Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна
Должность: проректор по учебной работе
Дата подписания: 08.09.2026 07:46:05
Уникальный программный ключ:
0b817ca911e6668abb13a5d426d39e5f1c11eabbf73e943df4a4851fda56d089

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Юго-Западный государственный университет»
(ЮЗГУ)

Кафедра биомедицинской инженерии

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
_____ О.Г. Локтионова
«25» 09 _____ 2023 г.

НОРМАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ С ЭЛЕМЕНТАМИ БИОХИМИИ

Методические указания по выполнению лабораторных работ
для студентов специальности 30.05.03 «Медицинская кибернетика»

Курск 2023

УДК 612.1/.8

Составитель: Быков А.В.

Рецензент

Кандидат биологических наук, доцент О. И. Басарева

Нормальная физиология с элементами биохимии: методические указания по выполнению лабораторных работ для студентов специальности 30.05.03 «Медицинская кибернетика» / Юго-Зап. гос. ун-т; сост.: А.В. Быков. - Курск, 2023. - 89с.

Методические указания содержат рекомендации по выполнению лабораторных работ разной степени сложности, позволяющие студентам овладевать методами биохимических исследований, умением анализировать полученные результаты. В практикум включены принципы и подробное описание хода наиболее типичных работ по основным разделам классической биохимии: углеводам, липидам, нуклеиновым кислотам, белкам, ферментам, витаминам.

Методические указания соответствуют требованиям федеральных государственных образовательных стандартов.

Предназначены для студентов специальности 30.05.03 «Медицинская кибернетика».

Текст печатается в авторской редакции

Подписано в печать . Формат 60x84 1/16.
Усл.печ. л. __. Уч.-изд. л. __. Тираж 30 экз. Заказ 1034. Бесплатно.
Юго-Западный государственный университет.
305040, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Лабораторная работа № 1. УГЛЕВОДЫ 4
Лабораторная работа № 2. БЕЛКИ 17
Лабораторная работа № 3. ФЕРМЕНТЫ 46
Лабораторная работа № 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ 54
Лабораторная работа № 5. ЛИПИДЫ..... 59
Лабораторная работа № 6. ВИТАМИНЫ И КОФЕРМЕНТЫ 74

Лабораторная работа № 1. УГЛЕВОДЫ

Цель работы: научиться проводить качественную реакцию на углеводы, количественное определение сахара в биологической жидкости орто-толуидиновым методом; изучить энзиматический метод определения глюкозы.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Углеводы — это альдегиды и кетоны многоатомных спиртов, и полимеры этих соединений. В растениях и у животных углеводы выполняют как структурные, так и метаболические функции. Наиболее распространены пентозы и гексозы.

Сахара, содержащие 5 атомов углерода и более, могут существовать в двух аномерных формах, представляющих стереоизомерные внутримолекулярные полуацетали. При обработке пентоз и гексоз спиртами или кислотами образуются аномерные гликозиды. Свободные гидроксильные группы сахаров могут быть полностью ацетилированы или метилированы. Сахара восстанавливаются до сахароспиртов и окисляются до сахарных кислот.

Дисахариды состоят из двух моносахаридов, связанных гликозидной связью. В отличие от мальтозы и целлобиозы, содержащих два остатка глюкозы, соединенных 1-4 связью, в сахарозе, состоящей из глюкозы и фруктозы, связь между моносахаридами осуществляется через аномерные атомы углерода (1-2), и сахароза не принадлежит к числу редуцирующих сахаров.

Полисахариды (гликаны) подразделяются на гомогликаны, содержащие остатки только одного моносахарида (крахмал, гликоген, хитин, целлюлоза), и гетерогликаны, содержащие остатки двух и более моносахаридов (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, гепарин), связанные гликозидной связью.

Нарушение обмена углеводов приводит к возникновению ряда заболеваний (сахарный диабет, галактоземия, нарушения в системе запасания гликогена), поэтому определение содержания глюкозы в крови человека является важным диагностическим тестом.

В предлагаемых лабораторных работах представлены качественные групповые и индивидуальные реакции на углеводы, реакции на редуцирующие сахара, а также методы определения глюкозы в биологических жидкостях, используемые в диагностических целях.

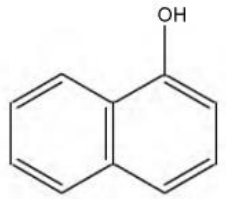
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1.1 КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА УГЛЕВОДЫ

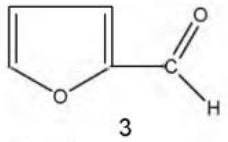
Проба с а-нафтолом

Принцип метода. Реакция является одной из наиболее чувствительных общих реакций на углеводы и углеводные компоненты в сложных соединениях. С а-нафтолом углеводы дают фиолетовое окрашивание. Обусловлено оно тем, что при взаимодействии с концентрированной серной кислотой углеводы образуют фурфурол или 5-оксиметилфурфурол, которые конденсируются с *а*-нафтолом. Образующийся комплекс окисляется в серной кислоте с образованием хиноидного соединения.

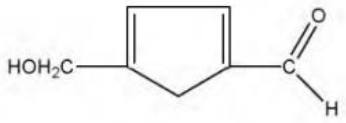
Реактивы: 0,5% раствор глюкозы, пентозы, дисахаридов; 0,2% спиртовой раствор а-нафтола; H_2SO_4 концентрированная.



α-нафтол



фурфурол



5-оксиметилфурфурол

Ход работы. К 10 каплям раствора углевода прибавляют 3-4 капли раствора а-нафтола. Затем осторожно наслаивают 1 мл концентрированной серной кислоты. Появляется фиолетовое окрашивание, более выраженное на границе слоев.

Реакция Троммера

Принцип метода. Реакция является пробой на редуцирующие (восстанавливающие) сахара. Моносахариды, окисляясь в щелочной среде, восстанавливают ионы меди (II) до меди (I), а также соли серебра до металлического серебра. Эти реакции могут использоваться для количественного определения восстанавливающих моносахаридов, молекулы которых содержат свободные карбонильные группы, которые при восстановлении меди (II) окисляются до карбоксильных. Восстанавливающими свойствами обладают также некоторые дисахариды: мальтоза, лактоза, целлобиоза.

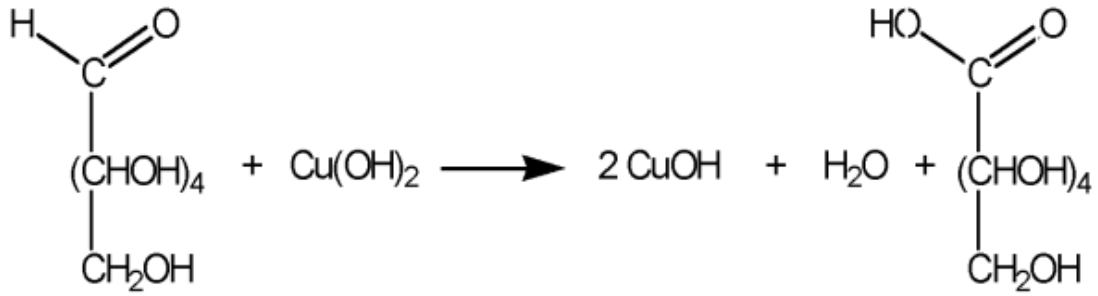
Реактивы: 1% раствор глюкозы, лактозы и сахарозы, 5% раствор NaOH; 5% раствор медного купороса ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$).

Ход работ. В пробирку наливают 1-2 мл исследуемого раствора и равный объем раствора NaOH. Затем по каплям добавляют раствор соли до появления неисчезающей мути $Cu(OH)_2$ голубого цвета:

$$CuSO_4 + 2NaOH = Cu(OH)_2\downarrow + Na_2SO_4$$

При нагревании смеси сначала появляется желтое окрашивание,

обусловленное образованием гидроксида меди (I)



При дальнейшем нагревании желтая окраска раствора в присутствии восстанавливающих сахаров переходит в красную:

$$2CuOH = \underset{\text{красный оксид меди(I)}}{Cu_2O} + H_2O$$

Избыток меди может затемнить реакцию, так как при нагревании $Cu(OH)_2$ теряет воду и превращается в черный оксид меди(II):

$$Cu(OH)_2 = \underset{\text{черный оксид меди(II)}}{CuO} + H_2O$$

Этого можно избежать, проводя пробы на редуцирующие сахара с реактивом Фелинга, содержащим медь(II) в виде комплексного соединения с сегнетовой солью (двойная соль винной кислоты — калий-натрий тартрат). Комплекс медь(II) с тартратами не выпадает в осадок.

Реакция Барфеда

Принцип метода. В отличие от реакций восстановления окисление сахаров протекает не в щелочной, а в близкой к нейтральной среде. В этих условиях редуцирующие дисахариды в

противоположность моносахаридам практически не окисляются, что позволяет отличить их от моноз.

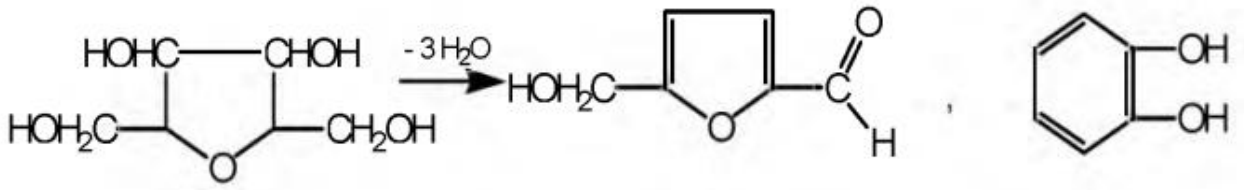
Реактивы: 1% раствор глюкозы; 1% раствор лактозы или мальтозы; раствор 13,3 г ацетата меди в 200 мл воды и 1,9 мл ледяной CH_3COOH.

Ход работы. В две пробирки наливают по 1,5 мл исследуемого раствора (глюкоза, лактоза или мальтоза), добавляют по 1,5 мл раствора ацетата и нагревают до кипения. Появление красного осадка Cu_2O свидетельствует о присутствии восстанавливающих моноз (глюкозы).

Реакция Селиванова

Принцип метода. Реакция является пробой на кетозы: 5-оксиметилфурфурол, образующийся при нагревании кетогексоз с сильными кислотами (HCl, H_2SO_4), дает с резорцином вишнево-красное окрашивание. Реакцию с резорцином дают как свободные, так и отщепляющиеся от более сложных сахаров (например, сахарозы) кетогексозы. Альдозы также могут образовывать 5-оксиметилфурфурол, но при более длительном нагревании.

Реактивы: 0,5% раствор фруктозы; реактив Селиванова (раствор 0,05 г резорцина в 100 мл 20% раствора HCl).



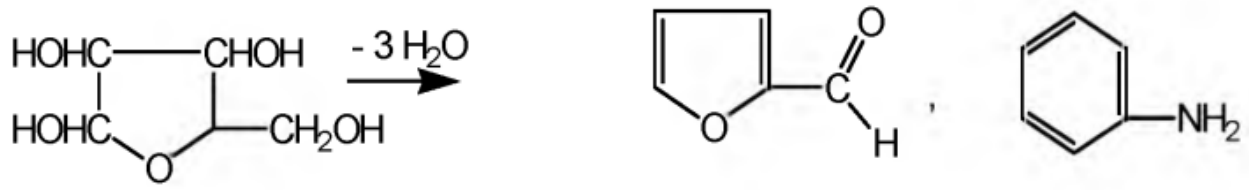
фруктоза 5-оксиметилфурфурол резорцин

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл исследуемого раствора, добавляют несколько капель реактива Селиванова и нагревают до кипения. В присутствии фруктозы наблюдается интенсивное красное окрашивание.

Реакция на пентозы

Принцип метода. При нагревании с концентрированной соляной или серной кислотами пентозы теряют три молекулы воды и превращаются в фурфурол. Фурфурол — бесцветная жидкость, которая с анилином образует продукт конденсации красного, с орцином — зеленого, с флороглицином — вишневого цвета.

Реактивы: 1-2% раствор рибозы, арабинозы или ксилозы; уксуснокислый анилин; HCl концентрированная



5

пентоза фурфурол анилин

Ход работы. В пробирку наливают 1-2 мл исследуемого раствора, добавляют 1-2 мл концентрированной соляной кислоты. Смачивают полоску фильтровальной бумаги свежеприготовленным уксусным анилином. Кипятят содержимое пробирки, держа бумажку, смоченную анилином, в парах. Появление вишнево-красного окрашивания говорит о реакции фурфурола с анилином.

Реакция Мальфатти

Является качественной пробой на лактозу

Реактивы: 1% раствор лактозы; 10% раствор NaOH; 25% раствор аммиака.

Ход работы. В пробирке смешивают 1 мл исследуемого раствора лактозы и 0,5 мл раствора аммиака, добавляют 2 капли NaOH. Смесь помещают на 15 мин на водяную баню. Появляется оранжево-красное окрашивание.

Проба на сахарозу

Качественная реакция с солями кобальта.

Реактивы: 1% раствор сахарозы; 2% раствор $Co(NO_3)_2$; 5% раствор NaOH.

Ход работы. В пробирку с 2 мл раствора сахарозы добавляют 1 мл раствора NaOH и несколько капель раствора $Co(NO_3)_2$. Появляется фиолетовое окрашивание.

Проба на полисахариды

Принцип метода. При взаимодействии полисахаридов с иодом происходят комплексообразование, адсорбция и другие процессы. Оттенок окраски раствора зависит от строения полисахарида, в частности от степени его ветвления.

Для получения сорбционного соединения крахмала необходимо наличие свободного иода. NaOH превращает свободный иод в иодид, гипоиодит и иодит, который после прибавления кислоты разлагается с выделением свободного иода. Поэтому, прежде чем приступить к иодной пробе, щелочные растворы надо нейтрализовать.

Реакция связывания свободного иода в щелочной среде

$$I_2 + 2NaOH = \underset{\text{Иодид}}{NaI} + \underset{\text{гипоиодит}}{NaIO} + H_2O,$$

$$3NaIO = \underset{\text{иодит}}{NaIO_3} + 2NaI.$$

В кислой среде:

$$5NaI + NaIO_3 + 6HCl = 3I_2\uparrow + 6NaCl + 3H_2O.$$

Реактивы: 0,5% раствор крахмала; раствор Люголя (раствор I_2 в KI).

