

Министерство образования и науки Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Кафедра органической и биологической химии

Биохимия и молекулярная биология

Учебно-методическое пособие

Ярославль
ЯрГУ
2017

УДК 577(072)
ББК Е072я73
Б63

Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2017 года

Рецензент
кафедра органической и биологической химии ЯрГУ

Составители:
Г. А. Урванцева, Е. Л. Грачева

Биохимия и молекулярная биология : учебно-методическое пособие / сост. : Г. А. Урванцева, Е. Л. Грачева ; Яросл. гос. ун-т им. П. Г. Демидова. — Ярославль : ЯрГУ, 2017. — 44 с.

Пособие призвано помочь студентам в организации лабораторных занятий и внеаудиторной работы по дисциплине. Содержит методические указания к лабораторным работам, задания, вопросы к коллоквиумам.

Предназначено для студентов, изучающих дисциплину «Биохимия и молекулярная биология».

УДК 577(072)
ББК Е072я73

© ЯрГУ, 2017

Методические указания к лабораторным работам

Раздел I. Белки

Лабораторная работа 1 Распределительная хроматография аминокислот на бумаге

В настоящее время метод хроматографии является одним из наиболее простых, быстрых и точных методов анализа сложных смесей веществ. Он основан на различиях в скорости переноса растворенных веществ в системе двух фаз, одна из которых подвижна.

При хроматографии на бумаге неподвижной жидкой фазой является сорбированная на поверхности бумаги вода, а подвижной — смесь различных органических растворителей, насыщенных водой. Разделение веществ методом хроматографии на бумаге происходит в том случае, если эти вещества существенно различаются по своей растворимости в обеих жидких фазах. Метод распределительной хроматографии аминокислот на бумаге заключается в том, что каплю смеси аминокислот наносят на стартовую линию хроматографической бумаги, конец которой опускают в смесь органических растворителей. Чем меньше растворимость аминокислот в воде и чем больше их растворимость в органическом растворителе, тем быстрее они движутся за фронтом органического растворителя. Положение аминокислот на бумаге можно обнаружить при помощи цветной реакции с нингидрином.

Подвижность веществ при хроматографии на бумаге характеризуют с помощью коэффициента скорости движения (**Rf**), представляющего собой отношение расстояния (мм), пройденного веществом от линии старта, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя.

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное веществом}}{\text{расстояние, пройденное растворителем}}$$

Расстояние, пройденное аминокислотой, измеряют от места ее нанесения до середины пятна. **Rf** является характерной величиной для каждой аминокислоты и постоянен при данных условиях.

Оборудование, реактивы: сушильный шкаф; электрическая плитка; капиллярные пипетки; кювета эмалированная; бутанол, уксусная кислота, вода в соотношении 40:10:50; 0,5 %-й раствор нингидрина в ацетоне; смесь аминокислот.

Ход работы

Для проведения анализа берут полоску хроматографической бумаги шириной 1,5 и длиной 12–14 см. Смесь аминокислот (фенилаланина и глицина) наносят в виде точки на стартовую линию, проведенную простым карандашом на расстоянии 1 см от короткого края бумаги. Растворы аминокислот наносят специальными капиллярными пипетками, не допуская расплывания нанесенного раствора до пятна диаметром более 0,2 см.

В пробирку, служащую хроматографической камерой, наливают 1 мл верхнего слоя растворителя и закрывают пробирку пробкой. Полоску хроматографической бумаги с нанесенными аминокислотами осторожно помещают в пробирку с растворителем, следя за тем, чтобы растворитель был ниже линии старта. Укрепляют хроматограмму в пробирке, которую ставят в штатив под тягой. Процесс хроматографирования длится 1–1,2 часа. По окончании указанного срока отмечают карандашом на хроматограмме фронт растворителя и высушивают хроматограмму над плиткой. Затем хроматограмму проявляют 0,5 %-м раствором нингидрина в ацетоне. После испарения ацетона при комнатной температуре хроматограммы прогревают на плитке до появления пятен аминокислот. Хроматограмму досушивают на воздухе при комнатной температуре, отмечают расположение аминокислот, вычисляют их **Rf**-индексы.

Сделайте рисунок полученной хроматограммы или приклейте в тетрадь и сформулируйте выводы по результатам опыта.

Лабораторная работа 2

Качественные реакции на белки

Методы качественного обнаружения белков основаны на двух типах реакций: а) универсальных; б) специфических (по аминокислотным радикалам).

Оборудование, реактивы: баня водяная, пробирки химические, стаканы химические на 100 мл; пипетки, градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл; лакмусовая бумага, хлорид натрия (10 %-й), сульфат аммония (насыщенный), гидроксид натрия (10 и 30 %-й), сульфат меди (1 %-й), нингидрин (1 %-й в ацетоне 95 %-ом), α-нафтол (0,2 %-й спиртовой раствор), гипобромид натрия, ледяная уксусная кислота, серная, соляная и азотная кислоты (конц.), нитрит натрия (0,5 %-й), сульфаниловая кислота (5 %-я), карбонат натрия (10 %-й), раствор плюмбита натрия.

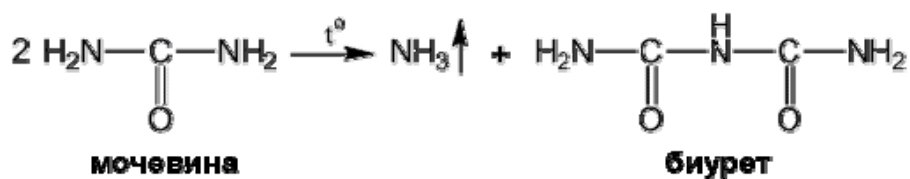
Материалы

Неразбавленный белок куриного яйца представляет собой примерно 10 %-й раствор белка. *Разбавленный в 10 раз раствор яичного альбумина.*

Ход работы

1. *Обнаружение в молекулах белков пептидных связей (биуретовая реакция).* К 1–2 мл разбавленного раствора белка прибавляют двойной объем 30 %-го раствора гидроксида натрия, хорошо перемешивают и добавляют 2–3 капли 1 %-го раствора сульфата меди. Снова тщательно перемешивают. Развивается сине-фиолетовое окрашивание. При малом содержании белка чувствительность реакции можно повысить, наслаивая на раствор белка в щелочи 1 мл 1 %-го раствора сульфата меди. При стоянии на границе двух слоев появляется фиолетовое кольцо.

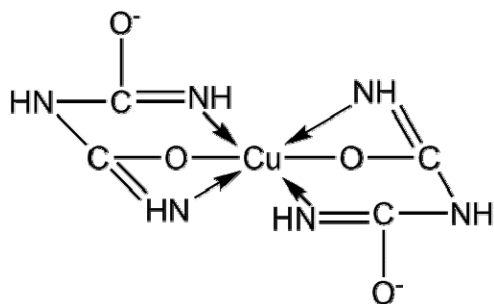
Реакция названа биуретовой потому, что аналогичную цветную реакцию дает биурет, легко получаемый из мочевины при ее нагревании при температуре 150–160 °С.



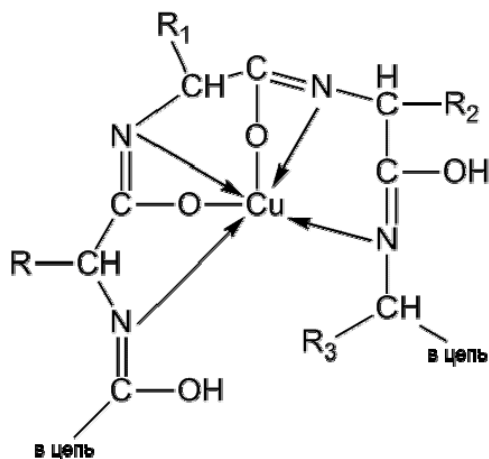
Биурет в щелочной среде претерпевает енолизацию по схеме:



Две молекулы биурета в енольной форме взаимодействуют с гидроксидом меди (II) с образованием комплексного соединения меди:



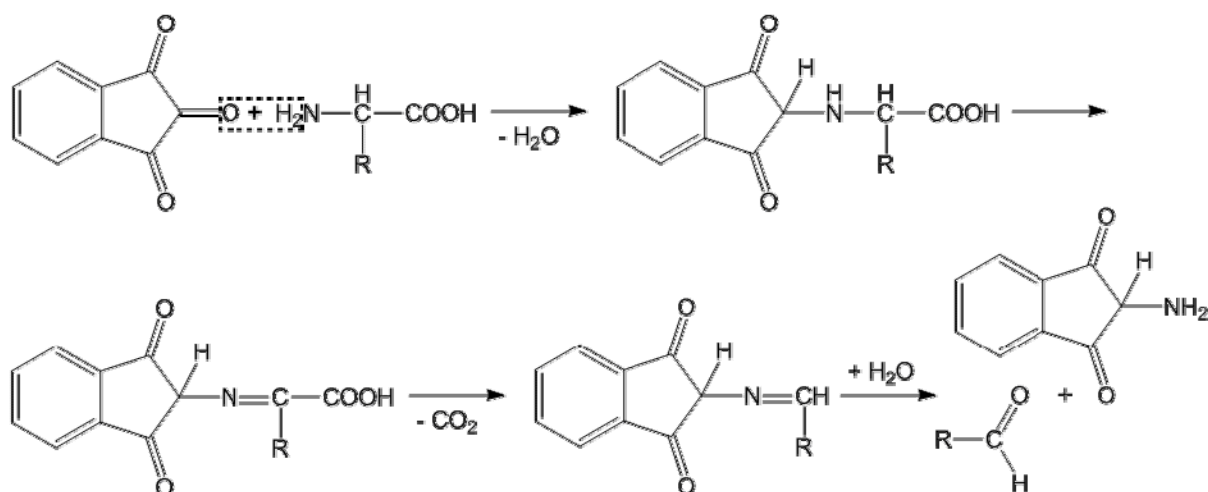
Аналогично построено комплексное соединение меди с енолизированными пептидными группами любого белка:



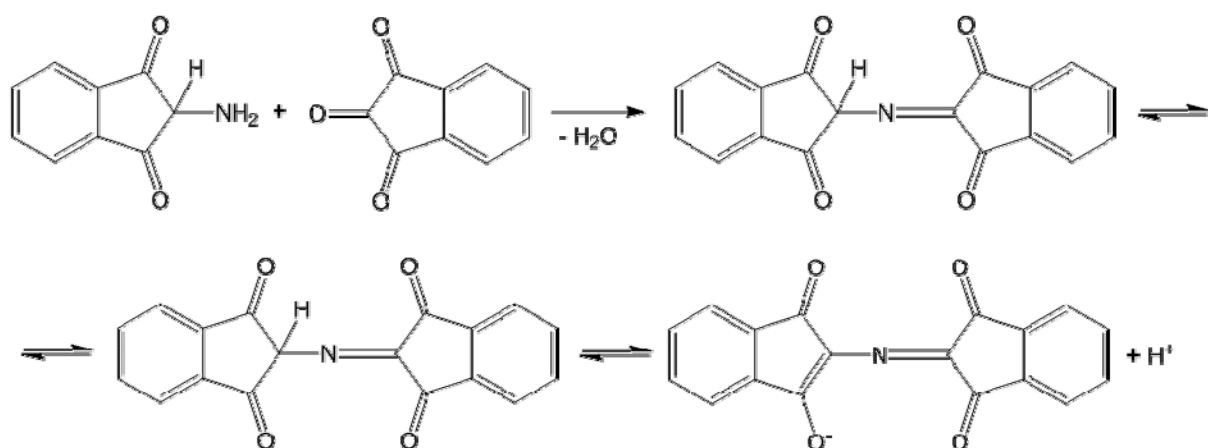
2. Нингидриновая реакция

К 2–3 мл разбавленного белка приливают 3–4 капли 1 %-го раствора нингидрина в 95 %-ом ацетоне. Раствор перемешивают и ставят в водяную баню при 70 °С на несколько минут. Появляется сине-фиолетовое окрашивание.

