 1 мл, хвои – 5 мл, капусты – 5 мл, картофеля – всю полученную смесь без фильтрации), добавляют 4 мл 2% раствора соляной кислоты и титруют из бюретки 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего около 30 с. Одновременно проводят контрольное титрование смеси реактивов, заменив исследуемый фильтрат дистиллированной водой.

Расчёт количества аскорбиновой кислоты в пробе производят по формуле:

$$X = \frac{T \cdot A \cdot C \cdot 100}{B \cdot D},$$

где X - содержание аскорбиновой кислоты в мг%;

T — титр раствора 2,6-ДХФИФ по аскорбиновой кислоте, т.е. это количество аскорбиновой кислоты (мг), соответствующее 1 мл раствора 2,6-ДХФИФ;

A — количество раствора 2,6-ДХФИФ (мл), израсходованное на титрование, за вычетом контроля; B — количество мл вытяжки, взятое для титрования;

C — общее количество вытяжки (мл); D — количество вещества в граммах, взятое для анализа; 100 — количество граммов исследуемого материала, взятое для вычисления процентного содержания.

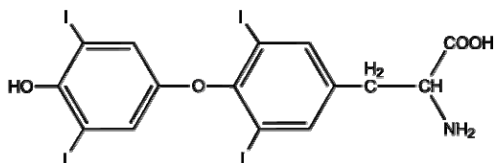
Занятие 12

ГОРМОНЫ

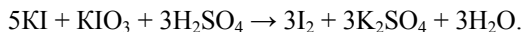
Гормоны – биологически активные вещества, оказывающие регуляторное действие на процессы обмена веществ и функционирование органов и тканей. Они вырабатываются в эндокринных железах и поступают непосредственно в кровь. Гормоны имеют различную химическую природу (полипептиды, производные аминокислот и др.).

I. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ТИРОКСИН

Тироксин является высокоактивным йодосодержащим тиреоидным гормоном щитовидной железы:



В качестве исследуемого материала используются таблетки тиреоидина. При разрушении тиреоидина образуется йодид калия, из которого йод легко вытесняется йодатом калия. Вытеснение йода из соли йодисто-водородной кислоты является окислительно-восстановительной реакцией, где йодид калия служит восстановителем, а йодат калия (остаток йодноватой кислоты) – окислителем. Выделившийся йод обнаруживают с помощью крахмала (синее окрашивание) в кислой среде:

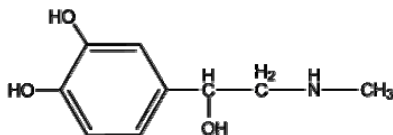


I. Гидролиз тиреоидина. В ступку помещают 10 таблеток тиреоидина и тщательно их растирают. Растёртую массу пересыпают в колбочку для гидролиза, добавляют 20 мл 10% раствора бикарбоната натрия. Колбу с обратным холодильником помещают на асбестовую сетку и содержимое колбы кипятят точно 15 мин (с момента закипания) и обязательно при умеренном нагревании.

2. *Обнаружение йода в гидролизате.* В пробирку наливают 1 мл охлаждённого гидролизата, прибавляют 10% раствор серной кислоты до кислой среды по лакмусовой бумаге, 3 капли 1% раствора крахмала и 1 мл йодата калия. Выделившийся свободный йод даёт синее окрашивание с крахмалом.

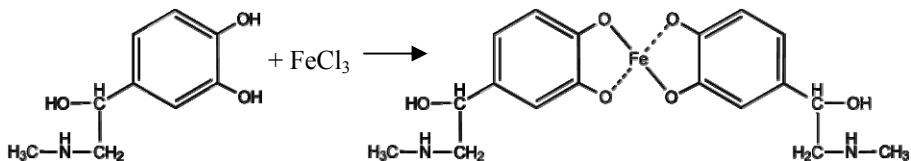
II. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АДРЕНАЛИН

Гормон адреналин вырабатывается мозговым слоем надпочечников, образуется из аминокислот тирозина или фенилаланина:



Адреналин повышает обмен веществ и оказывает сильное влияние на углеводный обмен, усиливает распад гликогена, вызывая повышение содержания сахара в крови и глюкозурию. Адреналин влияет на сердечно-сосудистую систему, увеличивая кровяное давление и усиливая работу сердца.

1. *Реакция с хлорным железом.* При добавлении к раствору адреналина хлорного железа жидкость окрашивается в зелёный цвет вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа. Реакция характерна для пирокатехинового кольца, входящего в молекулу адреналина.



К 3 каплям раствора адреналина (1:1000) прибавляют 1 каплю 1% раствора хлорного железа. Жидкость приобретает изумрудно-зелёное окрашивание. При добавлении 1 капли концентрированного раствора аммиака окраска переходит в красную, а затем коричневую.