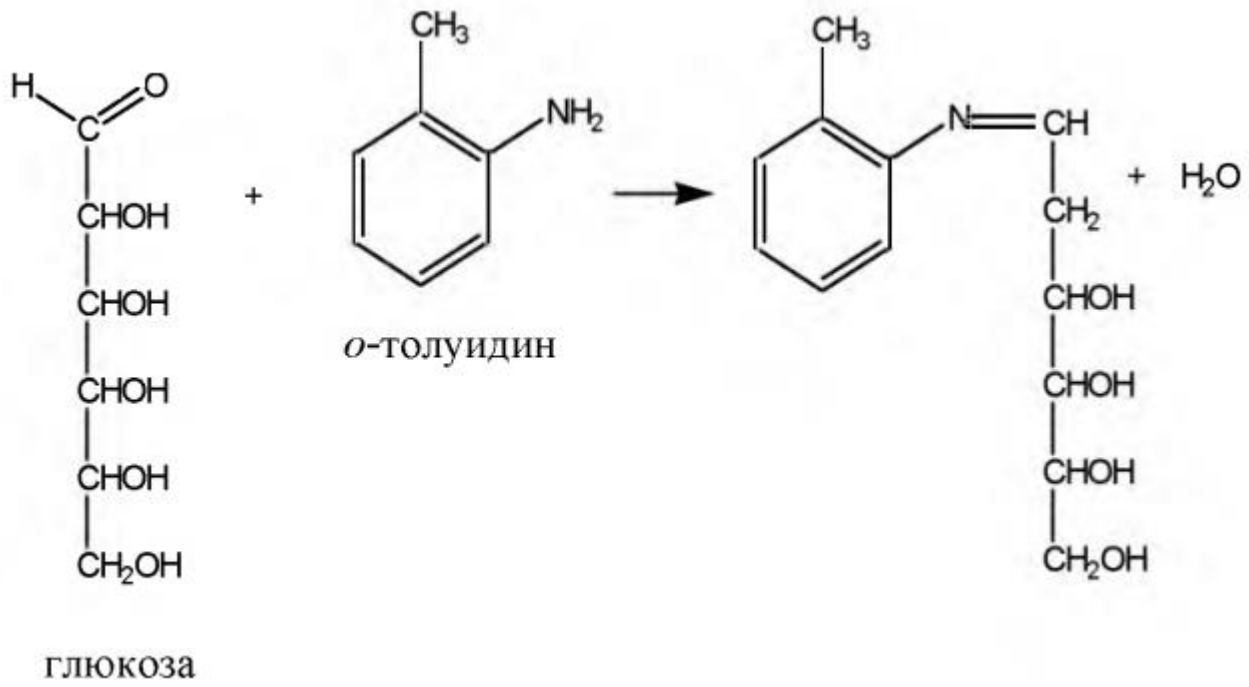
Ход работы. В пробирку наливают 1 мл крахмала и добавляют 1-2 капли реактива Люголя.

Темно-синее или красно-бурое окрашивание раствора свидетельствует о присутствии полисахаридов. Если появляется синее окрашивание, то присутствует крахмал или декстрин. Красно-бурое — окрашивание свидетельствует о наличии в растворе гликогена или эритродекстрина. При нагревании исследуемого раствора в присутствии гликогена наблюдается опалесценция, если раствор остается прозрачным, значит присутствует эритродекстрин.

1.2 КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРА В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ОРТО-ТОЛУИДИНОВЫМ МЕТОДОМ

В лабораторной практике применяются различные методы определения содержания сахаров. Диагностическое значение имеет определение содержания глюкозы в биологических жидкостях. Среди применяемых методов следует выделить орто-толуидиновый и энзиматический методы.

Принцип метода. Глюкоза при нагревании с о-толуидином в растворе уксусной кислоты дает зеленое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна содержанию глюкозы.



Другие редуцирующие вещества крови (глутатион, глюкуроновая и аскорбиновая кислоты) с о-толуидином окрашенных продуктов не образуют. Содержание глюкозы определяют в жидкости, из которой предварительно удаляют белок.

Реактивы: 3% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ); исследуемая жидкость; о-толуидиновый реактив; 0,9% раствор NaCl.

Ход работы:

• Опытная проба. В центрифужную пробирку внести 0,5 мл ТХУ и затем влить по стенке 0,5 мл исследуемой биологической жидкости (кровь, моча). Содержимое перемешать и центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин. В стеклянную пробирку внести 0,5 мл прозрачного супернатанта (надосадочной жидкости) и 4,5 мл *о*-толуидинового реактива.

• Стандартная проба. В пробирку внести 0,5 мл стандартного (100 мг/100 мл) раствора глюкозы и 0,5 мл ТХУ, перемешать. Затем отобрать 0,5 мл смеси и влить в другую стеклянную пробирку. Добавить 4,5 мл о-толуидинового реактива.

• Контрольная проба. В пробирку вместо биологической жидкости внести 0,5 мл раствора NaCl и 0,5 мл ТХУ. Перемешать и отобрать в стеклянную пробирку 0,5 мл смеси. Добавляют 4,5 мл о-толуидинового реактива.

• Все три пробирки поместить в кипящую! водяную баню на 8 мин и сразу же охладить до комнатной температуры. Содержимое пробирок (опытная и стандартная пробы) калориметрировать на ФЭКе с контрольной пробой при красном фильтре (λ = 620-640 нм), кювета 1 см. Если опытная проба после нагревания помутнела, ее следует повторно отцентрифугировать.

Расчет концентрации глюкозы (в миллиграммах на 100 мл) в исследуемой жидкости проводят по формуле:

$$C_{оп} = (C_{ст} * E_{оп}) / E_{ст}$$

Где $C_{оп}$ — концентрация глюкозы в исследуемой жидкости

$C_{ст}$ — концентрация глюкозы в стандартной пробе (100 мг);

$E_{оп}$ и $E_{ст}$ — оптическая плотность опытной и стандартной пробы соответственно.

Для пересчета концентрации глюкозы в ммоль/л используют коэффициент 0,0555.

Нормальное содержание глюкозы в сыворотке крови человека, определяемое о-толуидиновым методом, колеблется в пределах 3,33 — 4,99 ммоль/л., или 60 — 90 мг %.

1.3 ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ

Благодаря высокой специфичности, позволяющей определять глюкозу в присутствии других сахаров, энзиматический метод имеет ряд преимуществ перед другими методами.

Принцип метода. Глюкоза в водной среде в присутствии кислорода воздуха и при участии фермента глюкозооксидазы окисляется до глюконовой кислоты. Образующийся в процессе реакции пероксид водорода разлагается пероксидазой. Выделившийся при этом атомарный кислород реагирует с о-толидином (3, 3'-диметилбензидин), окрашивающимся при окислении. Интенсивность окраски окисленного о-толидина пропорциональна концентрации глюкозы. Химизм реакций схематически можно представить следующим образом:

$$\text{Глюкоза} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{глюкозооксидаза}} \underset{\text{Глюконовая кислота}}{CH_2OH(CHOH)_4COOH} + H_2O_2$$

$$\underset{\text{(восстановленный)}}{\textit{o}\text{-толидин} + 2H_2O_2} \xrightarrow{\text{пероксидаза}} \underset{\text{(окисленный)}}{\textit{o}\text{-толидин} + 2H_2O}$$

Реактивы: 0,25 М ацетатный буфер pH 4,8; 3% раствор ТХУ; глюкозооксидаза; пероксидаза из хрена; стандартный раствор глюкозы (100 мг/100 мл); 1% раствор о-толидина в 96% этаноле; биологическая жидкость (плазма, сыворотка, моча).

Ход работы.

• Приготовить рабочий реактив для определения глюкозы. В 80 мл ацетатного буфера растворить 1 мг глюкозооксидазы и 1 мг пероксидазы, прилить 1 мл 1% раствора *о*-толидина и довести объем смеси до 100 мл ацетатным буфером. Реактив готовится за 1-2 ч до определения.

• Провести депротеинизацию биологических жидкостей: в центрифужную пробирку внести 1,8 мл ТХУ и влить по стенке 0,2 мл исследуемой биологической жидкости (кровь, моча). Содержимое перемешать, центрифугировать 10 мин при скорости 3000 об/мин.

• Подготовить опытную, стандартную и контрольную пробы, согласно табл. 1.

Таблица 1

Проба	Опытная	Стандартная	Контрольная
Биологический материал (центрифугат)	1 мл	–	–
Стандартный раствор глюкозы	–	0,1 мл	–
Вода	–	0,9 мл	1 мл
Рабочий реактив	3 мл	3 мл	3 мл

Примечание. Знак «—» обозначает отсутствие биологического материала, глюкоза и воды.

Подготовленные пробы перемешивают и инкубируют при 37 °С в течение 15 мин. Затем измеряют оптическую плотность опытной ($A_{оп}$) и стандартной ($A_{ст}$) проб по отношению к контрольной при λ = 490-540 нм, кювета = 1 см. Окраска стабильна в течение 15 мин. Если оптическая плотность пробы превышает 0,85, ее разводят дистиллированной водой в соотношении 1:1, а полученный результат умножают на 2 .

Концентрацию глюкозы ($C_{оп}$) в исследуемой жидкости рассчитывают по формуле

$$C_{оп} = A_{оп}(C_{ст} / A_{ст}).$$

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Биологическая роль углеводов и их распространение в природе.

2. Особенности строения углеводов, изомерия и конформации моноз.

3. Физические и химические свойства моносахаридов. Гликозиды, сахарные кислоты, аминосахара.

4. Олигосахариды. Характеристика основных дисахаридов животных и растительных организмов. Их строение и свойства (мальтоза, целлобиоза, лактоза, сахароза).

5. Полисахариды II порядка (гликаны). Строение и свойства основных представителей гомогликанов (крахмал, гликоген, целлюлоза, хитин, пектиновые вещества).

6. Гетерогликаны. Строение и биологическая роль (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, гепарин).

7. Перечислить групповые и специфические реакции на углеводы. Рассмотреть их химизм.

8. Химизм реакции Троммера и реакции с фелинговой жидкостью. Какие из перечисленных углеводов и почему можно открыть с помощью этих реакций: фруктоза, глюкоза, дезоксирибоза, мальтоза, сахароза.

9. Какие принципы положены в основу методов определения сахара с помощью *о*-толуидина. Почему эти методы позволяют определить «истинную глюкозу»?

Лабораторная работа № 2. БЕЛКИ

Цель работы: изучить качественные реакции на функциональные группы белков и аминокислот, физико-химические свойства белков; освоить очистку и разделение смесей белков и аминокислот, определение содержания белка биуретовым методом.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

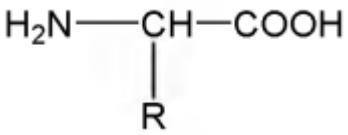
Белки — это высокомолекулярные азотсодержащие биополимеры, состоящие из а-аминокислот, соединенных пептидными связями, в формировании которых принимают участие карбоксильная группа одной и а-аминогруппа другой аминокислоты.

Первичная структура белков характеризует их аминокислотную последовательность, которая определяет другие уровни организации этих полимеров — вторичную, третичную и четвертичную структуры. Последовательность аминокислот в полипептиде определена генетически.

Химические свойства белков обусловлены набором и соотношением аминокислот. Поскольку аминокислоты представляют собой основные строительные единицы всех белков, для понимания биохимии белков необходимо знать биохимию аминокислот.

В природе встречается примерно 300 аминокислот, но только 20 из них используются организмами в биосинтезе белка. Это а-аминокислоты, в которых функциональные амино- и карбоксильная группы находятся у одного и того же а-углеродного атома.

Общая структура а-аминокислот



а-Аминокислоты отличаются друг от друга структурой R-группы. Классификация аминокислот основывается на химической структуре группы R: алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин); гидроксилсодержащие (серин, треонин); серосодержащие (цистеин, метионин); ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан); кислые и амиды (аспарагиновая кислота и аспарагин, глутаминовая кислота и глутамин); основные (аргинин, лизин); иминокислоты (пролин). Другие типы классификации аминокислот: на основе полярности R-групп (полярные, неполярные); на основе ионных свойств R-групп (кислые, основные, нейтральные); на основе питательной ценности для человека: незаменимые — не могут синтезироваться в организме человека (треонин, метионин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, триптофан) и заменимые — могут синтезироваться в организме.

Аминокислоты могут участвовать во многих реакциях с участием а-аминогрупп, а-карбоксильных групп, а также функциональных групп боковых цепей.

Для идентификации и количественного определения белков и отдельных аминокислот используют цветные реакции, когда происходит взаимодействие специфических реактивов с функциональными группами радикалов аминокислот, входящих в состав белка или пептида.

Существуют два типа цветных реакций:

• универсальные: биуретовая (на все белки) и нингидриновая (на все аминокислоты и белки);

• специфические: только на определенные аминокислоты как в молекуле белка, так и в растворах отдельных аминокислот, например реакция Фоля (на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу), реакция Миллона (на тирозин), реакция Сакагучи (на аргинин) и др.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1.1 КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ

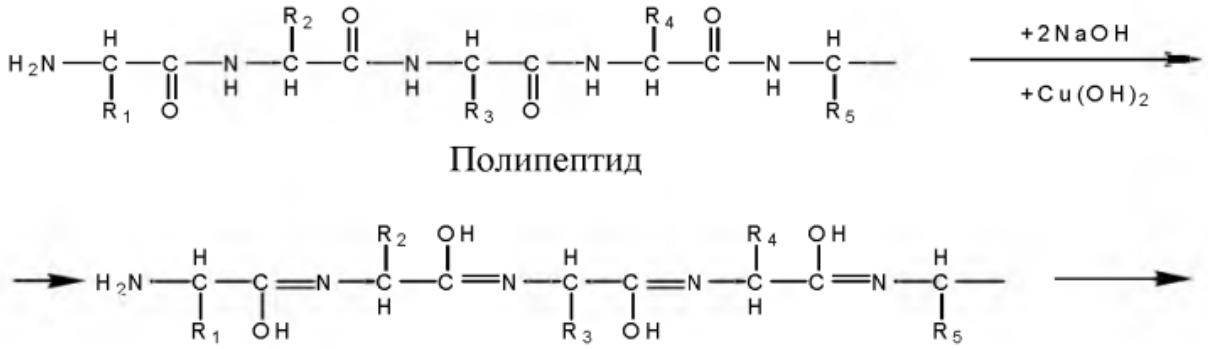
Биуретовая реакция на пептидную группу (реакция Пиотровского).

Принцип метод. Основан на способности пептидной группы в белках и полипептидах (-CO—NH—), а также связи типа (–CH=NH–) образовывать в щелочной среде с ионами Cu^{2+} комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей в белке.

Биуретовая реакция положительна с белками и пептидами, имеющими не менее двух пептидных связей. С ди- и трипептидами реакция не устойчива.