Сначала в результате взаимодействия α-аминогруппы аминокислоты (или белка) с нингидрином возникает Шиффово основание. Затем оно претерпевает перегруппировку: декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминодикетогидринден:

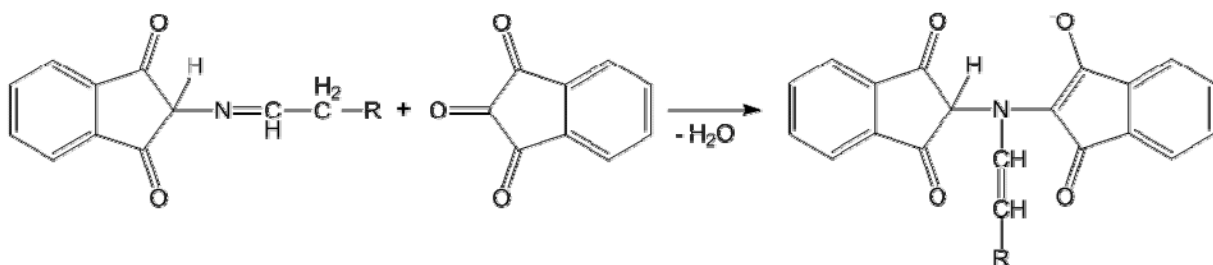


Аминодикетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина, и образовавшееся соединение, енолизируясь, переходит в окрашенную форму, получившую название «сине-фиолетовый Рузмана» — по имени исследователя, впервые в 1910 г. изучившего эту реакцию.



сине-фиолетовый Рузмана

В присутствии органических растворителей (аcetона, этанола, пиридина и др.), на которых обычно готовят раствор нингидрина, протекает реакция:



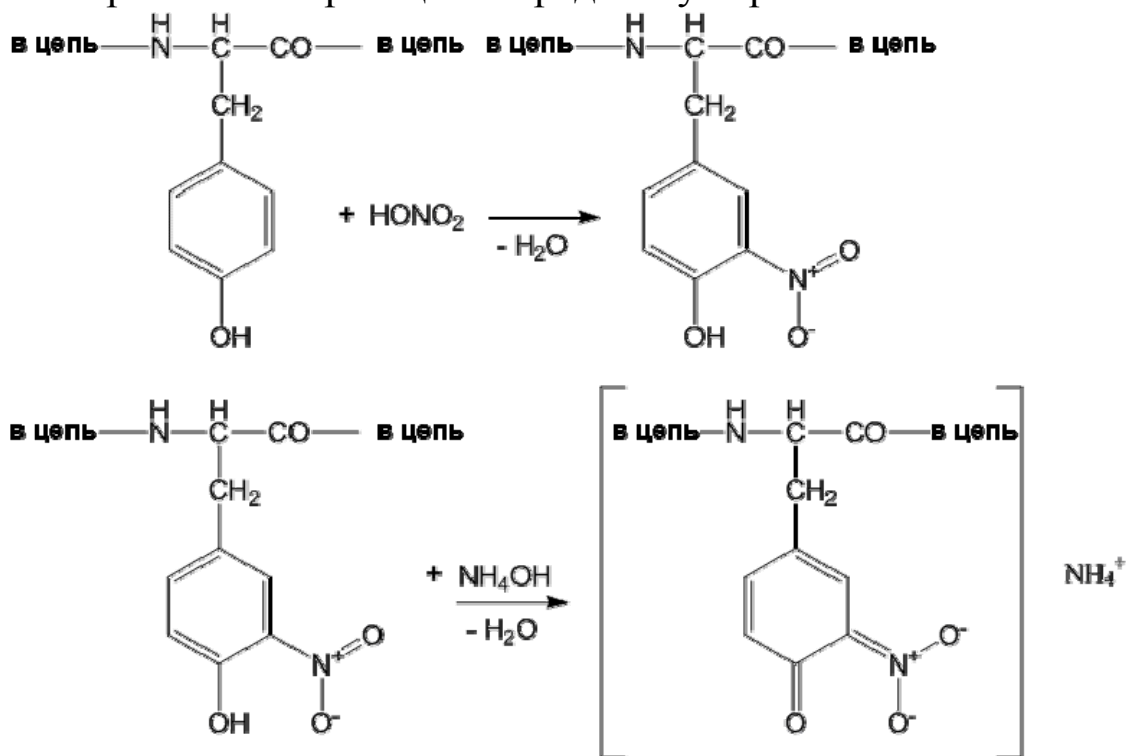
Продукт этой реакции содержит в своем составе радикал (R) исходной аминокислоты, который обуславливает различную окраску соединений, возникших при реакции аминокислот с нингидрином.

В настоящее время нингидриновая реакция широко используется как для открытия отдельных аминокислот, так и для определения их количеств.

3. Ксантопротеиновая реакция. К 1 мл разбавленного белка добавляют 5–6 капель концентрированной азотной кислоты до появления белого осадка или мути от свернувшегося белка. При нагревании раствор и осадок окрашиваются в ярко-желтый цвет. При этом осадок почти полностью растворяется.

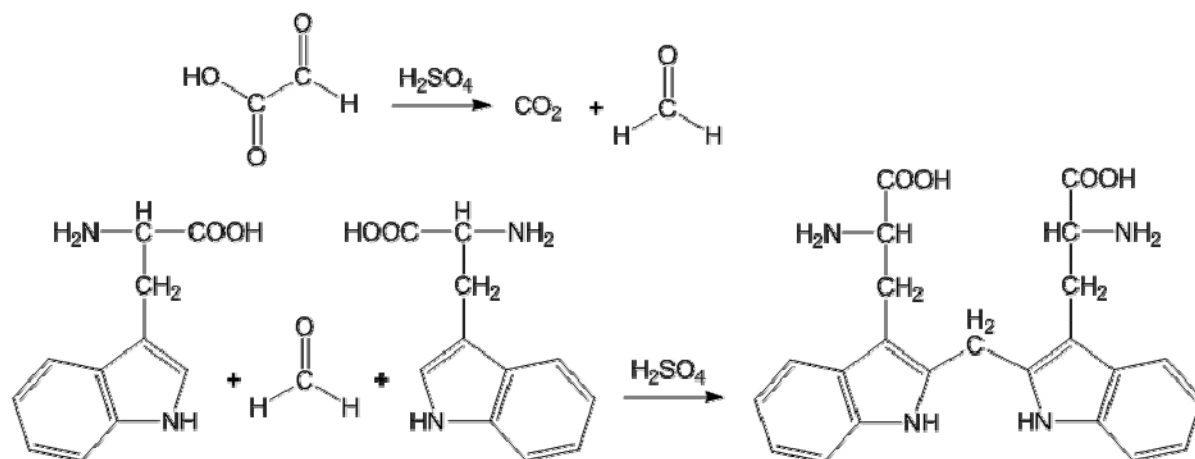
Охлаждают смесь и осторожно добавляют к раствору, имеющему кислую реакцию, не взбалтывая, по каплям избыток щелочи до щелочной реакции. Выпадающий вначале осадок кислотного альбумината растворяется, и жидкость окрашивается в ярко-оранжевый цвет.

Ксантопротеиновая реакция происходит только при наличии в белках остатков ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана). Желатин, не содержащий ароматических аминокислот, не дает ксантопротеиновой пробы. В результате реакции нитрования по радикалам ароматических аминокислот образуются желтоокрашенные нитросоединения. Изменение желтой окраски на оранжевую в щелочной среде обусловлено появлением хромофорной групп. Рассмотрим в качестве примера механизм ксантопротеиновой реакции по радикалу тирозина:

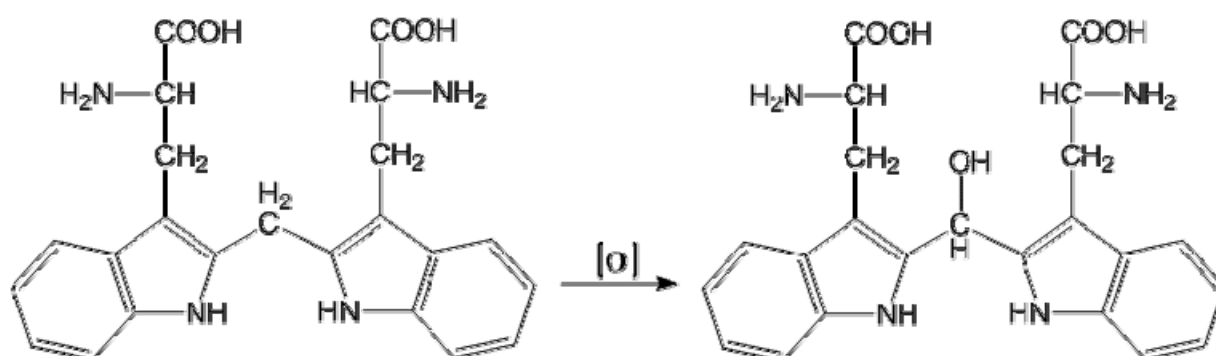


4. *Реакция Адамкевича.* Наливают в пробирку несколько капель неразбавленного белка и прибавляют 2 мл уксусной кислоты, к которой добавляют немного глиоксиловой кислоты. Смесь слегка нагревают до растворения образующегося осадка. Охлаждают пробирку со смесью, а затем, сильно наклонив ее, осторожно, по стенке приливают 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы обе жидкости не смешивались. При стоянии на границе двух жидкостей получается красно-фиолетовое кольцо. Окраска возникает за счет реакции триптофана с глиоксиловой кислотой, всегда присутствующей в уксусной кислоте в виде примеси.