2. *Диазореакция.* При добавлении к раствору адреналина диазореактива жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

В пробирку помещают 3 капли 1% раствора сульфаниловой кислоты, 3 капли 5% раствора нитрита натрия (азотистокислого натрия), 5 капель раствора адреналина (1:1000) и 3 капли 10% раствора углекислого натрия (Na_2CO_3) или NaOH . Жидкость окрашивается в красный цвет.

3. *Реакция с иодноватокислым калием.* К 4 каплям раствора адреналина (1:1000) прибавляют 8 капель 1% раствора йодата калия (KIO_3), 2 капли 10% раствора уксусной кислоты и подогревают до температуры +60 - 65°C. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

III. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДРЕНАЛИНА (по Фолину)

Метод основан на колориметрическом определении интенсивности синего окрашивания, которое образуется при взаимодействии адреналина с реактивом Фолина, который состоит из солей фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот. Эти соли при взаимодействии с адреналином восстанавливаются с образованием более низких окислов металлов, комплексы которых окрашиваются в синий цвет.

Ход работы. В сухую пробирку отмеривают пипеткой 1 мл испытуемого раствора адреналина, 4 мл 2% раствора гидроксида натрия и 0,5 мл реактива Фолина. Содержимое пробирки встряхивают. Через 5 минут интенсивность полученного синего окрашивания измеряют на ФЭКе с красным светофильтром против контроля, содержащего 1 мл дистиллированной воды, 4 мл 2% раствора гидроксида натрия и 0,5 мл реактива Фолина.

Зная оптическую плотность, испытуемого раствора, по калибровочной кривой определяют неизвестную концентрацию адреналина в граммах на литр. Калибровочную кривую строят с пробами, содержащими 0,01; 0,02; 0,04 г/л адреналина, добавив все реактивы, как и в исследуемый раствор. На оси абсцисс откладывают значения концентраций стандартных растворов адреналина, на оси ординат — величины оптической плотности окрашенных растворов, соответствующих этим концентрациям.

Занятие 13

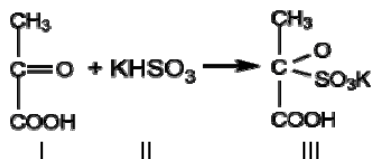
МЕТАБОЛИЗМ. ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ОБМЕН

I. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

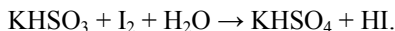
Пировиноградная кислота – один из промежуточных продуктов обмена углеводов. Пировиноградная кислота — нормальная составная часть плазмы крови (0,8—1,5 мг%). При недостатке витамина В1 и вызванном вследствие этого нарушении процесса декарбоксилирования кетокислот значительно увеличивается содержание пировиноградной кислоты в крови, мозге и других тканях. Содержание этой кислоты в крови возрастает при сахарном диабете, сердечной недостаточности.

Пировиноградная кислота выделяется с мочой 113,7 – 283,9 мкмоль/сут (10 – 25 мг/сут; до 200 мг в сутки). Исследуя содержание ее в суточном количестве мочи, можно судить о течении процессов углеводного обмена.

Пировиноградная кислота (I) в кислой среде с солями сернистой кислоты (II) (бисульфитом калия или натрия) образует бисульфитное соединение (III):



Избыток соли сернистой кислоты затем связывают йодом:



Бисульфитное соединение пировиноградной кислоты (III) разрушается в щелочной среде с освобождением бисульфита, количество которого эквивалентно содержанию пировиноградной кислоты. Количество освободившегося бисульфита определяют титрованием иодом.

Ход работы. В колбочку вносят пипеткой 1 мл мочи, добавляют 9 мл воды и 1 мл 0,1 н раствора щавелевой кислоты. Приливают 10 капель 1% раствора бисульфита калия или натрия, смесь взбалтывают и колбу ставят в темное место на 15 мин. По истечении указанного времени вносят 1 мл 1% раствора крахмала и избыток бисульфита связывают 0,1 н раствором йода (KI), добавляя его каплями до появления синего окрашивания. Для удаления избытка йода приливают по каплям 0,1 н раствор тиосульфата натрия до обесцвечивания содержимого колбы, после чего для связывания избытка тиосульфата по каплям прибавляют 0,01 н раствор йода до появления синего окрашивания от последней капли раствора. Затем приливают 10 капель насыщенного раствора бикарбоната натрия (синяя окраска исчезает) и жидкость в колбе титруют из микробюретки 0,01 н раствором йода до восстановления синего окрашивания, сохраняющегося 20 – 30 сек.