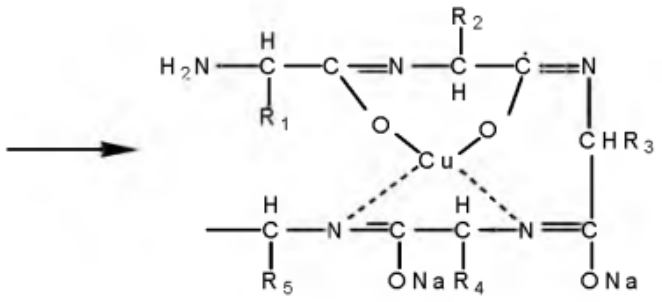
Биуретовую реакцию дают небелковые вещества, содержащие не менее двух пептидных групп, например, производное мочевины — биурет H_2N—CO—NH—CO—NH_2, давшее название этой реакции, и некоторые другие.

В сильнощелочной среде пептидные группы полипептидов переходят в енольную форму, которая и взаимодействует с ионами Cu^{2+}, образуя окрашенный биуретовый комплекс. Схема протекания биуретовой реакции:



Полипептид

Енольная форма полипептида



Биуретовый медный комплекс

Реактивы: 4% раствор белка; 10% раствор NaOH; 1% раствор $CuSO_4$.

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл 4% раствора белка, равный объем раствора NaOH и 1-2 капли раствора $CuSO_4$. Появляется красно- или сине-фиолетовое окрашивание.

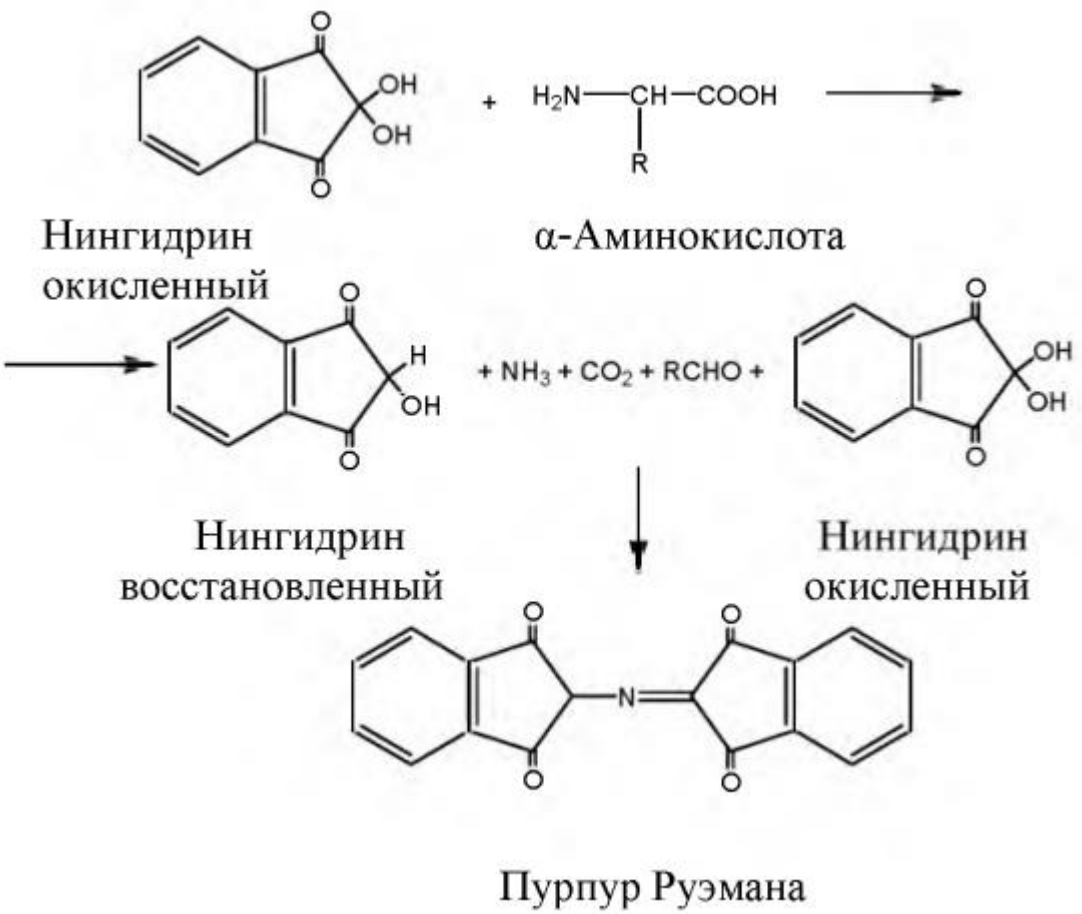
Нингидриновая реакция на а-аминогруппу

Нингидриновую реакцию используют в хроматографии для выявления аминокислот. Их количественное определение в автоматических анализаторах проводят путем измерения окраски, возникающей при взаимодействии последовательно выделяющихся с хроматографической колонки аминокислот с нингидрином.

Принцип метода. Реакция обусловлена наличием в аминокислотах аминогруппы в а -положении. Белки, полипептиды и а-аминокислоты образуют при кипячении с нингидрином соединение синего или сине-фиолетового цвета. Нингидриновая реакция является одной из наиболее чувствительных для обнаружения а-аминогрупп.

Сущность реакции заключается в том, что а -аминокислоты и пептиды, взаимодействуя с нингидрином, подвергаются окислительному дезаминированию и декарбоксилированию. В зависимости от среды образуются различные продукты реакции.

Механизм реакции сложен, но схематично его можно представить следующим образом:

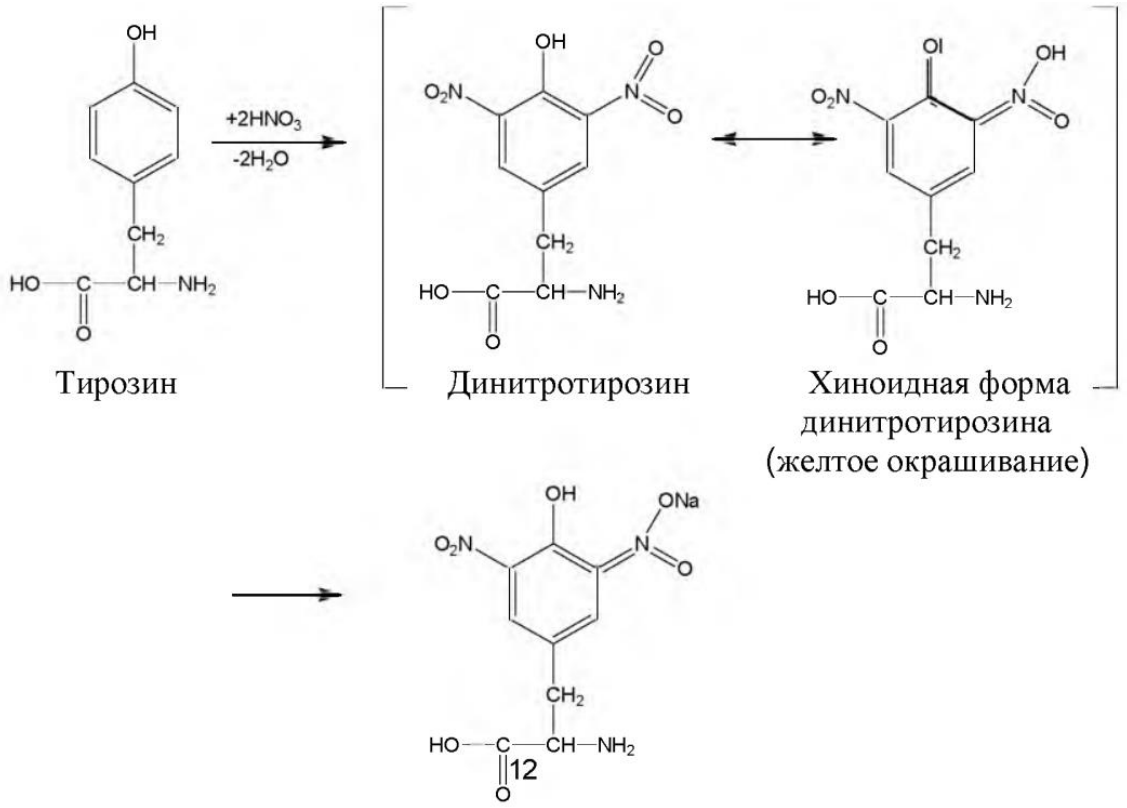


Реактивы: 1% раствор глицина; 4% раствор белка; 0,1% раствор нингидрина.

Ход работы. В одну пробирку наливают 1-2 мл раствора глицина, в другую — столько же раствора белка. В обе пробирки добавляют раствор нингидрина (в первую — 5-6, во вторую — 10-12 капель), нагревают одну минуту. В пробирке с раствором глицина быстро появляется сине-фиолетовое или фиолетовое окрашивание. Пробирку с белком нагревать надо до появления красновато-фиолетового окрашивания; Пролин (или 4-гидроксипролин) с нингидрином дает желтое окрашивание.

Ксантопротеиновая реакция на ароматическое кольцо аминокислот

Принцип метода. Реакция основана на способности аминокислот и аминокислотных остатков полипептидов, содержащих ароматическое кольцо, образовывать при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой динитропроизводные желтого цвета. В щелочной среде они переходят в хиноидные структуры, имеющие оранжевое окрашивание. Ксантопротеиновая реакция характерна для фенилаланина, тирозина, триптофана. Например, в реакции с тирозином образуется динитротирозин; добавление раствора NaOH приводит к образованию натриевой соли хиноидной структуры динитротирозина:



Реактивы: 3% раствор фенола; концентрированная HNO_3; яичный белок; 10% раствор NaOH.

Ход работы. К 1 мл раствора фенола аккуратно (по стенке пробирки) приливают 2-3 капли концентрированной HNO_3 и осторожно нагревают. Появляется желтое окрашивание. В другую пробирку наливают 1 мл яичного белка, прибавляют 2-3 мл концентрированной HNO_3 и аккуратно нагревают. Выпадает осадок, который при нагревании желтеет. После охлаждения в пробирки аккуратно (по стенке) приливают 10% раствор NaOH до появления оранжевого или желто-оранжевого окрашивания. Реакцию следует проводить под тягой!

Реакция Шульца-Распайля на триптофан

Принцип метода. Фруктоза в присутствии концентрированной H_2SO_4 теряет три молекулы воды и превращается в оксиметилфурфурол, который образует с триптофаном окрашенные продукты конденсации. Реакцию можно проводить как с фруктозой, так и с сахарозой при гидролитическом расщеплении которой образуются равные количества фруктозы и глюкозы.

Реактивы: 4% раствор белка; 5% раствор сахарозы; концентрированная H_2SO_4.

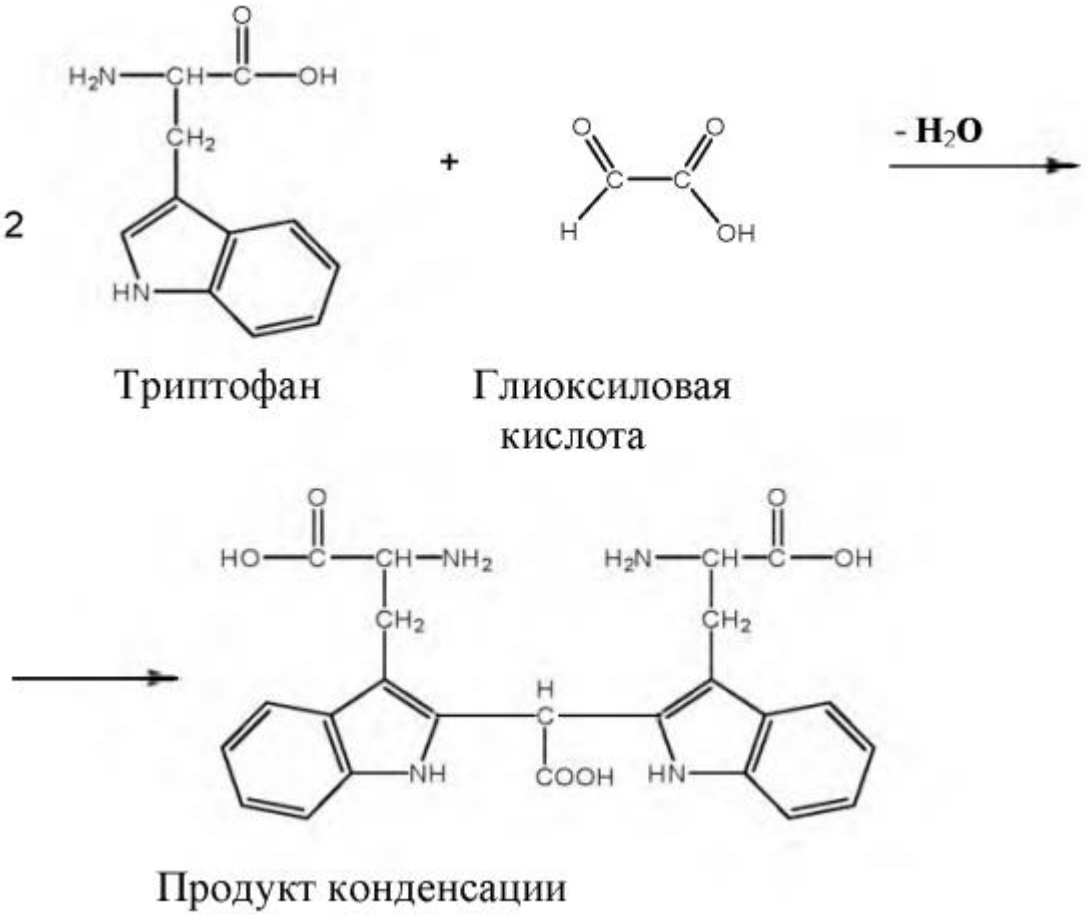
Ход работы. К 1-2 мл раствора белка добавляют 6 капель раствора сахарозы и по стенкам пробирки осторожно наслаивают 1 мл концентрированной H_2SO_4. На границе раздела жидкостей появляется кольцо темно-красного цвета.

Реакция Адамкевича на триптофан

Принцип метода. При нагревании триптофан взаимодействует с глиоксиловой кислотой с образованием соединения, окрашенного в

красно-фиолетовый цвет.

Для проведения реакции используют ледяную CH_3COOH, в которой как примесь содержится глиоксиловая кислота. В качестве водоотнимающего средства используется концентрированная H_2SO_4.



Реактивы: неразбавленный яичный белок; ледяная CH_3COOH; концентрированная H_2SO_4.

Ход работы. В пробирку с двумя каплями свежего неразбавленного яичного белка добавляют 10 капель ледяной CH_3COOH и осторожно нагревают до растворения выпавшего осадка, после чего содержимое пробирки охлаждают. Очень аккуратно по стенке, наклонив пробирку, подслаивают (следя чтобы жидкости не смешивались) концентрированную H_2SO_4. На границе двух слоев возникает характерное окрашенное кольцо.