Триптофан в этой реакции конденсируется с формальдегидом, выделяющимся из глиоксиловой кислоты под воздействием концентрированной серной кислоты:



Продукт конденсации окисляется до бис-2-триптофанил-карбинола:

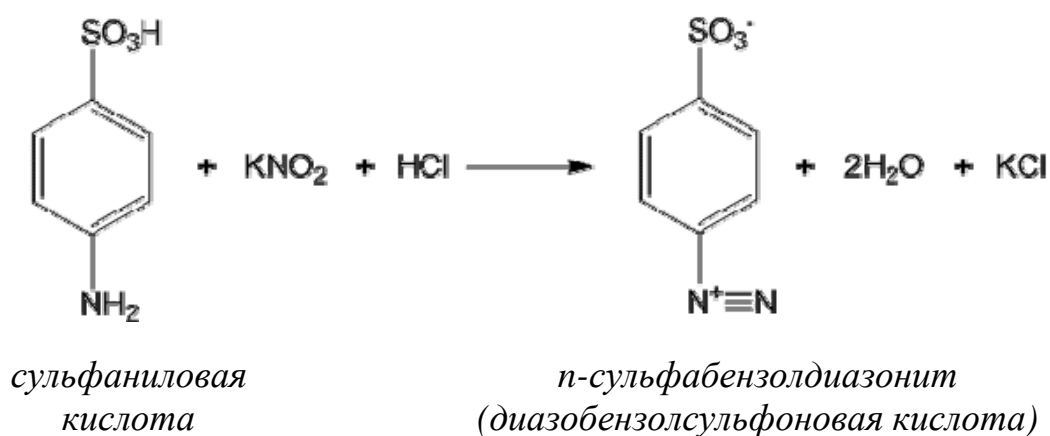


Последний в присутствии минеральных кислот образует окрашенные в сине-фиолетовый цвет соли.

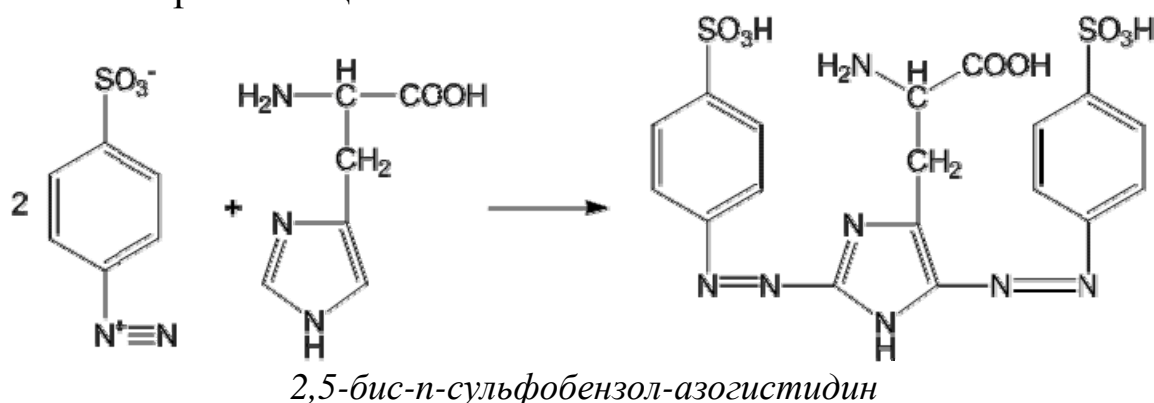
5. *Реакция Паули.* К 1 мл 1 %-го раствора сульфаниловой кислоты в 5 %-ом растворе соляной кислоты приливают 2 мл 0,5 %-го раствора нитрита натрия. Сильно встряхнув, быстро добавляют сначала 2 мл разбавленного раствора белка, а затем, после перемешивания содержимого, 6 мл 10 %-го раствора карбоната натрия. После смешивания растворов развивается вишнево-красное окрашивание.

Возникновение окраски обусловлено наличием в белковой молекуле остатков гистидина и тирозина.

При взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитритом натрия осуществляется реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоновая кислота:



При реакции последней с гистидином образуется соединение вишнево-красного цвета:

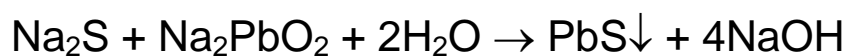


6. *Реакция на «слабосвязанную серу».* В пробирку наливают 0,5–1,0 мл неразбавленного белка, добавляют двойной объем концентрированного раствора щелочи, кладут несколько «кипятильников» и кипятят смесь (**осторожно, жидкость может выбросить!**). При этом выделяется аммиак, который может быть обнаружен по запаху и посинению лакмусовой бумажки, подне-

сенной к отверстию пробирки (*не касаться стенки!*). Образующийся незначительный осадок растворяется при кипячении.

К горячей щелочной жидкости приливают раствор плюмбита натрия, образуется черный осадок.

Под действием щелочи наблюдается отщепление части аминокрупп (реакция дезаминирования) в виде аммиака. В щелочной среде происходит также постепенное отщепление ионов серы со степенью окисления +2 от радикалов аминокислот, содержащих серу. Образование ионов серы можно обнаружить с помощью ионов свинца, образующих с ионами серы черный нерастворимый осадок сульфида свинца:



*Плюмбит
натрия*

*Сульфид
свинца*

Лабораторная работа 3

Количественное определение общего белка в сыворотке крови биуретовым методом на биохимическом полуавтоматическом анализаторе (фотометре) STAT FAX 1904 Plus (США)

1. Инструкция к прибору

Применение

Прибор является компактной бихроматической фотометрической системой с шестью светофильтрами и встроенным инкубатором на 37 °С, управляемой с помощью микропроцессора. Для прибора используются стандартные кюветы с длиной оптического пути 12 мм.

Основным назначением биохимического полуавтомата является измерение и расчет результата как по конечной точке, так и в режиме кинетики. Прибор имеет энергонезависимую память, что позволяет записывать и хранить параметры опытов и стандартные кривые, которые в дальнейшем могут быть быстро вызваны из памяти. Прибор содержит инкубационный блок с температурой 37 °С на 12 мест. Такая же термостабилизация

предусмотрена в держателе кюветы, в котором осуществляется считывание поглощения.

Stat Fax 1904+ позволяет быстро, тщательно, точно получать воспроизводимые результаты. При этом он прост в эксплуатации, многофункционален, не требует особого ухода, экономичен. Устойчивая заводская калибровка, долговечная конструкция и таймер, сохраняющий рабочий ресурс лампы, обеспечивает надежную работу прибора.

Меню тестов. Можно выполнять следующие тесты:

- | | |
|--------------------|----------------------------------|
| 1. Альбумин | 16. ЛДГ |
| 2. Общий белок | 17. КФК (креатинфосфокиназа) |
| 3. Билирубин | 18. Триглицериды |
| 4. Мочевина | 19. Щелочная фосфатаза |
| 5. Глюкоза окс. | 20. АСТ (аспартатаминотфераза) |
| 6. Глюкоза гексо. | 21. АЛТ (аланинаминотрансфераза) |
| 7. Мочевая кислота | 22. КФ (кислая фосфатаза) |
| 8. Креатинин | 23. Натрий |
| 9. Железо | 24. Калий |
| 10. Хлориды | 25. Гемоглобин |
| 11. Кальций | 26. Липаза |
| 12. Фосфор | 27. КФК-МВ |
| 13. Магний | 28. Т3 |
| 14. Холестерин | 29. Т4 |
| 15. ЛВП | 30. ТТГ (Тиреотропный гормон) |

На рис. 1 показаны основные функциональные блоки полуавтоматического биохимического анализатора STAT FAX 1904+.

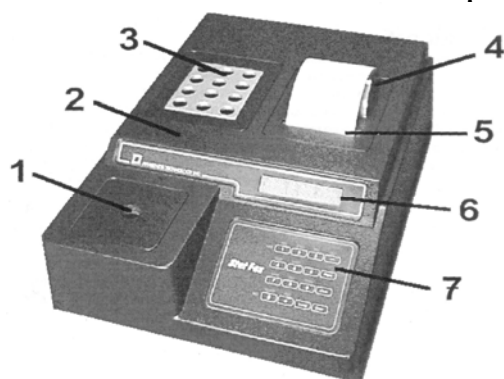


Рис. 1. Полуавтоматический биохимический анализатор
STAT FAX 1904+

1. Держатель кюветы с контролируемой температурой

2. Крышка
3. Инкубатор
4. Углубление для бумаги принтера (под крышкой)
5. Щель для бумаги принтера
6. Буквенно-цифровой дисплей
7. Клавиатура

2. Принцип метода. В результате взаимодействия белковых молекул с ионами меди в щелочной среде образуется окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при длине волны 540 нм.

Норма содержания общего белка в сыворотке крови человека составляет 65–85 г/л.

Оборудование и реактивы: биохимический анализатор STAT FAX 1904 Plus; сыворотка крови; рабочий реагент, калибратор.

Таблица 1

Процедура анализа

Внести в пробирку	Опытная проба, мкл	Калибровоч- ная проба, мкл	Контроль- ная проба, мкл
Рабочий реагент, мл	1 000	1 000	1 000
Исследуемый образец, мл	20	—	—
Калибратор, мл	—	20	—
Вода, мл	—	—	20

3. Автоматические лабораторные дозаторы (автоматические пипетки) и принцип работы с ними

Автоматический дозатор (автоматическая пипетка) — это высокотехнологичное устройство поршневого типа (работает по принципу вытеснения воздуха за счет перемещения поршня в измерительном цилиндре). Сегодня механические и электронные автоматические пипеточные дозаторы все более активно вытесняют из практики современных лабораторий стеклянные средства дозирования. Автоматические дозаторы предназначены для точного дозирования жидкостей, проб и ре-

агентов при проведении исследований в лабораториях любого уровня. Поскольку дозирование — одна из часто повторяемых процедур, автоматические пипетки повышают точность, воспроизводимость работы и комфорт при выполнении большого количества рутинных исследований.

Автоматические пипеточные дозаторы бывают механические и электронные, одноканальные и многоканальные, с фиксированным объемом и переменными объемами дозирования.

Эргономичный корпус дозатора выполнен из высококачественного пластика, устойчивого к химически активным средам, что позволяет пользователю работать с разнообразными жидкостями, как с растворами, так и с концентрированными жидкостями. Дозирующие устройства удобны в использовании и обслуживании. При работе с дозаторными пипетками ввиду их высокой стоимости необходимо быть внимательными и осторожными, хранить и использовать их только в вертикальном положении, приступая к анализу, предварительно довести навык пользования автоматической пипеткой до автоматизма.

Практически все дозаторы можно использовать одним из двух методов:

1. Метод прямого дозирования — сначала жидкость заполняет точно заданный объем, а затем она максимально полно извлекается из этого объема в пробирку.

2. Метод обратного дозирования — жидкость заполняет больший объем, а затем из устройства извлекается строго заданное количество жидкости. Метод обеспечивает наилучшие результаты при работе с вязкими и пенящимися жидкостями, а также при дозировании микрообъемов.