Содержание пировиноградной кислоты С в моче (мг/сут) рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{E \cdot A \cdot 0.01 \cdot B}{1.0},$$

где: *E* – грамм-эквивалент пировиноградной кислоты; *A* – количество 0,01 н раствора йода (KI), израсходованное на титрование, мл; 0,01 – нормальность раствора йода; *B* – суточное количество мочи, мл; 1.0 – количество мочи, взятое для исследования, мл.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

Мочевая кислота у человека является конечным продуктом обмена пуриновых оснований, входящих в состав сложных белков – нуклеопротеинов. В норме у человека с мочой выделяется мочевой кислоты 1,5 - 4,5 ммоль/сут. (250 - 750 мг/сут.). Выделение мочевой кислоты зависит от содержания пуринов в пище и интенсивности обмена нуклеопротеинов.

Гипоурикурия (гипоурикозурия) – уменьшение выделения мочевой кислоты с мочой, отмечается при подагре, нефрите, почечной недостаточности; гиперурикурия (гиперурикозурия) – увеличение выделения мочевой кислоты с мочой - при лейкемии, усиленном распаде нуклеопротеинов. У детей выделяется больше мочевой кислоты, чем у взрослых.

Метод основан на способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорно-вольфрамовый реактив Фолина в фосфорно-вольфрамовую синь (окислы вольфрама), интенсивность окраски которой пропорциональна содержанию мочевой кислоты. Количество фосфорно-вольфрамовой сини определяется путем титрования красной кровяной солью $K_3[Fe(CN)_6]$, которая окисляет фосфорно-вольфрамовую синь и синее окрашивание исчезает.

Ход работы. К 1,5 мл мочи прибавляют 1 мл 20% раствора карбоната натрия и 1 мл реактива Фолина, перемешивают (жидкость окрашивается в синий цвет) и титруют 0,01н раствором $K_3[Fe(CN)_6]$ до исчезновения синего окрашивания и приобретения смесью зеленого цвета.

Содержание мочевой кислоты (в мг) в суточной моче вычисляют по формуле:

$$C = \frac{0.8 \cdot a \cdot b}{1.5},$$

где:

C – содержание мочевой кислоты, мг/сут.,

0,8 – 0,8 мг мочевой кислоты соответствует 1 мл $K_3[Fe(CN)_6]$,

a – количество $K_3[Fe(CN)_6]$, пошедшее на титрование, мл;

b – суточный диурез (суточное количество мочи), мл;

1,5 – объем пробы, мл.

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/сут) равен 0,0059.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алейникова Т.Л., Рубцова В.Г. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. – М.: Высшая школа, 1988. – 239 с.
2. Землянухин А.А. Малый практикум по биохимии. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1985. – 128 с.
3. Кучеренко Н.Е. и др. Биохимия: Практикум. – Киев: Выща школа. Изд-во при Киевском ун-те, 1988. – 128 с.
4. Сиянова Н.С., Неуструева С.Н. Методическое руководство для практикума по биохимии. – Казань: Изд-во КГУ, 1999. - 43 с.
5. Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия. – М.: Дрофа, 2004. – 640 с.
6. Garrett R.H., Grisham C.M. Biochemistry (2ed.). - Sanders College Pub., New York, 1999. – 851 pp.
7. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition. - W.H. Freeman & Company, 2004. - 1100 pp.

СОДЕРЖАНИЕ

ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ	3
Занятие 1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ	4
I. ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ.....	4
II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ БЕЛКА	6
III. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ	8
Занятие 2. РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ	9
Занятие 3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА	12
Занятие 4. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	14
I. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА КОМПОНЕНТЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	14
II. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (По А. С. Спирину).....	15
III. ОСАЖДЕНИЕ ДНК ИЗ РАСТВОРА.....	16
Занятие 5. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА МОНОСАХАРИДЫ И ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ	17
I. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА МОНОСАХАРИДЫ.....	17
II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫМ МЕТОДОМ	20
Занятие 6. ОЛИГОСАХАРИДЫ. ПОЛИСАХАРИДЫ	21
I. ОЛИГОСАХАРИДЫ	21
II. ПОЛИСАХАРИДЫ	22
Занятие 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КРАХМАЛА В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ.....	23
Занятие 8. ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ	24
Занятие 9. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ	27
Занятие 10. ОБЩИЕ СВОЙСТВА ЛИПИДОВ	30
Занятие 11. ВИТАМИНЫ	34
I. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ	35
II. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ	38
Занятие 12. ГОРМОНЫ	40

I. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ТИРОКСИН	40
II. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АДРЕНАЛИН	41
III. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДРЕНАЛИНА (по Фолину).....	42
Занятие 13. МЕТАБОЛИЗМ. ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ОБМЕН	42
I. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ	42
II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ.....	43
ЛИТЕРАТУРА	44