Реакция Сакагучи на аргинин

Принцип метод. Аргинин, содержащий гуанидиновую группировку, окисляется гипобромитом. Окисленная форма аргинина при взаимодействии с а -нафтолом образует соединение розово-красного цвета.

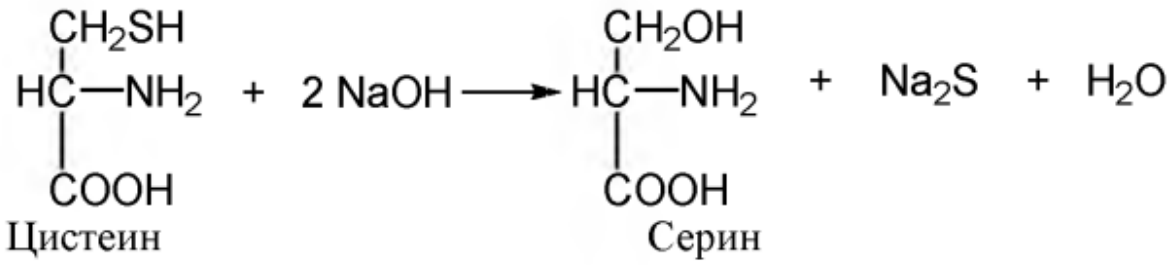
Реактивы: 4% раствор белка; 10% раствор NaOH; спиртовой раствор а-нафтола; 2% раствор гипобромита натрия.

Ход работы. В пробирке к 1 мл раствора белка прибавляют 2-3 капли раствора NaOH, 1—2 капли спиртового раствора а -нафтола и хорошо перемешивают, затем добавляют 3—5 капель раствора гипобромита натрия. Появляется розово-красное окрашивание.

Реакция Фоля на серосодержащие аминокислоты

Принцип метода. В молекулах цистеина и цистина сера связана относительно слабо и при щелочном гидролизе легко отщепляется в виде сероводорода, который реагирует со щелочью, образуя сульфид натрия (калия). Сульфид натрия взаимодействует с ацетатом свинца с

образованием осадка черного или буро-черного цвета сульфида свинца.



$$(CH_3COO)_2Pb + 2NaOH + 2H_2O = Na_2PbO_2 + 2CH_3COOH,$$

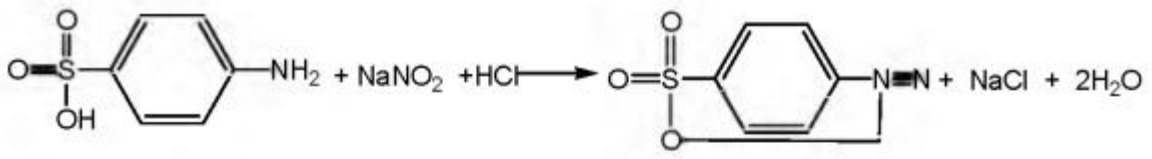
$$Na_2S + Pb(ONa)_2 + 2H_2O = PbS\downarrow + 4NaOH.$$

Реактивы: яичный белок, 2% раствор желатина; 10% раствор NaOH; 10% раствор ацетата свинца.

Ход работы. В одну пробирку наливают 2 мл раствора яичного белка, в другую — столько же раствора желатина. В обе пробирки добавляют 1-1,5 мл раствора NaOH, осторожно нагревают их до кипения и кипятят 1-2 мин. После чего в каждую пробирку прибавляют по 2-3 капли раствора ацетата свинца. В пробирке с яичным белком появляется буровато-черное или черное окрашивание, интенсивность которого зависит от концентрации раствора белка и содержания в нем цистеина. Раствор желатина окрашивания не дает. Это свидетельствует о том, что в состав этого белка не входят серосодержащие аминокислоты.

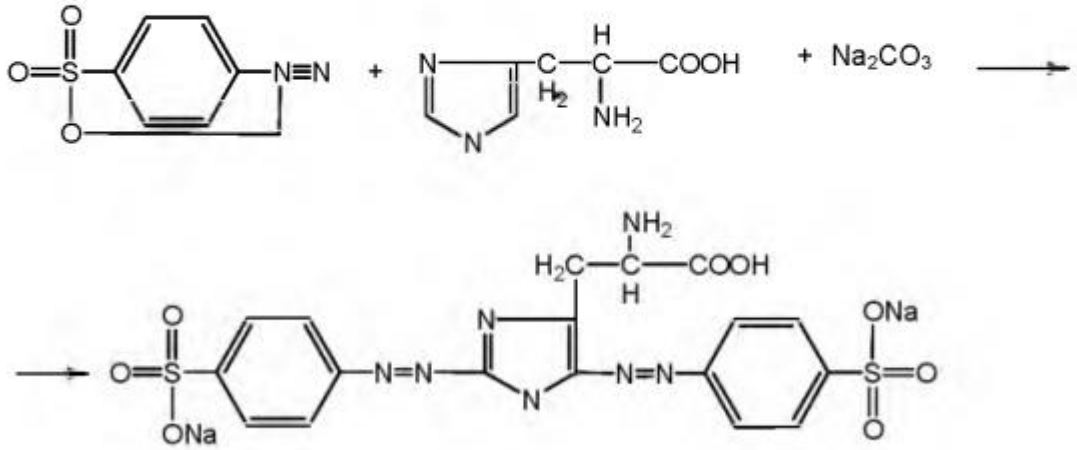
Реакция Паули на гистидин и тирозин

Принцип метода. При взаимодействии сульфаниловой кислоты в присутствии нитрита натрия (калия) проходит реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоновая кислота, которая в реакции с гистидином или тирозином образует комплексное соединение вишневого цвета (азокраситель):



Сульфаниловая кислота

Диазобензойная кислота



Азокраситель

Реактивы: 1% раствор сульфаниловой кислоты, приготовленный в 2% растворе HCl; 5% раствор $NaNO_2$; 0,01% раствор гистидина; 10% раствор Na_2CO_3; 4% раствор белка.

Ход работы. В двух пробирках перемешивают 3 капли сульфаниловой кислоты и 3 капли раствора $NaNO_2$. К полученному диазореактиву добавляют: в одну пробирку 5 капель раствора белка, в другую - 5 капель раствора гистидина, тщательно перемешивают. В каждую пробирку добавляют 3-5 капель раствора Na_2CO_3. Жидкость окрашивается в вишнево-красный цвет.

2.2 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Высаливание белков. Белки как высокомолекулярные вещества образуют коллоидные растворы. Растворимость белков в воде определяется наличием гидрофильных групп (несущих заряд или незаряженных) в аминокислотах, входящих в состав белка. Также имеет значение наличие у молекул одноименного суммарного заряда и форма молекул (отношение их длинной и короткой осей). Воздействия, влияющие на гидратацию, заряд или форму белковых молекул, изменяют и ее растворимость.

Принцип метода. Высаливание — обратимая реакция осаждения белков из растворов с помощью концентрированных растворов солей: NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$.

При высаливании происходит дегидратация макромолекул белка и устранение их заряда. На процесс высаливания влияет гидрофильность, относительная молекулярная масса и заряд белка, поэтому для высаливания различных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей. Альбумины осаждаются в насыщенном растворе $(NH_4)_2SO_4$, а глобулины — в полунасыщенном $(NH_4)_2SO_4$, так как относительная молекулярная масса глобулинов больше, чем альбуминов.

Высаливание белков является обратимой реакцией, так как осадок белка может вновь растворяться после уменьшения концентрации солей путем диализа или разведения водой.

Реактивы: яичный белок; вода дистиллированная; насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$; кристаллический $(NH_4)_2SO_4$; концентрированный HNO_3; NaCl, изм.

Ход работы: к 0,5 мл неразбавленного яичного белка прибавляют 2,5 мл воды. При этом образуется небольшое количество белого хлопьевидного осадка глобулинов. В пробирку наливают несколько капель насыщенного раствора $(NH_4)_2SO_4$, после чего происходит растворение выпавшего глобулина. К 3 мл данного раствора яичного

белка, содержащего альбумины и глобулины, прибавляют равный объем насыщенного раствора $(NH_4)_2SO_4$, выпадает осадок глобулинов, который удаляется фильтрованием. К фильтрату добавляют кристаллический $(NH_4)_2SO_4$ до полного насыщения. При этом выпадает осадок альбуминов. Он также отфильтровывается. С фильтратом следует проделать пробу на полноту осаждения белка с помощью конц. HNO_3.

Обратимость высаливания. К 2 мл раствора белка приливают 2 мл насыщенного раствора $(NH_4)_2SO_4$, выпадает осадок, который растворяется при последующем прибавлении воды.

Осаждение хлористым натрием и сернокислым магнием. В две пробирки наливают приблизительно по 3 мл белка. Прибавляют до полного насыщения в одну пробирку только измельченный хлористый натрий, в другую - сернокислый магний. Через несколько минут в обеих пробирках появляется осадок глобулинов. Содержимое пробирок отфильтровывают. В фильтратах остаются альбумины, которые в нейтральных растворах не выпадают в осадок даже при полном насыщении NaCl и $MgCl_2$. К фильтрату прибавляют несколько капель разведенной уксусной кислоты; в слабокислой среде выпадают альбумины. Через несколько минут альбумины отфильтровывают. Проверяют фильтрат на отсутствие белка при помощи биуретовой реакции.

Осаждение белков

Денатурация белков (необратимое осаждение) сводится к разрушению структуры белка и потере им биологических свойств. При необратимых реакциях осаждения белки претерпевают глубокие изменения и не могут быть растворены в первоначальном растворителе. К необратимым реакциям относятся осаждение белка солями тяжелых металлов, минеральными и органическими кислотами, алкалоидными реактивами и осаждение при кипячении.

Осаждение белков спиртом, ацетоном

Реактивы: 1) белок, 4% р-р; 2) NaCl, порошок; 3) спирт этиловый; 4) ацетон.

Принцип метода: Многие органические растворители осаждают белки из нейтрального или слабокислого раствора. Если к водному раствору белка прибавить, например, этиловый спирт, то можно достигнуть такой концентрации его (неодинакова для различных белков), когда происходит осаждение белка. Механизм действия спирта объясняют связыванием воды, что ведет к дегидратации мицелл белка и понижению их устойчивости в растворе. Если при этом присутствует небольшое количество солей (например, NaCl), то осадок образуется полнее и быстрее. Ионы солей связываются коллоидными частицами белка и нейтрализуют их заряд. Это обстоятельство еще более снижает устойчивость раствора белка. Если осаждение проводить на холоду и полученный осадок быстро отделить от спирта, то белок может быть снова растворен в воде, т.е. свойства его в этом случае не изменяются, денатурация не успевает произойти и осаждение обратимо. При стоянии со спиртом белок денатурирует и становится нерастворимым в первоначальном растворителе.

Ход работы: а) Приливают в пробирку 1-2 мл раствора белка, прибавляют щепотку сухого NaCl и взбалтывают. В пробирку постепенно приливают несколько мл этилового спирта и сильно взбалтывают. Через несколько минут выпадает мелкий осадок белка.

б) В пробирку наливают 1 мл раствора белка, по стенке осторожно добавляют 0,5 мл ацетона, на границе соприкосновения обеих жидкостей появляется белое кольцо денатурированного белка.

Осаждение белков солями тяжелых металлов

Реактивы: 1) белок, 4% р-р; 2) ацетат свинца, 5% р-р; 3) сульфат меди, 1% р-р; 4) нитрат серебра. 5% р-р.

Принцип метода: Белки легко осаждаются солями металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.), образуя с ними прочные

солеобразные и комплексные соединения. В отличие от высаливания солями щелочных и щелочноземельных металлов для осаждения солями тяжелых металлов требуются небольшие концентрации последних. В случае применения уксуснокислого свинца и $CuSO_4$ избыток солей вызывает растворение образованного ими осадка. Такое растворение вызывается адсорбцией избытка ионов металла и перезарядкой белкового комплекса, вследствие чего в раствор переходит комплекс измененного белка с металлом. Благодаря тому же механизму добавление достаточного количества хлористого натрия вызывает растворение ртутного соединения белка. Белковые осадки, полученные действием солей тяжелых металлов, однако, нерастворимы в первоначальном растворителе, т.е. в воде или слабых растворах солей.

Таким образом, осаждение белков солями тяжелых металлов следует отнести к необратимым реакциям осаждения, связанным с денатурацией белка. Осадки от солей тяжелых металлов, как правило, нерастворимы даже после удаления солей диализом или растворения водой. Свойством белков связывать тяжелые металлы пользуются в медицинской практике, употребляя белки (молоко, яйца) как противоядие при отравлении солями ртути (сулема), свинца (от недоброкачественной посуды) или меди (от окисления медной посуды), пока эти соли не успели всосаться. Реакции осаждения белков солями тяжелых металлов идут обычно полно (особенно в присутствии щелочных металлов), и ими пользуются не только для выделения белков из раствора, но и для освобождения жидкостей от белков.

Ход работы: В 3 пробирки наливают по 1-2 мл раствора белка. Прибавляют по каплям в первую пробирку раствор уксуснокислого свинца, во вторую - раствор сернокислой меди, в третью - раствор азотнокислого серебра. Наблюдают образование осадков во всех пробирках. В пробирки с осадками от уксуснокислого свинца и сернокислой меди добавляют избыток этих солей. Наблюдается растворение осадков.

Осаждение белков минеральными кислотами

Реактивы: 1) HCl, конц.; 2) H_2SO_4, конц.; 3) HNO_3, конц.; 4) белок, раствор для осаждения.

Принцип метода: Концентрированные минеральные кислоты вызывают необратимое осаждение белков из растворов. Это осаждение объясняется как явлением дегидратации белковых частиц, так и рядом других причин (например, образование комплексных солей белка с кислотами и др.). Избыток минеральной кислоты, за исключением азотной, растворяет выпавший осадок белка.

Ход работы: в три пробирки осторожно наливают приблизительно по 1 мл кислот: в 1-ю соляной, во 2-ю - серной, в 3-ю - азотной. Осторожно вносят во все пробирки приблизительно по 1 мл раствора белка. На границе двух жидкостей наблюдается появление осадка белка в виде небольшого белого кольца. Осторожно встряхивают каждую пробирку. Происходит растворение осадков в избытке соляной и серной кислот. В пробирке с азотной кислотой осадок при встряхивании не исчезает, т.к. в избытке азотной кислоты он не растворяется.

Осаждение белков алкалоидными реактивами

Реактивы: 1) белок, раствор для осаждения; 2) уксусная кислота, 1% р-р; 3) таннин, насыщ. р-р; 4) железосинеродистый калий, 5% р-р.