Для данной работы целесообразно освоить принцип работы с одноканальными механическими дозаторами фиксированного и переменного объема в режиме прямого дозирования.

1. Осмотрите пипетку и определите ее тип и объем. У дозаторной пипетки переменного объема верхняя часть операционной кнопки вращается, установленный объем отображается на дисплее. Точная регулировка объема позволяет установить объем дозирования с наименьшим шагом.

2. Возьмите пипетку вертикально, используя поддерживающий упор для указательного пальца. Наденьте наконечник (он в штативе), опустив в него кончик пипетки.

3. Нащупайте 2 упора (2 ступени фиксации) кнопки для большого пальца. В прямом режиме дозирования необходимо сначала нажать кнопку до первого упора, затем опустить наконечник в жидкость вертикально, не касаясь стенок емкости, и плавно отпустить палец вверх (следим, чтобы жидкость набиралась в наконечник без пузырьков воздуха и кончик наконечника заполнился полностью). Выливая жидкость из пипетки, нажимайте кнопку уже до конца (до второго упора), возможно дополнительно нажать кнопку для полного извлечения жидкости из наконечника.

4. Сбросьте одноразовый использованный наконечник в приготовленную для этого емкость. Для этого есть кнопка — сбрасыватель наконечника.

Для того чтобы жидкость не попала внутрь автоматической пипетки, необходимо отжимать поршень вверх плавно и не класть на стол пипетку с наконечником, в котором есть жидкость.

Ход работы

Прибор прогреть до $+37^{\circ}\text{C}$ (примерно 10 минут). Подготовить пробы (см. табл.), используя соответствующие дозаторные пипетки — на 20 мкл и 500–5000 мкл. Пробы перемешать. Инкубировать при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут. Последовательность дальнейших действий:

1. Выбор теста: нажать «меню», пункт 2, ВВОД.
 2. Сохранить готовую калибровочную кривую? — Нет, ввод.
 3. Измерение бланка (контрольная проба).
 4. Измерение стандарта (калибровочная проба).
 5. Измерение оптической плотности опытной пробы. Длина волны — 540 нм.
 6. Определение оптической плотности следующей пробы, либо выход в меню — дважды нажать сброс.
- Окраска растворов стабильна в течение 60 минут.

Параметры программирования

Наименование набора реагентов	Белок общий
Тип анализатора	полуавтомат
Метод измерения	КТ
Длина волны, мл	540
Измерение против	реагент бланка
Температура реакции, °С	37
Концентрация стандарта	50
Соотношение «реагент/проба»	1000:20
Количество измерений, не менее	1
Время реакции, с	1200
Единицы измерения	г/л
Верхний предел реагент бланка, А	2,00
Нижний предел реагент бланка, А	0,00
Максимум нормы, г/л	85
Минимум нормы, г/л	65

Клинико-диагностическое значение. Изменения содержания общего белка в сыворотке крови происходят по причине:

- 1) снижения интенсивности биосинтеза белка в тканях;
- 2) усиленного распада тканевых белков;
- 3) нарушения водного баланса.

Гипопротеинемия наблюдается при нефротическом синдроме, заболеваниях кожи (ожог, экзема), массивных кровотечениях, задержке солей и воды (заболевания почек), неправильном питании и голодании. Нарушением синтеза белка, приводящим к снижению его концентрации в сыворотке крови, сопровождаются, например, длительные воспалительные процессы. Гиперпротеинемия наблюдается при состояниях и болезнях, сопровождающихся дегидратацией организма (тяжелые травмы, понос, рвота, сахарный диабет). Она характерна также для хронических воспалительных заболеваний (ревматоидный артрит, диффузные болезни соединительной ткани — коллагенозы, цирроз печени) и воспалительных процессов в стадии острой фазы.

Раздел II. Нуклеиновые кислоты

Лабораторная работа 4

Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей с помощью центрифугирования на настольной программируемой центрифуге Sigma 2-6

Нуклеопротеины — сложные белки, связанные с нуклеиновыми кислотами: ДНК или РНК. В дезоксирибонуклеопротеинах (ДРНП) и рибонуклеопротеинах (РНП) нуклеиновые кислоты и белки связаны друг с другом в основном ионными связями, которые могут легко диссоциировать, что и происходит достаточно часто в процессе выделения ДРНП и РНП, особенно в момент воздействия концентрированных растворов солей.

Выделение нуклеопротеинов из биологического материала можно осуществить различными методами: 1) извлечением дистиллированной водой с последующим осаждением нуклеопротеина уксусной кислотой; 2) экстракцией слабым раствором (0,2–0,4 %) щелочи с последующим действием уксусной кислоты; 3) экстракцией растворами хлорида натрия средних концентраций, из которых нуклеопротеины выпадают при разбавлении раствора; 4) последовательным извлечением различных нуклеопротеинов сначала 0,15 М раствором хлорида натрия, затем 1 М его раствором и, наконец, 0,27 %-м раствором гидроксида натрия; 5) ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы или хлорида цезия; 6) фильтрованием через гель сефадекса. В нашей работе будет использован метод 2.

Оборудование, реактивы: настольная программируемая центрифуга Sigma 2-6 для микрообъектов, колба плоскодонная на 100 мл с обратным воздушным холодильником, ступка (диаметр 110 мм), стакан стеклянный на 200 мл, цилиндр мерный на 50 мл, воронка стеклянная, пробирки химические, песок промытый и прокаленный, гидроксид натрия (0,4 %-й), уксусная кислота (10 %-я).

Материал: дрожжи пекарские (высушенные).

Ход работы

10 г дрожжей смешивают в ступке со смесью (1 мл эфира и 1 мл воды), добавляют 5 г песка и тщательно растирают, приливая к растертой массе небольшими порциями (20 мл) 0,4 %-й раствор гидроксида натрия. Растирание продолжают в течение 15–20 мин. После этого осадок отделяют путем центрифугирования (3 мин при 3 000 об/мин). Центрифугат сливают в стакан и к нему добавляют небольшими порциями (по 0,5 мл) 10 %-ю уксусную кислоту до слабокислой реакции по лакмусу (5–6 мл). Полученный осадок нуклеопротеинов отделяют центрифугированием (5 мин при 3 900 об/мин). Осадок переносят в колбу с воздушным холодильником, добавляя в центрифужную пробирку постепенно 10 мл 10 %-го раствора серной кислоты, и переносят ее вместе с осадком в колбу. Колбу с воздушным холодильником оставляем для гидролиза и последующего анализа нуклеопротеинов на следующем занятии.

Правила техники безопасности

Работы, связанные с эксплуатацией центрифуг, относятся к работам с повышенной опасностью. Работающий на центрифуге должен придерживаться последовательности операций при работе на оборудовании согласно инструкции используемого оборудования.

При работе с центрифугой запрещается:

1. Работать без заземления.
2. Работать с открытой крышкой ротора и центрифуги.
3. Работать со стеклянными пробирками при частоте вращения свыше 4000 об/мин.
4. При неполной загрузке ротора необходимо размещать только предварительно уравновешенные на технических весах пробирки в гнездах, расположенных напротив друг друга.

Технические характеристики настольной центрифуги Sigma 2-6 (см. рис. 2):

- предварительная установка скорости до 4000 об/мин.;
- возможность работы на низкой скорости от 100 об/мин.;

- надежная блокировка крышки с двух сторон для большей безопасности;
- низкий уровень шума;
- быстрое ускорение и торможение ротора;
- переключаемый звуковой сигнал;
- автоматическое открытие крышки, переключаемое;
- стальной корпус для максимальной безопасности и устойчивости;
- таймер «10 сек — 11 часов 59 минут»;
- «быстрый запуск» и «быстрое торможение»;
- «плавный запуск» и «плавное торможение»;
- отключение при дисбалансе;
- системы управления и контроль работы центрифуги выведены на специальную панель управления и дисплей;
- напряжение сети — 230 В, 50 Гц ;



Рис. 2. Общий вид лабораторной центрифуги Sigma 2-6

Лабораторная работа 5

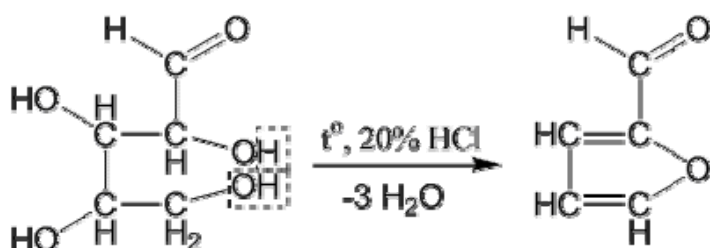
Гидролиз рибонуклеопротеинов и качественное определение продуктов их гидролиза (белка, рибозы, пуриновых оснований и фосфорной кислоты)

Гидролиз нуклеопротеинов. Содержимое колбы с воздушным холодильником кипятят на плитке с сеткой в течение 1 часа, поддерживая слабое кипение. Гидролизат отфильтровывают и в прозрачном растворе определяют наличие белков, пентозы, пуриновых оснований и фосфорной кислоты.

Белки обнаруживают по биуретовой реакции.

Пентозу — по реакции с орцином. К 1 мл орцинового реактива добавляют половинный объем гидролизата, 1 мл соляной кислоты и нагревают до кипения. Появляется зеленое окрашивание.

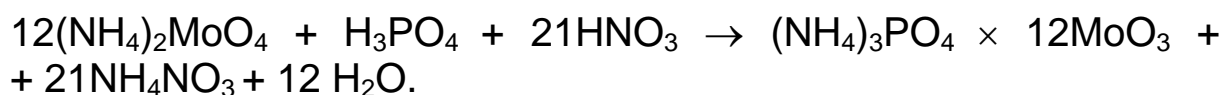
При нагревании с 20 %-й соляной кислотой рибоза дегидратируется и превращается в фурфурол:



Последний конденсируется с орцином с образованием окрашенных соединений. Дезоксирибоза не дает этой реакции.

Пуриновые основания обнаруживают по их реакции с аммиачным раствором оксида серебра. К 2 мл гидролизата приливают по каплям крепкий раствор аммиака до щелочной реакции по лакмусу и добавляют равный объем аммиачного раствора оксида серебра. Постепенно образуется осадок серебряных солей пуриновых оснований.

Фосфорную кислоту обнаруживают с помощью молибдата аммония. К 2 мл раствора молибдата аммония в азотной кислоте прибавляют 1 мл испытуемого раствора. Смесь слегка нагревают. Образуется желто-зеленый осадок молибдата аммония:



Раздел III. Ферменты

Лабораторная работа 6

Качественные реакции на присутствие ферментов

Оборудование и реактивы: ступка с пестиком, пробирки химические, баня водяная, пипетки на 1, 2 и 5 мл, воронка Бюхнера, терка, пероксид водорода (0,5 %-й и 2 %-й), пирогаллол (1 %-й), тирозин (насыщенный), марля, пластинка стеклянная, колба коническая на 100 мл, цилиндр мерный на 50 мл, 1 %-й раствор мочевины и тиомочевины, 0,02 %-й раствор спиртовой фенолфталеина, клейстер крахмальный (1 %-й), йод (1 %-й) в йодиде калия (3 %-м), фелингова жидкость.

Материалы: картофель сырой, арбузные семечки, разбавленная слюна (рот ополаскивают 2–3 раза водой для удаления остатков пищи, отмеряют цилиндром 50 мл дистиллированной воды и ополаскивают ею рот в течение 3–5 мин в несколько приемов. Собранную жидкость — примерно 50–60 мл — фильтруют через вату и фильтрат используют для работы).

Ход работы

1. Открытие уреазы в арбузных семечках. Два арбузных семечка очищают от кожуры и растирают в ступке с 5 мл воды. В опыте затем используют полученную суспензию уреазы.

В две пробирки наливают по 2 мл суспензии уреазы. Затем в одну пробирку приливают 2 мл раствора мочевины, а в другую — 2 мл раствора тиомочевины. В обе пробирки добавляют по 3–4 капли раствора фенолфталеина. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре на 10–15 мин. Наблюдайте, что происходит в пробирках. Запишите уравнение реакции, сделайте вывод.

2. Открытие амилазы в слюне. В две пробирки наливают по 5 мл картофельного клейстера и в одну из них — 5 мл воды, а в другую — 5 мл раствора слюны. Обе пробирки со стеклянными палочками, погруженными в них, одновременно помещают в водяную баню при 40 °С. Через 1 мин от каждой смеси отбирают с помощью стеклянной палочки по капле жидкости и смешивают их по отдельности с каплей йода, заранее нанесенной

К содержимому пробирки со слюной добавляют 1–2 мл ферлинговой жидкости и смесь нагревают до начала кипения. Образуется красный осадок оксида меди (I) за счет восстановления гидроксида меди (II) образовавшимися мальтозой и низкомолекулярными декстринами. Контрольная проба в тех же условиях не восстанавливает гидроксид меди (II) в оксид меди (I).

Сделайте вывод о классе, подклассе обнаруженных ферментов, субстратах и продуктах реакций.

Лабораторная работа 7

Свойства ферментов

Оборудование, реактивы: баня водяная, пробирки химические, пипетки на 1, 2 и 5 мл; палочки стеклянные, пластинки стеклянные, бюретки прямые с краном на 50 мл, крахмал (1 %-й, 0,5 %-й, 1 %-й в хлориде натрия 0,3 %-м), соляная кислота (10 %-я), йод (0,3 %-й в йодиде калия 3 %-м), гидроксид натрия (10 %-й), сульфат меди (1 %-й и 3 %-й), тростниковый сахар (2 %-й), препарат дрожжевой сахарозы (1 %-й), фелингова жидкость, дигидрофосфат калия (1/15 M), гидрофосфат натрия (1/15 M).

Материалы: слюна разбавленная (см. работу 6), слюна неразбавленная профильтрованная.

Ход работы

1. Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов. В три пробирки наливают по 5 мл 1 %-го раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую — 1 мл 10 %-й соляной кислоты, а в третью — 1 мл неразбавленной слюны. Пробирки 1 и 3 после перемешивания помещают в водяную баню при 38 °С, а пробирку 2 — в кипящую водяную баню. Через 15–20 мин все пробирки вынимают из водяной бани и из каждой берут пробы для определения в них крахмала и глюкозы: первой — по реакции с йодом, второй — по реакции Троммера. Стеклянной палочкой наносят по капле раствора из каждой пробирки на стеклянную пластинку рядом с ранее нанесенной каплей раствора йода в йодиде калия, после чего капли соединяют и перемешивают. По интенсивности окраски пробы делают заключение о степени гидролиза крахмала. Для определения глюкозы из каждой пробирки берут по 3 мл раствора, добавляют 1 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия и несколько капель 1 %-го раствора сульфата меди. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появление желтого осадка оксида меди (I) или красного металлической меди указывает на наличие глюкозы. Результаты опыта заносят в табл. 3.

Таблица 3

Результаты эксперимента

№ пробирки	Субстрат	Катализатор	После инкубации	
			проба с йодом	проба Троммера
1	Крахмал	—		
2	Крахмал	Соляная кислота		
3	Крахмал	Амилаза слюны		

2. Специфичность действия амилазы (α -1,4-глюкан-4-глюконо-гидролаза; КФ 3.2.1.1.) и сахаразы (β -D-фруктофуранозид-фрукто-гидролаза; КФ 3.2.1.26). Нумеруют четыре пробирки. В пробирки 1 и 2 наливают по 2 мл раствора крахмала, в пробирки 3 и 4 — по 2 мл раствора сахарозы. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 0,5 мл разбавленного раствора слюны, в пробирки 2 и 4 — по 0,5 мл раствора препарата дрожжевой сахаразы. Перемешивают содержимое и ставят на 10 минут в водяную баню, нагретую до 38–40 °С. После охлаждения проводят реакции (см. работу 4) с йодом на присутствие крахмала в пробах 1 и 2 и глюкозы — в пробах 3 и 4. Делают заключение о специфичности изученных ферментов.

3. Влияние температуры на активность амилазы слюны. В четыре пронумерованные пробирки наливают по 2 мл 1 %-го р-ра крахмала. Пробирку 1 помещают в кипящую водяную баню, пробирку 2 — в водяную баню при 40 °С, пробирку 3 оставляют при комнатной температуре и пробирку 4 помещают в лед. Через 10 мин, когда содержимое пробирок примет заданную температуру, во все пробирки добавляют по 0,5 мл разбавленной слюны, перемешивают с помощью стеклянной палочки и оставляют в тех же условиях. Наблюдение за ходом гидролиза ведется по реакции с йодом (табл. 4). Для этого наносят на стеклянную пластинку несколько капель раствора йода и смешивают их с каплями гидролизуемой смеси, беря пробы через 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 мин. По изменению окраски крахмала с йодом судят о степени гидролиза крахмала в каждой пробирке. Результаты наблюдений заносят в таблицу, пометчая буквой с (синяя окраска) положительную пробу с йодом на крахмал, буквой к — положительную пробу

на декстрины (окраска красных тонов) и буквой **ж** — отрицательную пробу (желтая окраска йода).

Таблица 4

Реакция с йодом

№ пробирки	Температура в пробирке, °С	Реакция с йодом по истечении времени, мин						
		1	2	4	6	8	10	12
1	100							
2	40							
3	15–20							
4	0							

На основании полученных данных делают вывод о величине температурного оптимума для амилазы слюны.

4. Влияние pH на активность ферментов. Серии растворов с определенными значениями pH получают, используя фосфатный буфер. Две бюретки заполняют 1/15 М раствором гидрофосфата натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) и 1/15 М раствором дигидрофосфата калия (KH_2PO_4). Растворы смешивают в определенных соотношениях таким образом, что в каждой пробирке получают по 5 мл буферной смеси с величинами pH: 5,59; 6,98; 7,38; 8,04.

Для получения 5 мл фосфатной буферной смеси с pH 5,59 из бюреток к 0,25 мл Na_2HPO_4 добавляют 4,75 мл раствора KH_2PO_4 ; pH 6,98 — к 3,2 мл раствора Na_2HPO_4 добавляют 1 мл раствора KH_2PO_4 ; pH 7,38 — к 4 мл раствора Na_2HPO_4 добавляют 1 мл раствора KH_2PO_4 и pH 8,04 — к 4,75 мл Na_2HPO_4 добавляют 0,25 мл раствора KH_2PO_4 .

В каждую из четырех пробирок добавляют по 1 мл 0,5 %-го раствора крахмала, 1 мл разбавленной слюны и тщательно перемешивают содержимое с помощью стеклянной палочки. Далее все пробирки, не вынимая из них стеклянных палочек, помещают в водяную баню, нагретую до 40 °С. Спустя 3–5 мин из всех пробирок палочками наносят на стеклянную пластинку по капле смеси рядом с предварительно уже нанесенными на нее каплями раствора йода. Капли соединяются, и, если наблюдается различие окраски с йодом в испытуемых пробах, пробирки вынимают из бани,

охлаждают и добавляют в каждую по 3–4 капли раствора йода. При отсутствии заметного различия в окраске проб с йодом на стеклянной пластинке продолжают нагревание пробирок в водяной бане еще несколько минут, а затем вновь испытывают на пластинке пробы на степень расщепления крахмала. Эту операцию повторяют до тех пор, пока не произойдет заметных сдвигов в окраске проб с йодом.

Продолжают инкубацию всех проб в присутствии добавленного йода и для каждой из них отмечают время, когда исчезнет синее окрашивание (конец амилолитического расщепления). Полученные результаты отражают графически: по оси абсцисс наносят рН опытов, а по оси ординат – время расщепления крахмала при соответствующих значениях рН. Соединяя точки линией, получают кривую, характеризующую зависимость активности фермента от значения рН среды.

Раздел IV. Углеводы

Лабораторная работа 8

Качественные реакции на углеводы

Оборудование, реактивы: пипетки на 1, 2 и 5 мл; пробирки химические; баня водяная; 1-нафтол (10%-й спиртовой); серная кислота (конц.); гидроксид натрия (10%-й); сульфат меди (5%-й); реактив Фелинга; реактив Селиванова; орциновый реактив; раствор Люголя; этиловый спирт; хлорид натрия (крист.).

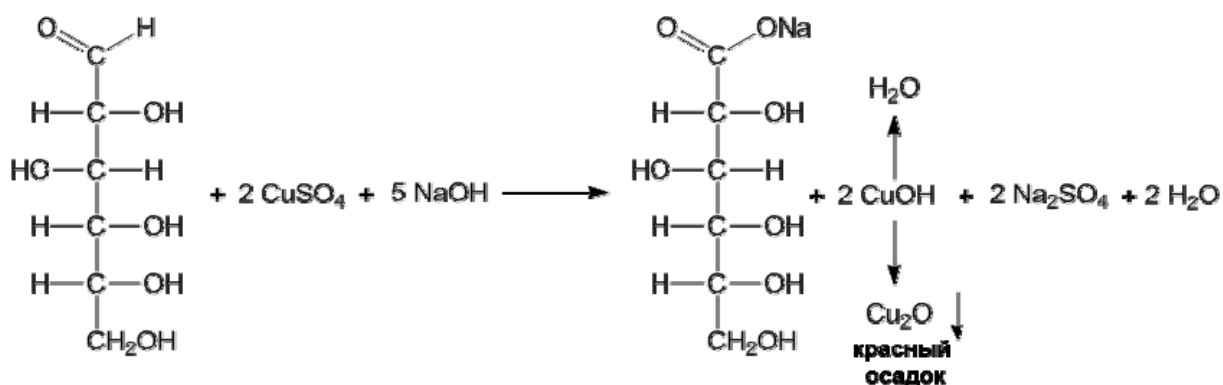
Материалы: глюкоза, мальтоза, сахароза, арабиноза, фруктоза, крахмал, гликоген (1 %-е растворы).