Принцип метода: Растворы белков могут образовывать осадки при добавлении так называемых алкалоидных реактивов. К последним относятся таннин, пикриновая кислота, некоторые другие вещества. Эта способность белков к осаждению алкалоидными реактивами объясняется наличием сходных азотистых группировок как в белках, так и в алкалоидах. Механизм осаждения алкалоидными реактивами заключается в образовании нерастворимых солеобразных соединений с азотистыми основными группами. В этом соединении белок является катионом, алкалоидный реактив - анионом. Вследствие этого осаждение белков алкалоидными реактивами необходимо проводить в

кислой среде (частицы белка перезаряжаются и переходят в состояние катионов). В щелочной среде осадки растворяются. Протамины и гистоны осаждаются в нейтральной среде.

Ход работы: В 3 пробирки наливают по 1-2 мл раствора белка и подкисляют их 2-3 каплями 1% р- ра СН3СООН. В одну пробирку приливают 2-3 капли раствора таннина, в другую добавляют 2-3 капли раствора железосинеродистого калия. Взбалтывают после добавления каждой капли. Белок выпадает в осадок.

Осаждение белков органическими кислотами

Реактивы: 1) белок, раствор для осаждения; 2) ТХУ, 10% р-р; 3) сульфосалициловая кислота, 20%.

Принцип метода: Белки из растворов могут осаждаться органическими кислотами. Однако разные органические кислоты неодинаково действуют на белок. ТХУ, сульфосалициловая кислота являются очень чувствительными и специфическими реактивами на белок, широко применяются с этой целью. Осаждение белков с помощью трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в конечной концентрации 2,5-5% часто применяется для полного удаления белка из биологических жидкостей (например, из сыворотки крови), т.к. ТХУ осаждает только белки, а продукты их распада остаются при этом в растворе. Это особенно важно, когда нужно определить отдельно содержание азота белка и азота более низкомолекулярных продуктов: аминокислот, мочевины и др. - так называемый "небелковый азот". В этом случае, если после осаждения белков требуется из фильтрата удалить ТХУ, то это достигается его кипячением, в результате чего ТХУ разлагается на хлороформ и угольный ангидрид, которые улетучиваются.

Ход работы: В пробирку наливают 1-2 мл раствора белка и добавляют несколько капель раствора ТХУ. Наблюдают выпадение белка в осадок. В другую пробирку наливают 1-2 мл раствора белка и добавляют несколько капель раствора сульфосалициловой кислоты. Наблюдают выпадение осадка белка.

Осаждение белков при нагревании

Реактивы: 1) белок, раствор для осаждения; 2) уксусная кислота, 1% р-р; 3) уксусная кислота, 10% р-р; 4) хлорид натрия, насыщ. р-р; 5) NaOH, 10% р-р.

Принцип метода: почти все белки свертываются при нагревании. Температура свертывания различна для разных белков, и если одни белки коагулируют уже при 50-550С, то некоторые из них выдерживают даже продолжительное кипячение. При свертывании белки денатурируют и переходят в нерастворимое состояние.

Механизм тепловой денатурации связан с перестройкой структуры белковой молекулы, в результате чего белок теряет свои нативные свойства и растворимость. Реакция денатурации протекает постепенно и ускоряется с повышением температуры, поэтому слишком кратковременное нагревание может и не привести к свертыванию. Присутствие солей и концентрация водородных ионов играют важную роль в свертывании белков при нагревании. Наиболее полная и быстрая коагуляция имеет место в изоэлектрической точке, т.е. при таком pH, когда коллоидные частицы белка теряют свой электрический заряд и становятся наименее устойчивыми в растворе. Для большинства белков изоэлектрическая точка соответствует слабокислой реакции (pH около 5). В сильно кислых растворах мицеллы перезаряжаются и несут положительный заряд, что повышает их устойчивость. Подобно этому в щелочных растворах стабильность белкового коллоида обусловлена отрицательным зарядом частицы. Поэтому в сильнокислых растворах белки при нагревании могут коагулировать лишь при добавлении достаточного количества какой-либо нейтральной соли.

Ход работы: наливают в 5 пробирок приблизительно по 2 мл раствора белка. Нагревают содержимое первой пробирки. Образуется осадок белка. Добавляют во вторую пробирку каплю 1% CH_3COOH и нагревают. Осадок выпадает скорее и полнее вследствие того, что белок находится в изоэлектрической точке. Добавляют в третью пробирку около 0,5 мл 10% CH_3COOH и нагревают, осадка белка не

образуется даже при кипячении. Добавляют в четвертую пробирку около 0,5 мл 10% CH_3COOH, несколько капель насыщенного раствора хлористого натрия и нагревают. Образуется осадок белка. Добавляют в пятую пробирку около 0,5 мл раствора NaOH и нагревают. Осадок не образуется даже при кипячении.

Определение изоэлектрической точки

Реактивы: 1) желатин, 1% р-р; 2) 0,2 М раствор Na_2HPO_4; 3) 0,1 М раствор лимонной кислоты; 4) этанол.

Принцип метода: Белки следует рассматривать как вещества, содержащие большое количество кислотных и основных групп. Кислотные группы белка происходят главным образом за счет карбоксильных групп дикарбоновых кислот. Кислую реакцию дают также фенольные, гидроксильные и сульфгидрильные группы. Щелочные, или основные, группы белка обязан аминнным, гуанидиновым и имидным группам аминокислот. На кислотно-щелочные свойства белка влияет также характер соединения остатков концевых аминокислот в белковой молекуле. Обладая одновременно кислотными и основными свойствами, белки образуют биполярные ионы.

В щелочных растворах белок играет роль аниона. При потере протона из группы $-NH_3$, например, при действии NaOH, образуется натриевая соль белка (протеинат натрия).

В кислых растворах, наоборот, белок играет роль катиона, например, с соляной кислотой получается хлористоводородная соль (протеинхлорид).

Таким образом, фактором, определяющим поведение белка как аниона или катиона, является концентрация водородных ионов. Ее повышение (кислая среда) уменьшает кислотную диссоциацию белка и переводит его в катион, понижение концентрации водородных ионов, наоборот, подавляет щелочную диссоциацию и переводит белковые частицы в анионы. Однако при определенном значении pH

(неодинаковым для различных белков) кислотная диссоциация белковой части становится равной щелочной - число положительных зарядов амфотерного иона белка сравнивается с числом отрицательных зарядов и заряд в целом может стать близким или практически равным нулю. В этих условиях белок находится в изоэлектрическом состоянии и в электрическом поле не будет обнаруживать передвижение ни к катоду, ни к аноду. pH раствора, при которой белок находится в изоэлектрическом состоянии, называется изоэлектрической точкой белка. В этой точке белок находится почти целиком в виде амфотерных ионов, несущих равные положительный и отрицательный заряды, тогда как при других концентрациях водородных ионов у белка имеется преимущественно положительный или отрицательный заряд. Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы. В этом случае отталкивание одноименно заряженных частиц, повышающее устойчивость раствора, прекращается и в качестве стабилизирующего фактора действует лишь гидратная (водная) оболочка белка. Для большинства белков изоэлектрическая точка близка к нейтральной среде, но немного сдвинута в кислую сторону. Это объясняется тем, что кислотные свойства у них преобладают над щелочными и в нейтральной среде они реагируют как слабые кислоты. Молекула таких белков содержит больше свободных карбоксильных групп, чем амидных, а при гидролизе дает преобладание дикарбоновых и других кисло-реагирующих групп над теми, у которых преобладают основные свойства. Некоторые белки, наоборот, относительно богаче аминными группами и в своем составе содержат больше остатков диаминокислот. В нейтральном растворе они ведут себя как слабые основания. Такие белки (например, гистоны и протамины) имеют изоэлектрическую точку при слабощелочной среде реакции.

Определение изоэлектрической точки удобно произвести на примере желатина.

Ход работы: В 6 пробирок наливают 0,2 М р-р двузамещенного фосфорнокислого натрия и 0,1 М р-р лимонной кислоты в количествах, указанных в таблице. В каждую пробирку к 1 мл заготовленной буферной смеси приливают по 0,5 мл 1% р-ра желатина, перемешивают

и добавляют по 2 мл этилового спирта. Содержимое пробирок вновь перемешивают и оставляют на 5 мин. Через 5 минут отмечают, в какой пробирке и при таком pH произошло наибольшее помутнение раствора. Отсутствие мути отмечают знаком минус (-), наличие и степень мутности - одним или двумя знаками плюс (+). Результаты фиксируют в виде таблицы.

Таблица 2.

№	Na_2HPO_4 (0,2 М), мл	Лимонная кислота (0,1 М), мл	pH смеси	Желатин (1% р-р), мл	спирт этиловый, мл	степень мутности
1.	0,13	0,37	3,2	0,25	1	
2.	0,17	0,33	3,7	0,25	1	
3.	0,21	0,29	4,2	0,25	1	
4.	0,24	0,26	4,7	0,25	1	
5.	0,27	0,23	5,2	0,25	1	
6.	0,33	0,17	5,7	0,25	1	

2.3. ОЧИСТКА И РАЗДЕЛЕНИЕ СМЕСЕЙ БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ

Диализ белка

Диализом называется процесс разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ с помощью полупроницаемых мембран (коллодий, целлофан, пергамент и др.). Обладая большим диаметром, белковые молекулы не способны проникать через такие мембраны, в то время как частицы низкомолекулярных веществ легко проходят через них.

Реактивы: 1) альбумин, 3% р-р; 2) $(NH_4)_2SO_4$, насыщенный р-р; 3) $BaCl_2$, 5% р-р; $CuSO_4$; 4) биуретовый реактив; 5) реактив Несслера; 6) 1% NH_4OH.

Ход работы:

1. В пробирку наливают 2 мл р-ра альбумина и прибавляют к раствору 1 каплю насыщенного р-ра сульфата аммония. Из листа целлофана, намоченного водой, делают мешочек (диализатор) и выливают в него содержимое пробирки. Края мешочка зажимают между двумя стеклянными палочками, прижатыми друг к другу резиновыми колечками, надетыми на концы палочек. Мешочек помещают в стакан с дистиллированной водой, укладывают палочки на края стакана. Уровень жидкости в мешочке должен быть ниже жидкости в стакане.

2. Через 1 час от начала диализа берут в 2 пробирки по 1 мл жидкости из стакана и проводят следующие определения:

а) на присутствие SO_4: добавляют в первую пробирку 3-4 капли 5% р-ра $BaCl_2$ и наблюдают образование осадка $BaSO_4$ в виде белой мути.

б) на присутствие белка: проделывают биуретовую реакцию.

в) на присутствие аммиачного азота: добавить несколько капель реактива Несслера. При наличии аммиачного азота проявится желтое окрашивание. Для контроля проделать такую же реакцию с раствором NH4OH. Реактив Несслера состоит из двойной соли йодистой ртути и йодистого калия (Hgl2, KI), растворенной в растворе КОН. Аммиак с реактивом Несслера дает соединение - йодистый меркураммоний, которое при малых количествах аммиака в растворе окрашивает его в желтый цвет, при значительных - в красно-желтый.

$$NH_3 + 2\,(HgI_2 \times HI) + 3\,KOH \rightarrow NH_2HgIO_3 + 7\,KI = 2\,H_2O$$

3. Жидкость из мешочка (диализат) сливают в пробирку, отмеряют 10 капель диализата и с ним тоже проделывают биуретовую реакцию.

Обессоливание белкового раствора методом гель-фильтрации

Низкомолекулярные вещества из белкового раствора можно достаточно быстро и полно уловить с помощью гель-фильтрации.

Хроматографическую колонку наполняют гелем, набухшим в воде или буферном растворе. Разделение веществ этим методом основано на различии в размерах молекул. Крупные молекулы не проникают в поры гранул геля и выходят из колонки в первую очередь, в то время как небольшие молекулы попадают через поры гранулы, вследствие чего задерживаются на колонке и движутся с меньшей скоростью. Метод гель-фильтрации часто называют разделением веществ по принцип молекулярного сита.

Свойствами молекулярного сита обладают многие пористые материалы. Наиболее часто для этих целей применяют органические полимеры с трехмерной структурой. Например, гели полисахарида декстрана (коммерческое название сефадексы). Существует несколько типов сефадексов, различающихся как размерами, так и количеством пор и величиной гранул. Это позволяет применять их для разделения веществ с разными размерами молекул. Благодаря высокому содержанию гидроксильных групп гранулы сефадекса легко набухают, образуя гель. Чем выше способность геля к набуханию, тем больше номер сефадекса. Для освобождения белковых растворов от солей обычно используют сефадекс марки G-25.

Реактивы: 1) р-р белка; 2) K_2CrO_4, 5% р-р; 3) биуретовый реактив.

Нанесение раствора белка. Перед нанесением раствора открывают кран на колонке и наблюдают за уменьшением столбика воды над слоем сефадекса. Как только над поверхностью геля остается слой жидкости толщиной 1-2 мм, кран закрывают и пипеткой аккуратно наносят на гель 1 мл белкового раствора, в который предварительно добавляют раствор K_2CrO_4. Кран открывают и следят за проникновением раствора в гель. Снова закрывают кран, стенки колонки ополаскивают 1 мл дистиллированной воды, открывают кран и позволяют жидкости впитаться в гель. Затем кран закрывают, и, стараясь не взмучивать гель, аккуратно добавляют пипеткой по стенке 4-6 мл дистиллированной воды.

Сбор фракций. В 12 пробирок отмеряют по 1 мл биуретового реактива. К колонке приливают воду и открывают кран. Собирают по

10 капель в пробирки, содержащие биуретовый реактив. Наблюдают изменение окраски в порциях элюата, содержащего белок.

Выход хромата калия отмечают по появлению желтого окрашивания раствора в очередной пробирке.

Гель в колонке отмывают водой до полного удаления хромата калия. После этого колонка вновь готова к употреблению.

Оформление работы: описывают принцип метода, результаты опыта заносят в таблицу:

Таблица 3.

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Белок												
K_2CrO_4												

Отсутствие окраски обозначают знаком "-", появление окраски - знаком "+", несколько знаков "+" указывают на значительную интенсивность окраски. Выводы, полученные из результатов опыта, также заносят в протокол.

Распределительная хроматография аминокислот на бумаге

Этот метод широко используется для разделения смеси аминокислот, для качественного обнаружения отдельных аминокислот. Достоинством этого метода является то, что он позволяет исследовать ничтожное количество вещества.

Разделение аминокислот основано на их различной растворимости в нескольких несмешивающихся жидкостях (фазах). Одной из жидкостей служит вода, которая прочно ассоциируется с молекулами целлюлозы и образует неподвижную фазу. Менее полярные водонасыщенные органические растворители (изобутиловый, изопропиловый, бутиловый спирт, фенол и др.) составляют подвижную фазу. Подвижный органический растворитель поднимается по полоске бумаги, растворяет нанесенные на бумагу аминокислоты и увлекает их за собой. Скорость перемещения

аминокислот на бумаге зависит от степени их растворимости в подвижных и неподвижных фазах. Чем больше растворимость аминокислот в водной фазе и чем меньше ее растворимость в неводной фазе, тем медленнее движется аминокислота по сравнению с фронтом органического растворителя. Иными словами, аминокислоты с объемными неполярными боковыми цепями (гли, лей, изолей, фен, трп, вал, мет, тир), перемещаются быстрее, чем аминокислоты с более короткими боковыми цепями (про, ала, гли) или с полярными боковыми цепями (тре, глу, сер, арг, асп, гис, лис, цис).