Ход работы

1. Реакция Подобедова — Молиша с 1-нафтолом (на углеводы). В пробирку берут 1 мл испытуемого раствора или крупинку твердого вещества, растворенного в 1 мл воды, добавляют 2 капли 10 %-го спиртового раствора 1-нафтола и по стенке пробирки приливают осторожно, без встряхивания, 2 мл конц. серной кислоты. Серная кислота опускается на дно пробирки, на границе

двух жидкостей образуется кольцо красно-фиолетового цвета. Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, образующиеся из углеводов под действием серной кислоты, конденсируясь с двумя молями сульфенированного 1-нафтола, дают триарилметановый хромоген, который окисляется серной кислотой в окрашенное хиноидное соединение.

2. Реакция Троммера. В пробирку наливают 1–2 мл раствора глюкозы и равный объем 10 %-го раствора гидроксида натрия. К смеси прибавляют при встряхивании по каплям 5 %-й раствор сульфата меди (II). Осторожно нагревают верхнюю часть содержимого пробирки. Появляется желтое окрашивание — гидроксид меди (I), переходящее в красное — оксид меди (I), что указывает на положительную реакцию Троммера:

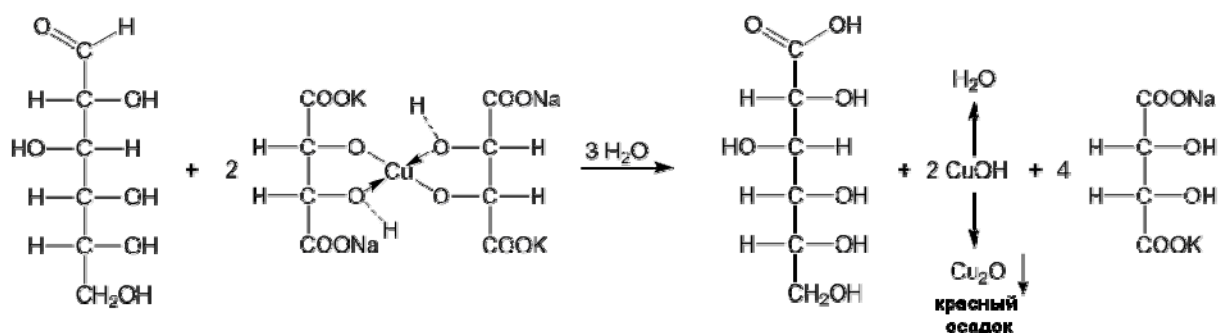


Реакцию Троммера проделывают также с растворами **мальтозы, сахарозы и крахмала**. Объясните полученные результаты.

Избыток медной соли маскирует реакцию, т. к. гидроксид меди (II) при нагревании теряет воду и дает черный осадок оксида меди (II).

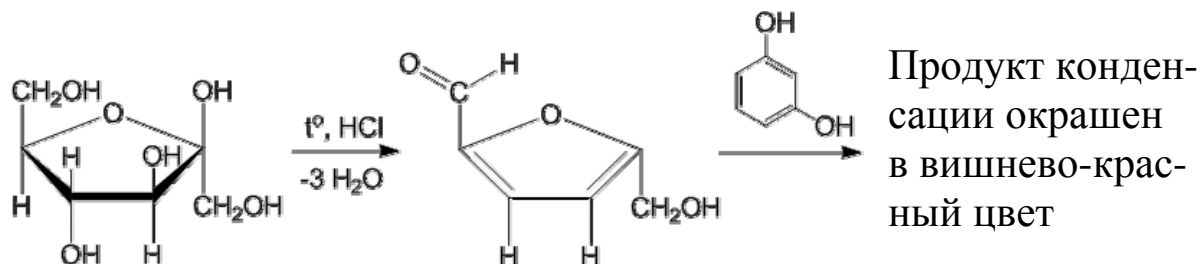
3. Реакция с фелинговой жидкостью. Нередко пользуются так называемой фелинговой жидкостью, в которой ион меди в степени окисления +2 находится в виде комплексного соединения с тартратами. Механизм реакции редуцирующих углеводов с фелинговой жидкостью такой же, как и реакции Троммера. Преимущество фелинговой жидкости: медь при избытке реактива не выпадает в виде оксида меди (II).

К 1–2 мл раствора глюкозы приливают равный объем фелинговой жидкости и смесь нагревают до начинающегося кипения. Образуется красный осадок оксида меди (I).



Проделывают реакцию фелинговой жидкости также с **растворами мальтозы, сахарозы и крахмала**. Объясните полученные результаты.

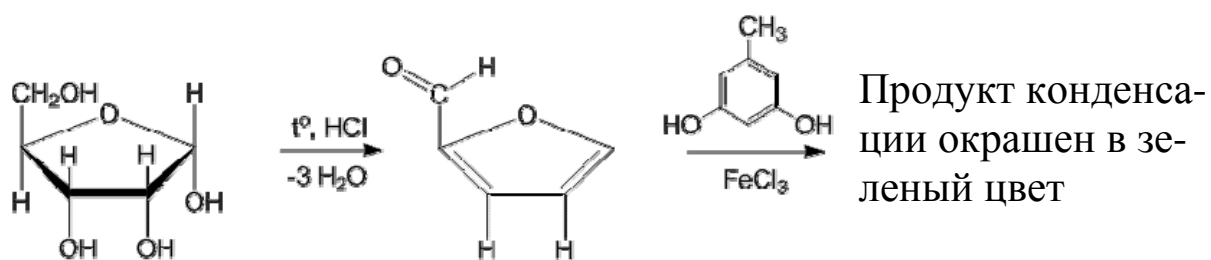
4. *Реакция Селиванова на кетозы.* При нагревании фруктозы (и других кетогексоз) с соляной кислотой образуется оксиметилфурфурол, который с резорцином образует соединение, окрашенное в вишнево-красный цвет.



Альдозы также дают эту реакцию, но она протекает медленнее и в особых условиях (температура и кислотность среды).

В две пробирки наливают по 3 мл раствора Селиванова, в одну из них прибавляют 3 капли раствора глюкозы, в другую — 3 капли раствора фруктозы. Обе пробирки помещают в водяную баню, нагретую до 80 °С, и держат в ней 8 мин. За это время в пробирке с фруктозой появляется красное окрашивание.

5. *Реакция на пентозы с орцином (реакция Биала).* Пентозы в кислой среде образуют фурфурол, который конденсируется с орцином в присутствии следов хлорида железа (III).



К 1 мл испытуемого раствора прибавляют равный объем орцинового реактива. Смесь нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин. При наличии пентоз или метилпентоз появляется зеленое окрашивание раствора.

6. Реакция крахмала и гликогена с йодом. К 1–2 мл раствора крахмала прибавляют 1–2 капли раствора Люголя. Раствор окрашивается в синий цвет. Содержимое пробирки делят на 3 части, к первой прибавляют 1–2 мл этилового спирта, ко второй — 1–2 мл 10 %-го р-ра гидроксида натрия, третью часть нагревают. Во всех случаях окраска исчезает, причем в третьей пробирке окраска вновь появляется при охлаждении. Реакция основана на образовании нестойкого адсорбционного соединения йода с амилозой.

В пробирку наливают 2–3 мл раствора гликогена, добавляют 1–2 капли раствора Люголя, перемешивают, появляется красное-бурое окрашивание. Окраска усиливается при добавлении нескольких кристалликов хлорида натрия, но исчезает при добавлении гидроксида натрия или нагревании.

Различия в цвете комплексов йод-крахмала и йод-гликогена свидетельствуют о различии структур крахмала и гликогена.

Раздел V. Липиды

Лабораторная работа 9 Характерные реакции на липиды

Оборудование, реактивы: баня водяная; пробирки; пипетки на 1, 2 и 5 мл; фарфоровые чашки; пробирки широкие с пробками, в которые вставлены воздушные холодильники; петролейный эфир; бензин; хлороформ; четыреххлористый углерод; спирт; эфир; едкий калий (5 %-й); раствор куриного белка; раствор мыла; карбонат натрия (5 %-й); спиртовой раствор едкого калия; со-

ляная кислота (конц.); хлористый кальций (5 %-й раствор); свинец уксуснокислый (10 %-й раствор); бисульфат калия (крист.); натрий хлористый (крист.); фенолфталеин.

Материалы: масло растительное, масло сливочное.

Ход работы

1. Растворимость жиров. В 8 пробирок поместить по 1–2 капли подсолнечного масла, после чего прибавить в них последовательно по 2–3 мл растворителя: в первую — дистиллированную воду, во вторую — петролейный эфир, в третью — бензин, в четвертую — хлороформ, в пятую — четыреххлористый углерод, в шестую и седьмую — спирт, в восьмую — эфир. Взбалтыванием хорошо перемешать содержимое каждой пробирки, шестую или седьмую нагреть. Записать, какие из испытанных веществ являются растворителями жиров.

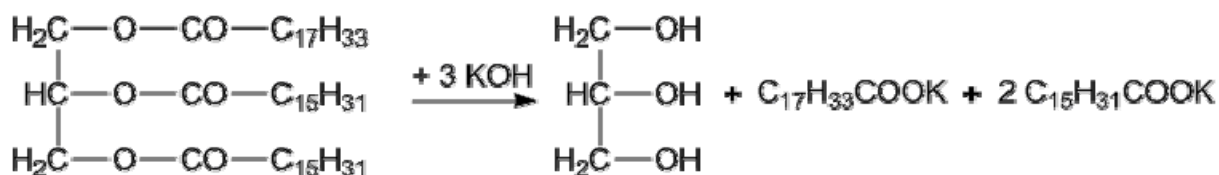
2. Эмульгирование жиров. Жиры при взбалтывании с водой образуют эмульсию, представляющую собой дисперсную систему, в которой мелкие капли жира взвешены в воде. Эмульсия масла в воде неустойчива, в спокойном состоянии наступает быстрое расслаивание, мелкие капли жира в процессе столкновения друг с другом соединяются в более крупные, переходящие далее в слой масла на поверхности воды. Чтобы придать стойкость эмульсии в воде, необходимо введение ряда веществ, способных в результате адсорбции на поверхности шарика эмульгированного вещества уменьшить поверхностное натяжение масла, в результате чего происходит снижение поверхностной энергии и эмульсия приобретает устойчивость. Вещества, снижающие поверхностную энергию, называются *эмульгаторами*. Склонность некоторых веществ к образованию эмульсий важна как в биологическом, так и в хозяйственном отношении.

К числу природных эмульсий относятся молоко, лимфа, латекс (каучуки). Вещества, находящиеся в организмах животных и растений, свободно перемещаются совместно с током жидкости. Жиры, находящиеся в кишечнике в виде эмульсий, характеризуются большой поверхностью, способствующей более энергичному воздействию на них ферментов.

Взять в 5 пробирок по равному количеству подсолнечного масла (4–5 капель), прилить в первую из них 5 мл дистиллирован-

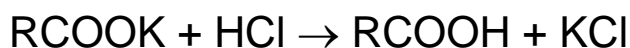
ной воды, а в остальные прилить по 5 мл: во вторую — 5 %-й раствор КОН, в третью — 5 %-й раствор соды, в четвертую — раствор мыла, в пятую — раствор белка. Содержимое пробирок сильно встряхнуть и наблюдать степень стойкости возникших эмульсий во взятых пробирках. Результаты наблюдений занести в журнал.

3. *Омыление жиров.* Жиры в присутствии щелочи подвергаются гидролизу, при этом образуется мыло и глицерин:



В широкую пробирку с 0,5–1 г масла прилить 5 мл спиртового раствора КОН. Содержимое перемешать, закрыть пробирку пробкой, в которую вставлен воздушный холодильник, и нагревать в течение 30 мин. После гидролиза содержимое пробирки перелить в фарфоровую чашку, прибавить 10 мл дистиллированной воды и осторожно нагреть для удаления спирта. Из полученного раствора калийного мыла половину отлить в пробирку.

4. *Реакции свободных жирных кислот.* Оставшийся в фарфоровой чашке раствор мыла подкислить концентрированной соляной кислотой, происходит выделение свободных жирных кислот:



Осадок отфильтровать, отмыть от кислоты так, чтобы промывание не давало кислой реакции на лакмус.

Взять часть жирных кислот в пробирку, растворить в нейтральном эфире, прилить к спирту, содержащему каплю раствора соды и 2 капли фенолфталеина. Жирные кислоты нейтрализуют раствор соды, благодаря чему исчезает малиновая окраска.

Образование нерастворимых кальциевых солей: в пробирку с 2–3 каплями калийного мыла (ранее отлитого в пробирку из фарфоровой чашки) прилить 5 %-й раствор хлорида кальция, образуются нерастворимые в воде кальциевые мыла жирных кислот (написать уравнение реакции).

Высаливание мыла: в другую пробирку с 2–3 мл раствора мыла прибавить порошок хлористого натрия, происходит осаждение — высаливание мыла (написать уравнение реакции).

Образование свинцового пластыря: в третью пробирку с 3 мл раствора мыла прилить несколько капель 10 %-го раствора ацетата свинца. Образуется осадок, который при нагревании делается вязким (свинцовый пластырь). Написать уравнение реакции.

5. Акролеиновая реакция. Эта реакция используется с целью доказательства наличия в жирах глицерина, который при нагревании разлагается с образованием акролеина (акрилового альдегида).

Взять в пробирку 2–3 капли масла, прибавить кристаллик бисульфата калия и нагреть, при этом образуется акролеин в виде белого пара с характерным резким запахом горелого сала. Написать уравнение реакции.

6. Реакция на лецитин (написать формулу лецитина).

А. Выделение лецитина из яичного желтка: взять в сухую пробирку около 2 мл яичного желтка и прилить к нему 5 мл кипящего этанола. Смесь тщательно перемешивать стеклянной палочкой в течение 7–10 мин, а затем профильтровать в сухую пробирку. Фильтрацию повторить, если фильтрат окажется мутным.

Б. Осаждение лецитина ацетоном: налить в пробирку 2–3 мл ацетона и прилить 5 капель спиртового раствора лецитина. Последний нерастворим в ацетоне, поэтому образуется муть.

В. Осаждение лецитина хлоридом кадмия: взять в сухую пробирку 4–5 капель спиртового р-ра лецитина и прибавить 2–3 капли насыщенного спиртового р-ра хлорида кадмия. Образуется не-растворимое соединение кадмия (4 част.) с лецитином (3 част.).

Г. Получение эмульсии лецитина: взять в сухую пробирку 5 капель спиртового раствора лецитина и прилить 25–30 капель дистиллированной воды. Возникает стойкая эмульсия лецитина.

Задания для внеаудиторной работы

Раздел 1. Белки

Пептиды, полипептиды и белки состоят из двадцати L- α -аминокислот, соединенных пептидной связью. Аминокислоты отличаются друг от друга строением радикала. По характеру взаимодействия с водой при $\text{pH}=7$ радикалы делятся на гидрофобные; незаряженные полярные, отрицательно заряженные и положительно заряженные. В структуре пептидов, полипептидов и белков выделяют N-конец со свободной аминогруппой и C-конец со свободной карбоксильной группой. Называют пептиды, полипептиды и белки с N-конца к C-концу.

Индивидуальные аминокислоты, пептиды и белки различаются по физико-химическим свойствам:

- форме молекул;
- молекулярной массе;
- суммарному заряду, величина которого у пептидов и белков зависит от соотношения анионных и катионных радикалов аминокислот в них;
- соотношению полярных и неполярных радикалов аминокислот на поверхности молекул;
- степени устойчивости к воздействию различных денатурирующих агентов.

Первичная структура белков удерживается прочными, ковалентными пептидными связями. Вторичная структура удерживается водородными связями пептидных групп. Третичная структура мономерных белков и четвертичная структура олигомерных белков удерживается за счет взаимодействия радикалов аминокислот (в основном слабыми взаимодействиями).

Тема А. Аминокислоты

1. Напишите в виде внутренних солей формулы аминокислот:

- а) аминоуксусной (глицина),
- б) α -аминопропионовой (аланина).

2. Напишите схемы взаимодействия аланина:

- а) с водным раствором щелочи,
- б) с соляной кислотой.
- 3. Напишите формулы оптических изомеров аланина, цистеина.
- 4. Напишите формулы серосодержащих аминокислот.
- 5. Какие аминокислоты содержат гетероциклы в радикале? Напишите их формулы и названия.
- 6. Напишите формулы аминокислот:
 - а) с гидрофобными (неполярными) радикалами,
 - б) с незаряженными полярными радикалами,
 - в) с отрицательно заряженными радикалами,
 - г) с положительно заряженными радикалами.
- 7. Напишите формулы дипептидов:
 - а) аланил-лейцина,
 - б) серил-лизина,
 - в) глицил-триптофана.
- Отметьте пептидные связи.
- 8. Напишите формулы и назовите трипептиды:
 - а) ала-вал-глу,
 - б) лей-про-тре,
 - в) тир-гли-гли.
- 9. Напишите формулу тетрапептида: асп-про-фен-лиз:
 - а) выделите в пептиде пептидные группы и радикалы аминокислот;
 - б) обозначьте N-и C-концы;
 - в) напишите другой пептид из тех же аминокислот;
 - г) подсчитайте количество возможных вариантов тетрапептида с аналогичным аминокислотным составом.
- 10. Рассмотрите особенности пептидной связи и следствия, вытекающие из них.

Тема Б. Физико-химические свойства аминокислот, пептидов и белков

- 1. В какой области значений рН и почему находится изоэлектрическая точка:
 - а) кислой,

- б) нейтральной,
- в) основной аминокислоты?

Приведите примеры вышеназванных аминокислот.

2. Напишите формулу пептида: гли-асп-про-тре. Определите его поведение в электрическом поле:

- а) в нейтральной,
- б) в слабокислой,
- в) в слабощелочной среде.

3. Напишите формулу пептида: ала-асн-цис-гис. В какой среде находится его изоэлектрическая точка? Ответ обоснуйте.

4. Напишите формулу пептида: глу-цис-асн-арг. Укажите его суммарный заряд в слабокислой среде.

5. Чем объясняется устойчивость белковых растворов? Почему белковые растворы неустойчивы вблизи изоэлектрической точки?

6. Что такое «денатурация белка»? Какие денатурирующие факторы вы знаете? Приведите примеры обратимой и необратимой денатурации.

Тема В. Структура белков

1. Что такое первичная структура белков?

2. Каковы этапы установления первичной структуры белковой молекулы?

3. α -спираль и ее параметры (шаг спирали, число аминокислот в витке, высота аминокислотного остатка). Какие взаимодействия стабилизируют α -спираль?

4. Каковы причины, нарушающие регулярность вторичной структуры белков? Перечислите аминокислоты, дестабилизирующие α -спираль.

5. Укажите типы связей, стабилизирующих третичную структуру белков. Приведите схему взаимодействия между двумя заряженными аминокислотами.

6. Приведите примеры аминокислот, участвующих в образовании водородных связей в белках. Изобразите схематично 3 варианта водородных связей между радикалами этих аминокислот.

7. Напишите формулы следующих фрагментов белка, принимающих участие в формировании его третичной структуры:

...тир-цис-глу-иле-сер...

...асп-цис-лиз-ала-асн...

Изобразите схемы всех возможных взаимодействий между радикалами аминокислот.

8. Напишите формулы следующих фрагментов белка, принимающих участие в формировании его третичной структуры:

...тре-лей-цис-гln-арг...

...гис-вал-цис-лиз-глу...

Изобразите схемы всех возможных взаимодействий.

9. В связывании субъединиц четвертичной структуры белка принимают участие радикалы следующих аминокислот: ала, гис, тре, фен, асп. Выпишите попарно формулы аминокислот, между радикалами которых возможны взаимодействия, покажите схематично эти взаимодействия.

10. Приведите схемы взаимодействия контактных участков субъединиц белка с участием радикалов аминокислот : глу, сер, гис, лиз.

Тема Г. Нуклеиновые кислоты

Нуклеиновые кислоты состоят из нуклеозидмонофосфатов, соединенных 3'-5'-фосфодиэфирными связями. ДНК в эукариотических клетках содержится в виде хроматина — нуклеопротеинового комплекса. ДНК состоит из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей, ориентированных азотистыми основаниями друг к другу. Она представляет собой чаще правозакрученную двойную спираль (А- и В-форма), реже левозакрученную (Z-форма); вторичную структуру ДНК поддерживают водородные связи и гидрофобные взаимодействия между азотистыми основаниями. ДНК содержит информацию о структуре различных видов РНК и белков. В клетках присутствуют 3 типа рибонуклеиновых кислот: информационные РНК (и-РНК), транспортные РНК (т-РНК) и рибосомальные РНК (р-РНК). Они различаются по первичной структуре, молекулярной массе, конформации и, самое главное, по функциональной активности.

1. Какие вещества образуются при полном гидролизе нуклеиновых кислот?

2. Напишите открытую и циклическую форму Д-рибозы. Приведите схему образования уридина.

3. Напишите в двух таутомерных формах гуанин, урацил, тимин и цитозин. Почему для аденина не характерна лактим-лактаминная таутомерия?