Положение отдельных аминокислот на хроматографической бумаге обнаруживают при помощи цветной реакции с нингидрином.

Идентификация отдельных аминокислот на хроматограмме проводят путем нанесения на ту же хроматограмму "свидетелей" - растворов отдельных аминокислот. Можно также идентифицировать аминокислоты по величине R_f, равной отношению пути, пройденного аминокислотой (от места нанесения) (а) к расстоянию, пройденному растворителем (от места смеси аминокислот до фронта растворителя) (в)

$$R_f = \frac{a}{в}$$

Коэффициент R_f - величина, характерная для каждой аминокислоты и постоянная при данных условиях опыта (растворитель, температура, сорт бумаги).

Возможны разные варианты хроматографии на бумаге: нисходящая, восходящая, радиальная.

Ход работы:

1. Квадрат хроматографической фильтровальной бумаги размером 11 х 11 см делят диагоналями на 4 части. В центре пересечения диагоналей описывается окружность радиусом 10 мм, стороны квадрата нумеруют. На середину каждой их четырех дуг, ограниченных диагоналями, наносят микропипеткой пятнышко (2-3

мм в диаметре) из аминокислот "свидетелей" и анализируемую смесь аминокислот.

2. В центре квадрата иглой проделывают отверстие и в него вставляют фитиль, скатанный из небольшого треугольника фильтровальной бумаги в виде трубочки.

3. На дно чашки петри наливают 10-15 мл смеси растворителей (бутанол, уксусная кислота, вода) так, чтобы было покрыто дно чашки. Квадрат помещают на чашку Петри так, чтобы он лежал на ее краях. Фитилек должен касаться дна чашки Петри. Чашку Петри накрывают крышкой и оставляют при комнатной температуре. По фитильку растворитель поднимается вверх, распределяется по бумаге от центра к периферии листа. Когда фронт растворителя дойдет до краев чашки Петри (через 1 час), хроматограмму снимают, отмечают карандашом фронт растворителя, помещают ее на крышку чашки Петри и ставят в сушильный шкаф при температуре 100-130 ^{0}С на 5 минут (до исчезновения запаха растворителя). Высушенную хроматограмму проявляют 0,2% раствором нингидрина в ацетоне и вновь помещают в сушильный шкаф. Через несколько минут на хроматограмме появляются пятна, указывающие положение аминокислот.

4. Для каждой аминокислоты рассчитывают коэффициент распределения R_f. Аминокислоты анализируемой смеси идентифицируют, сравнивая их с R_f аминокислоты - свидетеля.

Оформление работы: Принцип метода бумажной хроматографии коротко записывают в протоколе. Полученную хроматограмму вклеивают в тетрадь, после расчета аминокислот смеси и свидетелей на хроматограмму наносят названия аминокислот смеси.

2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА БИУРЕТОВЫМ МЕТОДОМ

Реактивы: 1) белок, 0,25% р-р; 2) биуретовый реактив; 3) белок, раствор неизвестной концентрации.

Принцип метода: при взаимодействии белков в щелочной среде с

сернокислой медью развивается фиолетовое окрашивание вследствие образования комплексной медно-нартиевой соли белка.

Построение калибровочного графика

Ход работы: для построения калибровочного графика в качестве стандартного раствора белка используют 0,25% раствор альбумина. Пробы после составления тщательно перемешивают и оставляют на 30 минут при комнатной температуре. Их фотометрируют на ФЭКе в кюветах шириной 1 см против контрольной пробы. Светофильтр зеленый (λ=495-565 нм). Строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс содержание белка в пробе (мг), на оси ординат - экстинкцию соответствующей пробы.

Таблица 4.

Состав пробы	Контроль	Калибровка				Опыт
	1	2	3	4	5	6, 7
Вода, мл	3	2,5	2,0	1,5	1,0	-
0,25% р-р белка, мл	-	0,5	1,0	1,5	2,0	-
Раствор белка неизвестной концентрации, мл	-	-	-	-	-	3,0
Биуретовый реактив, мл	2	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Содержание белка в пробе, мг	-	1,25	2,5	3,75	5,0	
Экстинкция (λ=495-565 нм)	0					

Определение количества белка в растворе с неизвестной концентрацией

Ход работы: для определения берут 2 параллельные пробы белка с неизвестной концентрацией (по 3 мл) и контрольную пробу (3 мл воды). Добавляют в каждую по 2 мл биуретового реактива и дальше поступают как при построении калибровочной кривой. Расчет белка ведут по калибровочной кривой.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ «БЕЛК»

1. Строение аминокислот, номенклатура, изомерия.

2. Физико-химические свойства аминокислот: амфотерность, растворимость, стереохимия.

3. Тип связи аминокислот в белках и пептидах. Характеристика пептидной связи.

4. Уровни организации белковой молекулы (первичная, вторичная, третичная и четвертичная структура белков).

5. Классификация белков. Характеристика простых и сложных белков.

6. Характеристика физико-химических свойств белков и методы их исследования (растворимость, денатурация, амфотерность белков, заряд белковой молекулы, диализ, электрофорез, изоэлектрическое состояние и изоэлектрическая точка белков).

7. Принципы методов обнаружения аминокислот в растворах (нингидриновая, ксантопротеиновая и др. реакции).

8. Если с раствором одного белка реакции Миллона и ксантопротеиновая положительные, а с раствором другого — отрицательные, то что можно сказать о различиях аминокислотного состава этих белков?

9. Как с помощью цветных реакций обнаружить в белке: 1) аргинин; 2) цистеин?

10. При помощи каких цветных реакций можно установить различия аминокислотного состава альбумина и желатина?

11. На какой реакции основано количественное определение белка биуретовым методом?

12. Какими методами можно освободить раствор белка от низкомолекулярных веществ?

13. Как доказать, что при диализе белок остается в диализном мешке, а ионы соли находится в

диализирующей жидкости?

14. Почему при обессоливании белкового раствора методом гель-фильтрации белок выходит с колонки в меньшем объеме, чем ионы соли? Как это обнаружить?

15. Что такое денатурация белка? Какие физические и химические факторы вызывают денатурацию белка?

16. Почему белки при нагревании в изоэлектрической точке быстро выпадают в осадок и не выпадают при нагревании в сильно кислой или сильнощелочной среде?

Лабораторная работа № 3. ФЕРМЕНТЫ

Цель работы: освоить ферментативный гидролиз крахмала, кислотный гидролиз крахмала; изучить специфичность ферментов, влияние pH на активность амилазы слюны, влияние активаторов и ингибиторов на амилазу слюны, влияние температуры на скорость ферментативного катализа.

ТЕОРИТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Функции ферментов сводятся к ускорению химических реакций, причем, ферменты отличаются рядом уникальных свойств. Во-первых, это самые эффективные из известных катализаторов. Большинство реакций в клетке протекает примерно в миллион и более раз быстрее, чем если бы они протекали в отсутствии ферментов. Во-вторых, большинство ферментов отличается специфичностью действия. В-третьих, действие большинства ферментов регулируется. Механизмы регуляции представляют сложную систему, посредством которой организм контролирует все свои функции.

Активность ферментов в очень сильной степени зависит от внешних условий, среди которых первостепенное значение имеют температура и pH среды.

Активность ферментов подвержена значительным колебаниям в зависимости от воздействия ингибиторов (веществ, снижающих активность) и активаторов (веществ, увеличивающих активность), роль которых могут выполнять катионы металлов, некоторые ионы, переносчики фосфатных групп, промежуточные и конечные продукты метаболизма и т.п.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

3.1. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА.

Реактивы: 1) I2 (р-р Люголя); 2) крахмал, 0,5% р-р; 3) разбавленная слюна; 4) NaOH, 5% р-р; 5) сульфат меди, 5% р-р; 6) реактив Фелинга.

Для получения амилазы рот ополаскивают 2-3 раза дистиллированной водой для удаления остатков пищи, отмеряют цилиндром 30 мл дистиллированной воды и снова ополаскивают ею рот в течение 3-5 минут в несколько приемов. Собирают жидкость в стаканчик, фильтруют через вату, и фильтрат используют в качестве источника фермента - амилазы. Амилаза катализирует гидролиз а-гликозидной связи крахмала и гликогена (а, 1, 4) до промежуточных продуктов, называемых декстринами. В процессе ферментативного гидролиза крахмала увеличивается количество свободных гликозидных гидроксилов, имеющих восстанавливающие свойства, что можно проследить с помощью реакций Троммера или Фелинга.

Последовательно процесс расщепления крахмала можно представить следующим образом:

Крахмал
↓
амилодекстрины (фиолетово-синее окрашивание с йодом)
↓
эритродекстрины (буровато-красное окрашивание с йодом)
↓
ахродекстрины (желтое или буровато-желтое окрашивание с йодом)
↓
Мальтодекстрины (с йодом не дают окрашивания)
↓
мальтоза (с йодом не дает окрашивания)
↓
глюкоза

Ход работы: на стеклянную пластинку, под которую подложен лист белой бумаги, наносят ряд отдельных капель (5-6) раствора йода. Наливают в одну пробирку около 3 мл раствора крахмала и около 1 мл разбавленной слюны, в другую - только крахмал. Встряхивают обе пробирки и ставят их в водяную баню при 37^0С, помешивая стеклянной палочкой. Каждые 2 минуты берут стеклянными палочками из каждой пробирки каплю жидкости и наносят ее на каплю раствора йода. Сначала синее окрашивание будет проявляться от капель, взятых из обеих пробирок, затем из пробирки, где есть амилаза; капля начнет давать с йодом красно-бурый оттенок. Вскоре отмечают, что капля жидкости из пробирки со слюной окрашивания больше не дает, капли же, взятые из контрольного опыта, все время дают синее окрашивание. Наблюдают наличие опалесценции в контрольной пробирке (без слюны) и отсутствие опалесценции в пробирке со слюной. Отдельно проделывают с 1-2 мл содержимого каждой пробирки реакцию Троммера. С содержимым контрольной пробирки реакция будет отрицательная, а со слюной - положительная, так как образуется красный осадок закиси меди.

3.2. КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА

Реактивы: 1) крахмал, 0,5% р-р; 2) H2SO4, 10% р-р; 3) H2O, дист.

Ход работы: наливают в небольшой стаканчик около 15 мл раствора крахмала (обратить внимание на опалесценцию раствора) и около 5 мл 10% серной кислоты. Кипятят жидкость минут 10, добавляя по мере выкипания дистиллированную воду. Охлаждают содержимое стаканчика (обратить внимание на отсутствие опалесценции) и нейтрализуют его раствором щелочи. Отдельно проделывают с частью нейтрализованного гидролизата реакцию Троммера или с Фелинговой жидкостью. Обе реакции будут положительными.

3.3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Реактивы: 1) крахмал, 0,5% р-р; 2) сахароза, 2% р-р; 3) слюна, разбавленная в 10 раз; 4) сахараза; 5) NaOH, 5% р-р; 6) $CuSO_4 * 5H_2O$, 5% р-р.

Принцип метода: Ферменты обладают специфичностью действия, т.е. каждый фермент действует только на одно вещество или на группу сходных веществ. Так, например, амилаза гидролизует крахмал, липаза - жиры. Несмотря на то, что и в одном, и в другом случае мы имеем дело с процессами гидролиза, липаза не может заменить амилазу и наоборот.

Специфичность амилазы

Ход работы: предварительно анализируют раствор сахарозы с помощью реакции Троммера или Фелинговой жидкостью. Реакция - отрицательная. Наливают в одну пробирку 4-5 мл раствора крахмала, а в другую 4-5 мл раствора сахарозы. Добавляют в обе пробирки приблизительно по 1 мл разбавленной слюны и инкубируют 10 мин. при 370С на водяной бане, после чего проделывают реакцию Троммера с содержимым обеих пробирок и убеждаются в том, что произошел гидролиз крахмала. Гидролиз сахарозы отсутствует.

Специфичность сахаразы

Ход работы: в одну пробирку наливают 4-5 мл раствора крахмала, а в другую 4-5 мл сахарозы. В обе пробирки добавляют приблизительно по 1 мл раствора сахаразы и, перемешав содержимое каждой пробирки, ставят их на 10 мин. в водяную баню при 370С. В обеих пробирках проделывают реакцию Троммера или с Фелинговой жидкостью и убеждаются в гидролизе сахарозы и в отсутствии гидролиза крахмала.

3.4. ВЛИЯНИЕ pH НА АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ

Реактивы: 1) вода дист.; 2) крахмал, 0,5% р-р; 3) слюна, разбавленная в 10 раз; 4) буферный раствор; 5) HCl, 0,1н р-р.

Принцип метода: Ферменты очень чувствительны к изменению кислотности среды, в которой они действуют. Так, пепсин гидролизует белки только в кислой среде. Трипсин, наоборот, катализирует гидролиз только в щелочной среде. Можно считать, что для каждого фермента имеется определенный оптимум концентрации водородных ионов, при которой он наиболее активен. Увеличение или уменьшение pH, по сравнению с оптимальным значением, приводит к снижению активности фермента. Влияние pH на действие ферментов можно проиллюстрировать на примере действия амилазы слюны на крахмал. Активность амилазы слюны выше всего при почти нейтральной pH = 6,8 и подавляется как кислотами так и щелочами.

Ход работы: В 3 пробирки внести по 3 мл буферного раствора с pH 1,2; 6,8 и 10,0. В каждую пробирку добавить по 1 мл разведенной в 10 раз слюны и по 2 мл 0,5% р-ра крахмала. Перемешать и инкубировать 10 минут при 37^0С. Подкислить содержимое 2-ой и 3-ей пробирок добавлением соответственно 1 и 2 мл 0,1 н. р-ра HCl (реакция на крахмал с йодом идет только в кислой среде) и провести реакцию с реактивом Люголя.

Сделать вывод о зависимости интенсивности распада крахмала от pH среды.

3.5. ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ НА АМИЛАЗУ СЛЮНЫ

Реактивы: 1) вода дист.; 2) NaCl, 1% р-р; 3) $CuSO_4$, 1-5% р-р; 4) слюна, разбавленная в 5 раз; 5) крахмал, 0,5% р-р; 6) йод (р-р Люголя).

Принцип метода: Активаторами и ингибиторами называются вещества, которые способны ускорить или затормозить действие ферментов. Механизм действия активаторов и ингибиторов не всегда

ясен. В некоторых случаях в отсутствии активатора действие фермента совершенно не проявляется. Например, амилаза после диализа полностью теряет способность расщеплять крахмал и вновь ее приобретает после добавления NaCl. Активаторами и ингибиторами часто пользуются в биохимических исследованиях для изучения механизма действия отдельных ферментов, имеющихся в тканях. Прибавлением различных ядов удается блокировать активные центры одних ферментов, не изменяя при этом действие других. Если к отдельным порциям смеси, содержащей крахмал и амилазу, прибавить в одном случае NaCl, в другом - воду, в третьем - раствор $CuSO_4$ (или соли свинца, ионы серебра) и инкубировать в течение , то через некоторое время при добавлении йода жидкость в пробе с NaCl окраситься в желтый цвет, в контрольной пробе с водой - в красный, а в пробе с $CuSO_4$ в синий. Различная окраска жидкости обусловлена неодинаковой степенью гидролиза крахмала амилазой в присутствии NaCl и $CuSO_4$

Ход работы: готовят 3 пробирки. В первую наливают 10 капель дистиллированной воды, во вторую - 8 капель воды + 2 капли 1% р-ра NaCl, а в третью - 8 капель воды + 2 капли 1% р-ра $CuSO_4$. В каждую пробирку приливают по 10 капель слюны, разведенной в 5 раз, перемешивают, добавляют 5 капель 0,5% р-ра крахмала. вновь перемешивают, оставляют стоять при комнатной температуре. Через 5-10 минут во все пробирки прибавляют по 5 капель раствора йода. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активатором амилазы является NaCl (2-я пробирка), а ингибитором амилазы является $CuSO_4$ (3-я пробирка).

3.6. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Реактивы: 1) крахмал, 0,5% р-р; 2) I2, 0,1% р-р в 0,2% р-ре KI; 3) слюна, разбавленная в 10 раз; 4) вода дист.; 5) NaOH, 10% р-р.

Принцип метода: Скорость ферментативной реакции закономерно увеличивается примерно вдвое с повышением

температуры на каждые 10^0С. С 45-50^0С начинается денатурация фермента от нагревания. Постепенно разрушение фермента приводит к тому, что скорость основного химического процесса, катализируемого ферментом, замедляется и, наконец, прекращается. Наивысшая температура, при которой сохраняются нативные свойства ферментов в течение длительного периода времени, называется оптимальной температурой. Для большинства ферментов оптимальная температура находится в пределах 45-50^0С.

Ход работы: В 4 пронумерованных пробирки наливают по 4 мл раствора крахмала и по 1 мл разведенной в 10 раз водой слюны. Первую пробирку быстро помещают в кипящую водяную баню, вторую - в лед, третью - в термостат при 37-40 ^{0}С, а четвертую оставляют при комнатной температуре. Через 10 минут содержимое каждой пробирки разделить приблизительно на две части. С одной частью проводят пробу на крахмал: добавляют к содержимому 2 капли раствора Люголя, - синее окрашивание свидетельствует о наличии негидролизованного крахмала. Со второй частью содержимого проводят реакцию Троммера или с Фелинговой жидкостью: добавляют 1 мл 10% №ОН и по каплям 1% $CuSO_4$ до образования неисчезающей голубой мути. Нагревают пробирки до кипения. Появление желтого окрашивания, переходящего в кирпично-красное, свидетельствует о наличии восстанавливающих углеводов (глюкозы), появившихся после полного расщепления крахмала. Результаты работы сравнивают и анализируют.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ «ФЕРМЕНТЫ»

1. Химическая природа и свойства ферментов как белковых катализаторов. Сходство и отличие биологических и небиологических катализаторов.

2. Активный и регуляторный центр ферментов.

3. Роль коферментов и простетических групп в действии ферментов. Какова роль витаминов в их строении?

4. Никотинамидные и флавиновые коферменты, нуклеозидтрифосфаты.

5. Факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции (концентрация субстрата, pH среды, температура, активаторы, ингибиторы).

6. Классификация и номенклатура ферментов. Шифр ферментов.

7. Дать общую характеристику классов ферментов (оксидоредуктаз, трансфераз, гидролаз, лиаз, изомераз, лигаз).

8. Приведите примеры ферментов: а) с относительной специфичностью; б) с абсолютной специфичностью; в) со стереоспецифичностью.

9. Способы выражения каталитической активности ферментов.

10. Активаторы и ингибиторы ферментов.

11. Как можно обнаружить присутствие ферментов в биологическом материале?

12. Почему для сравнения ферментативной активности разных препаратов нужно проводить реакцию в одинаковых условиях?

Лабораторная работа № 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Цель работы: провести выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей, гидролиз рибонуклеопротеинов дрожжей и открытие продуктов гидролиза

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Нуклеиновые кислоты - ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и РНК (рибонуклеиновая кислота) представляют собой полимеры, мономерными звеньями которых являются нуклеотиды. Нуклеотиды построены из азотистых (пуриновых или пиримидиновых) оснований, пентозы (рибозы или дезоксирибозы) и остатка фосфорной кислоты. Каждый из компонентов нуклеотидов может давать ту или иную специфическую реакцию, которая позволяет судить о наличии, количестве и составе нуклеиновых кислот. В клетке ДНК и РНК находятся и функционируют в виде нуклеопротеиновых комплексов. Поэтому при изучении структуры и свойств нуклеиновых кислот одной из задач является их выделение и очистка.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

4.1. ВЫДЕЛЕНИЕ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВ ИЗ ДРОЖЖЕЙ

Реактивы: 1) диэтиловый эфир; 2) вода дист.; 3) песок; 4; NaOH, 0,4% р-р; 5) CH_3COOH, 5% р-р;6) дрожжи.

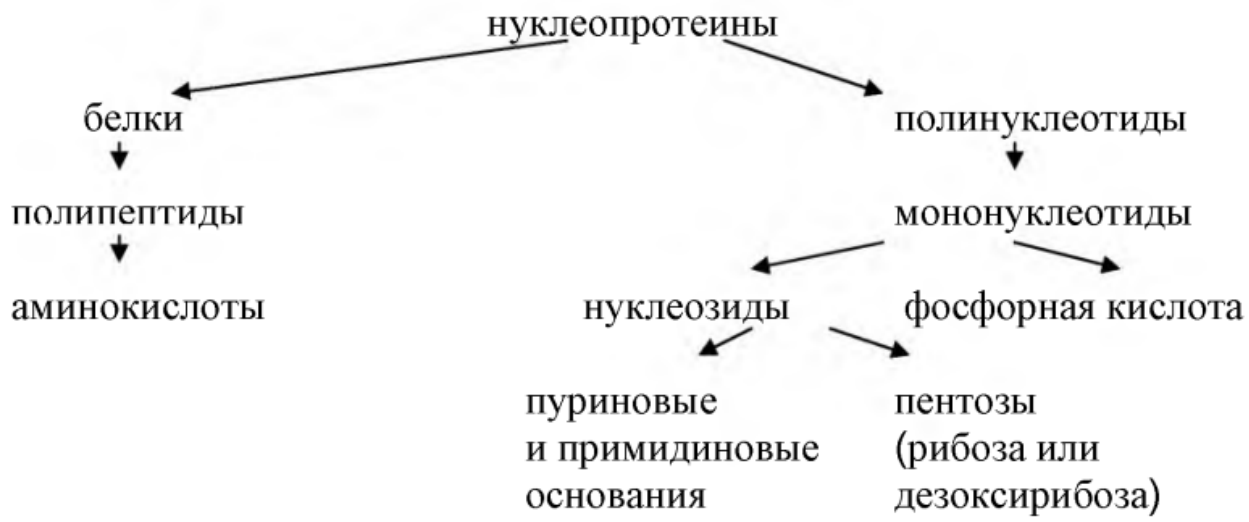
Принцип метода: Рибонуклеопротеинами богаты дрожжи, печень, почки и поджелудочная железа. При гомогенизации ткани нуклеопротеины растворяются в разбавленных растворах щелочей и выпадают в осадок при подкислении раствора.

Ход работы: 2,5 г дрожжей увлажняют в ступке с 1 мл воды + 1 мл диэтилового эфира и, добавляя немного стеклянного порошка или песка, растирают с раствором NaOH. Раствор щелочи приливают небольшими порциями (по 5-10 мл). Всего расходуют до 25 мл раствора щелочи. Растирание продолжают в течение 15-20 мин. Содержимое ступки фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют 10 мин. при 2500 об/мин. Фильтрат или центрифугат переливают в стакан и к нему по каплям добавляют раствор CH_3COOH до полного осаждения нуклеопротеина (обычно расходуют 10-15 мл раствора). Осадок отделяют центрифугированием.

4.2. ГИДРОЛИЗ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВ ДРОЖЖЕЙ И ОТКРЫТИЕ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА

Реактивы: 1) серная кислота, 5% р-р; 2) препарат нуклеопротеинов; 3) NaOH, 10% р-р; 4) $CuSO_4$, 1% р-р; 5) аммиак; 6) оксид серебра, 1% р-р в аммиаке. 7) тимол, 1 % спиртовой р-р. 8) серная кислота, конц.; 9) молибденовый реактив; 10) серная кислота, 5% р-р.

Принцип метода: Гидролиз нуклеопротеинов происходит при кипячении с разбавленной серной кислотой. Этот процесс можно представить следующим образом:



Гидролиз нуклеопротеинов

Ход работы: Гидролиз происходит при кипячении с разбавленной серной кислотой. Осадок нуклеопротеинов переносят в круглодонную колбу, смывая его 5% серной кислотой. Остаток кислоты вливают в колбу с осадком. Всего расходуют не более 20-25 мл раствора. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником, ставят на асбестовую сетку, нагревают на малом огне до кипячения. Кипятят 1-1,5 часа, после чего охлаждают и гидролизат фильтруют через бумажный фильтр. С фильтратом проделывают реакции на пуриновые основания, полипептиды, пентозы и фосфорную кислоту.

Обнаружение белков и полипептидов

Ход работы: для открытия белка с частью фильтрата (1-2 мл) проделывают биуретовую реакцию, добавляя 1-2 мл 10% р-ра NaOH до щелочной реакции по лакмусу. Затем вносят 2-3 капли 1% р-ра $CuSO_4$ и появляется розовая или фиолетовая окраска.

Открытие пуриновых оснований

Ход работы: к 2 мл фильтрата добавляют концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции на лакмус и приливают 1 мл аммиачного раствора окиси серебра. Через несколько минут выпадают хлопья серебряных солей пуриновых оснований.

Открытие пентоз (реакция Молиша)

Основано на реакции с тимолом и конц. серной кислотой, которая вызывает дегидратацию пентоз и образование фурфурола, дающего с тимолом соединение красного цвета (продукты конденсации).

Ход работы: к 1 мл фильтрата добавляют 2-3 капли спиртового раствора тимола и по стенке пробирки осторожно наслаивают 1 мл конц. серной кислоты. Жидкость окрашивается в красный цвет. Окраска более выражена на границе раздела слоев.

Открытие фосфорной кислоты

Фосфорная кислота образует с молибденовым реактивом желтый кристаллический осадок фосфорномолибденового аммония:

$$H_3PO_4 + 12(NH_4)_2MoO_4 + 21\ HNO_3 \rightarrow$$
$$\rightarrow\ (NH_4)_3PO_4 \cdot 12\ MoO_3 + 21\ NH_4NO_3 + 12\ H_2O$$

желтый крист. осадок

Ход работы: к 1 мл фильтрата приливают двойной объем молибденового реактива, нагревают до кипения и кипятят 2-3 мин. Появляется желтое окрашивание, обусловленное образованием фосфорномолибденово-кислого аммония. При стоянии выпадает желтый осадок.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ «НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ»

1. Общая характеристика, классификация и функции нуклеиновых кислот.

2. Первичная и вторичная структура ДНК. Правила Чаргаффа.

3. Первичная структура РНК. Типы РНК.

4. Структура тРНК. Особенности нуклеотидного состава тРНК.

5. Назовите структурные различия ДНК и РНК.

6. Гидролиз нуклеиновых кислот. Продукты их полного и неполного гидролиза.

7. Напишите формулы пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований. Лактимные и лактамные формы оксипроизводных азотистых оснований.

8. Принцип комплементарного взаимодействия азотистых оснований (примеры).

9. Написать структурную формулу тринуклеотида dGdCdT и UAC.

10. Написать структурные формулы нуклеозидов, входящих в состав РНК.

11. Написать структурные формулы нуклеотидов AMP и GTP.

Лабораторная работа № 5. ЛИПИДЫ

Цель работы: изучить свойства ацетилглицеринов, стеролов, стеридов, фосфолипидов.

ТЕОРИТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

К липидам относится большая группа довольно разнообразных соединений, нерастворимых в воде и хорошо растворимых в органических растворителях.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

5.1. АЦИЛГЛИЦЕРИНЫ

Ацилглицерины, или нейтральные жиры, представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот. Основная масса нейтральных жиров состоит из триацилгдицеринов. У большинства живых организмов в составе ацилглицеринов преобладают жирные кислоты с четным числом атомов. Наиболее распространенные жирные кислоты — стеариновая, пальмитиновая (насыщенные), олеиновая, линолевая, линоленовая (ненасыщенные). От соотношения входящих в состав ацилглицеринов насыщенных и ненасыщенных жирных кислот зависит ряд их свойств: температура плавления, йодное число, растворимость, способность образовывать эмульсии и другие свойства.

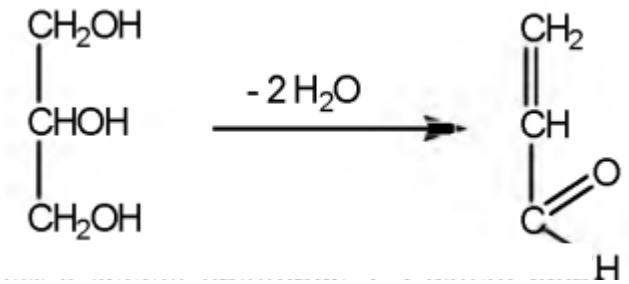
Акролеиновая проба

Реактивы: 1) жир; 2) кислый сернокислый калий, сухой.

Принцип метода: Акролеиновой пробой открывается в жирах

остаток глицерина, который при нагревании жира частично переходит в свободный глицерин. Глицерин теряет воду и образует ненасыщенный альдегид - акролеин, легко обнаруживаемый по специфическому раздражающему запаху.

Акролеин может образовываться при пережевывании пищи, и от его присутствия в значительной мере зависит резкий, удушливый запах кухонного чада. Акролеиновую пробу проводят, нагревая жир в присутствии бисульфита калия или натрия (в качестве водоотнимающего средства). Липиды, не содержащие глицерин (воск, жирные кислоты, стерины и т.д.), акролеиновой пробы не дают.