4. Какие азотистые основания комплементарны друг другу? Покажите схематично водородные связи между ними.

5. Напишите формулы:

- | | |
|----------------------|---------|
| а) 5-метилцитозина, | в) УДФ, |
| б) дезоксиаденозина, | г) АТФ. |

К какому классу относится каждое из них?

6. Что такое нуклеотиды? Напишите формулы следующих нуклеотидов:

- а) аденозинмонофосфат,
- б) дезоксигуанозинмонофосфат,
- в) ТМФ.

7. Напишите формулу олигонуклеотида Г-Т-Ц.

8. Напишите формулу фрагмента нуклеиновой кислоты Ц-У-Г-А.

9. В чем сходство и отличия в строении РНК и ДНК? Ответ поясните формулами.

10. Охарактеризуйте функции ДНК и основных видов РНК в клетке.

11. Характеристика двойной спирали Уотсона и Крика. Параметры спирали. Связи, стабилизирующие двойную спираль ДНК.

12. Особенности вторичной структуры РНК.

13. Вторичная структура т-РНК, функциональные центры.

14. Третичная структура ДНК и РНК.

Тема Д. Ферменты

Ферменты — биокатализаторы, имеющие белковую природу. По химическому строению различают простые (состоящие только из аминокислот) и сложные ферменты (содержащие также небелковую часть, или кофактор). Ферменты, в отличие от неорганических катализаторов, характеризуются исключительной специфичностью (выделяют субстратную специфичность и специфичность действия), высокой каталитической активностью. Существует несколько механизмов регуляции активности фер-

ментов. Ферменты делят на 6 классов (в основу классификации положен тип реакции, катализируемой ферментом), подклассы, подподклассы.

1. Химическая природа ферментов. Простые и сложные ферменты. Понятие о кофакторе.

2. Формулы ФМН, ФАД, участие этих коферментов в обменных процессах.

3. Формулы и функции НАД⁺, НАДФ⁺.

4. Формула К_оА, характеристика составных частей.

5. Тиаминпирофосфат, строение и функции.

6. Убихинон, строение и функции.

7. Формула УДФ-глюкозы, участие этого кофермента в обменных процессах.

8. Дайте систематическое название ферментам, катализирующим следующие реакции, определите класс каждого фермента:

а) асп + ПВК \rightleftharpoons ала + ЩУК,

б) УДФ-глюкоза \rightleftharpoons УДФ-галактоза,

в) АТФ + ПВК + CO₂ \Rightarrow АДФ + Ф + ЩУК,

г) лактат + НАД⁺ \rightleftharpoons пируват + НАДН·Н⁺,

д) малат \rightleftharpoons фумарат + Н₂О.

9. Напишите следующие реакции, дайте систематические названия ферментам, определите класс каждого фермента:

а) асп + α-кетоглутарат \rightleftharpoons глу + ЩУК,

б) глюкоза + АТФ \rightleftharpoons глюкозо-6-фосфат + АДФ,

в) сукцинат + ФАД \rightleftharpoons фумарат + ФАД·Н₂,

г) ала + CO₂ + АТФ \Rightarrow асп + АДФ + Ф,

д) глутамин + Н₂О \Rightarrow глутамат + NH₃,

е) этиловый спирт + НАД⁺ \rightleftharpoons ацетальдегид + НАДН·Н⁺.

10. Приведите уравнения двух реакций с участием первичных дегидрогеназ. Назовите ферменты, катализирующие эти реакции.

11. Приведите два примера реакций, катализируемых гидролазами.

12. Напишите уравнение реакции, указав фермент:

α-кетоглутарат \Rightarrow глутамат

Тема Е. Липиды

Основными представителями простых липидов являются жиры. **Жиры — триацилглицеролы** — самая компактная и энергоёмкая форма хранения энергии. В норме содержание жиров в организме человека составляет 6–10 кг. Этого количества жиров достаточно для обеспечения энергией организма 40–50 дней при полном голодании. В результате распада жиров концентрация жирных кислот в крови увеличивается приблизительно в 2 раза. Время полужизни жирных кислот менее 5 мин; это означает, что существует быстрый поток жирных кислот из жировой ткани к другим органам. Жирные кислоты, как гидрофобные молекулы, транспортируются кровью в периферические ткани в комплексе с белком альбумином, имеющим центры связывания гидрофобных молекул. Итак, жирные кислоты, как и глюкоза, являются основными «топливными молекулами». В основном энергия извлекается из жирных кислот в процессе β -окисления. Некоторое количество энергии образуется при окислении молекул глицерина.

1. Классификация липидов.

2. В состав свиного жира входят триглицериды:

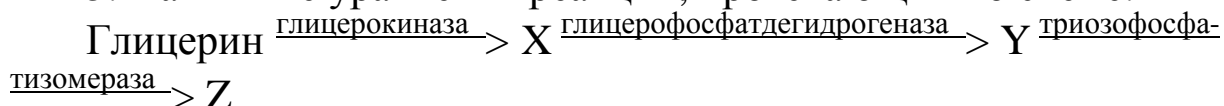
- а) трипальмитин,
- б) триолеин,
- в) олеодипальмитин,
- г) пальмитостеароолеин.

Напишите формулы перечисленных триглицеридов. Какие из них являются простыми и какие смешанными?

3. Гидролиз жиров в желудочно-кишечном тракте позвоночных.

4. Напишите уравнения реакций гидролиза тристеарина, олеодипальмитина.

5. Напишите уравнения реакций, протекающих по схеме:



Назовите вещества X, Y, Z.

6. Напишите уравнение реакции активирования стеариновой кислоты.

7. Напишите уравнения реакций, протекающих по схеме:

Пальмитиновая кислота $\xrightarrow{\text{ацил-КоА-синтетаза}}$ А $\xrightarrow{\text{ацил-КоА-дегидрогеназа}}$ $\xrightarrow{\text{еноил-КоА-гидратаза}}$ В $\xrightarrow{\beta\text{-оксиацил-КоА-дегидрогеназа}}$ С $\xrightarrow{\beta\text{-кетоацил-КоА-тио-эстераза}}$ D $\xrightarrow{\quad}$ E

Назовите вещества А, В, С, D, E.

Каков энергетический эффект одного акта β -окисления?

8. Рассчитайте энергетический эффект распада молекулы глицерина в анаэробных и в аэробных условиях.

9. Энергетический выход полного окисления молекулы пальмитиновой кислоты, трипальмитина.

10. Энергетический эффект полного окисления молекулы стеариновой кислоты, тристеарина.

11. Посредством каких химических реакций осуществляется синтез высших жирных кислот из глюкозы? Покажите в виде схемы.

12. Напишите уравнения реакций, посредством которых происходит биосинтез жиров из глицерофосфата и высших жирных кислот. Каково биологическое значение этих процессов?

Вопросы к коллоквиуму 1

Обмен нуклеиновых кислот и белков

А. Обмен нуклеиновых кислот.

1. Распад нуклеиновых кислот в живых организмах. Классификация нуклеаз.
2. Распад нуклеотидов.
3. Распад пуриновых и пиримидиновых оснований.
4. Репликация ДНК: значение, механизм.
5. Транскрипция (синтез РНК).
6. Обратная транскрипция.

Б. Обмен белков.

7. Распад белков в живых организмах. Гидролиз белков в желудочно-кишечном тракте позвоночных под действием протеолитических ферментов.
8. Распад аминокислот по аминокруппе: окислительное дезаминирование, переаминирование. Распад аминокислот по карбоксильной группе и радикалу.
9. Конечные продукты распада аминокислот. Орнитиновый цикл.
10. Биосинтез белка, его основные этапы.
11. Процесс активирования аминокислот: значение, механизм.
12. Генетический код и его особенности.
13. Трансляция (сборка полипептидной цепи), механизм.

Вопросы к коллоквиуму 2

Обмен углеводов

1. Пути распада углеводов в живых организмах.
2. Распад поли- и олигосахаридов. Гидролиз и фосфоролиз.
3. Распад полисахаридов в желудочно-кишечном тракте человека.
4. Превращения моносахаридов. Пути синтеза глюкозо-6-фосфата и значение этого соединения.
5. Анаэробный гликолиз: значение, стадии, энергетический эффект. Субстратное фосфорилирование.
6. Гликогенолиз. Реакции, отличающие гликогенолиз от анаэробного гликолиза. Энергетический эффект гликогенолиза.
7. Спиртовое брожение: значение, реакции заключительного этапа спиртового брожения, энергетический эффект.
8. Дыхание: значение, основные этапы. Окислительное декарбоксилирование пирувата.
9. Цикл Кребса и его значение.
10. Дыхательная цепь ферментов.
11. Энергетический эффект дыхания.
12. Энергообеспечение живых организмов. Биоэнергетика.
13. Окислительное фосфорилирование. Гипотеза Митчелла.
14. Фотосинтез.
15. Синтез олиго- и полисахаридов.

Оглавление

Методические указания к лабораторным работам	3
<i>Раздел I. Белки</i>	<i>3</i>
Лабораторная работа 1. Распределительная хроматография аминокислот на бумаге	3
Лабораторная работа 2. Качественные реакции на белки	5
Лабораторная работа 3. Количественное определение общего белка в сыворотке крови биуретовым методом на биохимическом полуавтоматическом анализаторе (фотометре) STAT FAX 1904 Plus (США)	11
<i>Раздел II. Нуклеиновые кислоты</i>	<i>17</i>
Лабораторная работа 4. Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей с помощью центрифугирования на настольной программируемой центрифуге Sigma 2-6	17
Лабораторная работа 5. Гидролиз рибонуклеопротеинов и качественное определение продуктов их гидролиза (белка, рибозы, пуриновых оснований и фосфорной кислоты).....	20
<i>Раздел III. Ферменты</i>	<i>21</i>
Лабораторная работа 6. Качественные реакции на присутствие ферментов	21
Лабораторная работа 7. Свойства ферментов	23
<i>Раздел IV. Углеводы</i>	<i>26</i>
Лабораторная работа 8. Качественные реакции на углеводы	26
<i>Раздел V. Липиды</i>	<i>29</i>
Лабораторная работа 9. Характерные реакции на липиды ...	29
Задания для внеаудиторной работы	33
Раздел 1. Белки	33
Вопросы к коллоквиуму 1. Обмен нуклеиновых кислот и белков	41
Вопросы к коллоквиуму 2. Обмен углеводов.....	42

Учебное издание

**Биохимия
и молекулярная биология**

Учебно-методическое пособие

Составители:

Урванцева Галина Александровна
Грачева Екатерина Леонидовна

Редактор, корректор М. Э. Левакова
Верстка М. Э. Леваковой

Подписано в печать 29.03.17. Формат 60×84 1/16.
Усл. печ. л. 2,56. Уч.-изд. л. 1,5.
Тираж 4 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.

Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова.
150003, Ярославль, ул. Советская, 14.