Ход работы: Помещают в сухую пробирку 1-2 капли жира, добавляют щепотку сухого кислого сернокислого калия и натревариндо появления белых гуакролерю. Резкий раздражающий запах (осторожно!) говорит об образовании акролеина. Проводят ту же реакцию с кусочком воска. Образование акролеина не происходит, т.к. молекула воска не содержит остатка глицерина.

Растворение жиров

Реактивы: 1) жир; 2) хлороформ; 3) эфир; 4) этиловый спирт; 5) бензин (керосин).

Принцип метода: обычно липиды извлекают из высушенных тканей органическими растворителями. Для разделения липидов пользуются неодинаковой растворимостью их в различных растворителях: одни из них хорошо растворимы в эфире, но плохо в

ацетоне (фосфолипиды), другие растворимы в бензоле, но нерастворимы в спирте (холестерол и др.).

Ход работы: помещают в несколько сухих пробирок по 3-4 капли исследуемого жира. добавляют в первую пробирку 2-3 мл бензина или керосина, во вторую - 2-3 мл хлороформа, в третью - 2-3 мл эфира, в четвертую - 2-3 мл этилового спирта. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и наблюдают растворение жира во всех растворителях, кроме спирта. Результаты опыта и его объяснение записывают.

Эмульгирование жиров

Реактивы: 1) жир; 2) вода дист.; 3) белок, 5% р-р; 4) КОН, 1% р-р; 5) сода, 2% р-р; 6) мыло, 2% р- р 7) желчь.

Принцип метода: В виду плохой растворимости в воде липиды образуют эмульсии с бифильными молекулами - белками, детергентами, желчью.

Ход работы: В 6 пробирок помещают по 3 капли исследуемого раствора и по 2-3 мл дистил. воды. Необходимо следить, чтобы количество воды и жира везде было приблизительно одинаковым. Добавляют в первую пробирку несколько капель раствора белка, во вторую - несколько капель раствора КОН, в третью - несколько капель раствора соды, в четвертую - несколько капель раствора мыла, в пятую - желчи, в шестую - не добавляют ничего (она будет служить контролем). Помещают на короткое время все шесть пробирок в горячую водяную баню для расплавления жира, если жир жидкий, то нагревание в бане излишне. Взбалтывают содержимое всех пробирок. ставят их по порядку штатив и наблюдают образование в первых пяти пробирках относительно устойчивой эмульсии, а в шестой - расслоение неустойчивой эмульсии на жир и воду.

Гидролиз жира (омыление)

Реактивы: 1) растительное масло; 2) КОН, 40% р-р.

Ход работы: В пробирку наливают около 2 мл растительного масла и добавляют равный объем 40% р-ра едкого калия. Пробирку закрывают пробкой, в которую вставлена стеклянная трубочка (холодильник), помещают в кипящую водяную баню и держат там до образования однородного раствора мыла. Результат опыта и уравнение реакции записывают.

В пробирку наливают примерно 8-10 мл воды и взбалтывают. Полученный раствор используют для определения составных частей жира.

Открытие в гидролизате составных частей жира

А. Открытие жирных кислот

Реактивы: 1) гидролизат; 2) конц. H_2SO_4.

Ход работы: В пробирку наливают часть полученного в четвертом опыте гидролизата и добавляют несколько капель концентрированной серной кислоты. Пробирку опускают в кипящую водяную баню до образования на поверхности жидкости жирного слоя.

Б. Открытие глицерина.

Реактивы: 1) гидролизат; 2) NaOH, 10% р-р.

Ход работы: В пробирку наливают примерно 2 мл гидролизата, добавляют 8-10 капель 10 % р-ра едкого натра и несколько капель 2% р-ра сернокислой меди. Появляется слабо-синее окрашивание, вследствие образования глицерата меди.

Результаты обеих реакций записывают.

Открытие ненасыщенных жирных кислот в жире

Реактивы: 1) бромная вода; 2) растительное масло.

Ход работы: В 2 пробирки наливают по 1 мл бромной воды. В первую пробирку добавляют несколько капель растительного масла и тщательно встряхивают; наблюдают обесцвечивание бромной воды. Вторая пробирка служит контролем.

Результаты опыта и уравнение реакции записывают.

Получение нерастворимых солей высших жирных кислот

Реактивы: 1) р-р мыла; 2) $CaCl_2$, 10% р-р.

Ход работы: В пробирку наливают 1-2 мл раствора мыла (можно использовать гидролизат, полученный в 4 опыте) и прибавляют несколько капель 10% р-ра хлористого кальция. Тщательно перемешивают и наблюдают появление осадка нерастворимого кальциевого мыла.

Результат опыта и уравнение реакции записывают.

Определение йодного числа

Реактивы: 1) жиры; 2) спирт этиловый; 3) йод, 0,1 н р-р в спирте; 4) гипосульфит, 0,1н р-р; 5) крахмал, 0,5% р-р.

Принцип метода: Ненасыщенность жира зависит от присутствия в его составе непредельных жирных кислот. Ненасыщенные соединения легко присоединяют по 2 атома галогена по месту каждой двойной связи. Обычно степень ненасыщенности определяется йодным числом. Йодное число измеряется количеством йода, которое присоединяется к 100 г жира. Йодное число позволяет судить о степени ненасыщенности жира, о склонности его к "высыханию", прогорканию и др.

Ход работы: отвешивают в коническую колбочку на 50 мл 0,1 г жира и вносят 10 мл хлороформа (проба). В другую пустую колбочку

добавляют 10 мл хлороформа (контроль). В обе колбы приливают точно по 25 мл 0,1н. спиртового раствора йода. Закрывают пробкой, тщательно перемешивают и оставляют в темном месте на 90 минут. Не вошедший в реакцию йод титруют 0,1н раствором гипосульфита сначала до слабо-желтой окраски, а затем в присутствии крахмала до обесцвечивания раствора, потом таким же образом титруют контроль.

Расчет: 1 мл 0,1 н раствора гипосульфита эквивалентен 1 мл 0,1 н раствора йода или 0,0127 г йода. Зная, сколько мл 0,1 н раствора гипосульфита пошло на титрование контроля и опыта, вычисляют йодное число:

$$X = \frac{(A - B) \times f \times 0{,}0127 \times 100}{c}$$

где:

A - количество 0,1 н р-ра гипосульфита, затраченное на титрование контроля;

B - количество 0,1 н р-ра гипосульфита, затраченное на титрование пробы;

f - коэффициент поправки на 0,1 н р-р гипосульфита;

c - навеска жира в граммах.

Определение числа омыления жира

Реактивы: 1) жир; 2) КОН, 0,5 н. спиртовой р-р; 3) HCl, 0,5 н р-р; 4) фенолфталеин, 0,1% р-р.

Принцип метода: Числом омыления называется количество мг КОН, необходимого для нейтрализации всех свободных и связанных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Ход работы: В колбочку на 50 мл вносят 0,5 г жира, прибавляют 15 мл 0,5н спиртового раствора КОН и кипятят на водяной бане 50

минут с обратным холодильником, время от времени взбалтывая содержимое колбы.

Окончание омыления определяется по образованию однородной прозрачной жидкости. Одновременно ставят контроль, но вместо жира прибавляют 0,5 мл воды. По окончании омыления жидкость охлаждают до комнатной температуры, добавляют 20 мл дистиллированной воды и титруют 0,5 н раствором HCl по фенолфталеину.

Расчет: 1 мл 0,5 н раствора КОН соответствует 25 мг КОН. Количество КОН, которое пошло на нейтрализацию всех жирных кислот 1 г жира, равно:

$$C = \frac{(B - A) \times f \times 28{,}5}{a}$$

где:

B - количество 0,5 н р-ра HCl, затраченное на титрование контроля;

A - количество 0,5 н р-ра HCl, затраченное на титрование пробы;

a - количество жира в граммах;

f - коэффициент поправки на 0,5 н р-р HCl.

Определение кислотного числа

Реактивы: 1) жир; 2) смесь спирта с эфиром; 3) КОН, 0,1 н р-р; 4) фенолфталеин. 0,1% р-р.

Принцип метода: Кислотным числом называется число мг КОН, необходимого для нейтрализации всех свободных жирных кислот в 1 г жира.

Ход работы: отвешивают на весах 1 г жира, помещают в колбу на 50 мл, добавляют 10 мл нейтральной смеси спирта с эфиром и 3-4 капли

фенолфталеина. Раствор масла в смеси спирта с эфиром титруют из обычной бюретки КОН до нежно-розового цвета.

Расчет: Количество КОН в мг, которое пошло на титрование свободных жирных кислот в 1 г жира, равняется:

$$C = \frac{A \times f \times 5{,}6}{a}$$

где:

А - количество 0,1н р-ра КОН. затраченное на титрование пробы;

f - коэффициент поправки на 0,1н р-р КОН;

5,6 - количество мг КОН, содержащееся в 1 мл 0,1 н р-ра КОН;

а - количество жира в граммах.

Определение эфирного числа жира

Эфирным числом называется количество КОН, необходимое для нейтрализации жирных кислот, которые образуются при омылении 1 г жира.

Это число определяют как разницу между числом омыления данного жира и его кислотным числом.

5.2. СТЕРОЛЫ, СТЕРИДЫ

В основе структуры стероидов лежит циклопентанпергидрофенантрен (четыре конденсированных кольца). Наиболее распространенный и биологически важный стерин животных тканей — циклический спирт холестерин. Он входит в состав плазматических мембран, а также мембран митохондрий и в состав эндоплазматического ретикулума, но в значительно меньшем количестве. Холестерин также содержится в крови и желчи. В

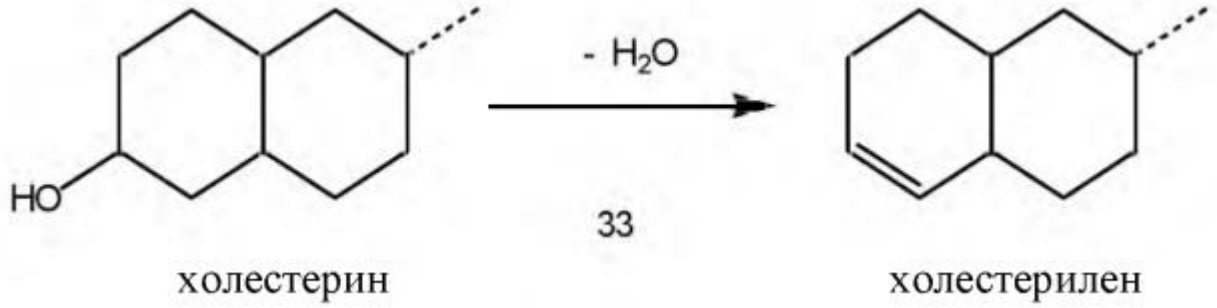
растениях обнаружены другие стерины (фитостерины) и стероидные гликозиды (сапонины). К стеридам относятся также такие биологически активные вещества, как гормоны надпочечников (кортизол, кортикостерон, альдостерон), половые гормоны (андрогены и эстрогены), желчные кислоты, витамин D.

Под влиянием концентрированной серной кислоты и уксусного ангидрида холестерин превращается в углеводороды с суммарной формулой $C_{54}H_{86}$ и $C_{54}H_{88}$ (бихолестадиены), которые с серной кислотой образуют диеновые кислоты: с двумя молекулами серной кислоты - продукт красного цвета (реакция Сальковского), с одной молекулой серной кислоты - продукт зеленого цвета (реакция Либермана-Бурхарда).

Реакция Сальковского

Реактивы: 1) холестерин, 1% р-р в хлороформе; 2) уксусный ангидрид; 3) серная кислота, конц.

Принцип метода: метод основан на дегидратации молекулы холестерина под действием концентрированной серной кислоты с образованием холестерилена, имеющего красную окраску.



Ход работы: в сухую пробирку наливают 10 капель 1% хлороформного р-ра холестерина и добавляют равный объем концентрированной серной кислоты (осторожно по стенке пробирки). При легком встряхивании на границе 2-х слоев жидкости образуется оранжевое кольцо, которое при стоянии переходит в красное. Нижний слой серной кислоты приобретает зеленую флуоресценцию.

Реакция Либермана - Бурхарда

Реактивы: 1) холестерин, 1% р-р в хлороформе; 2) уксусный ангидрид; 3) серная кислота, конц.

Ход работы: В сухую пробирку наливают 10 капель 1% хлороформного р-ра холестерина, добавляют 3-5 капель уксусного ангидрида и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки осторожно встряхивают и помещают в баню при температуре 40^0С на 1-2 минуты или оставляют при комнатной температуре на 5-10 минут. В присутствии холестерина вначале появляется красное окрашивание, которое затем переходит в фиолетовое, синее и зеленое. При незначительном содержании холестерина в растворе сразу появляется зеленое окрашивание.

Количественное определение холестерина

Реактивы: 1) реактив Либермана-Бурхарда; 2) стандартный раствор холестерина, 100мг/100мл хлороформа.

Принцип метода: в основе количественного определения лежит цветная реакция Либермана-Бурхарда.

Ход работы: в пробирку (опытная проба) прилить 1,5 мл реактива Либермана-Бурхарда, затем осторожно по стенке пробирки добавить 0,2 мл сыворотки крови и 0,3 мл хлороформа. Содержимое пробирки энергично встряхнуть. Пробу оставить на 20 мин для развития окраски.

В другую пробирку (контрольная проба) прилить 1,5 мл реактива Либермана-Бурхарда и 0,5 мл хлороформа.

Интенсивность зеленого окрашивания в опытной пробе измерить на ФЭКе против контрольной пробы при длине волны λ = 630-690нм (красный светофильтр) в кювете 0,5 см.

Построение калибровочного графика. В пробирки 1-5 внести стандартный раствор холестерина в количествах, указанных в таблице, затем в соответствующих количествах добавить хлороформ и реактив Либермана-Бурхарда. Содержимое пробирок встряхнуть. Через 20

минут измерить экстинкции на ФЭКе против контрольной пробы.

Таблица 5.

№ пробирки	Количество стандартного раствора холестерина, мл	Количество хлороформа, мл	Количество реактива Либермана-Бурхарда, мл	Количество холестерина в пробе, мг
1	0,1	0,4	1,5	0,1
2	0,2	0,3	1,5	0,2
3	0,3	0,2	1,5	0,3
4	0,4	0,1	1,5	0,4
5	0,5	-	1,5	0,5

На основании полученных результатов построить калибровочный график на миллиметровой бумаге. По графику найти содержание холестерина в мг в опытной пробе (в 0,2 мл сыворотки). Произвести пересчет количества холестерина на 1 л сыворотки крови.

5.3. ФОСФОЛИПИДЫ

Основная масса фосфолипидов представлена производными фосфатидной кислоты — фосфатидами (в основном, фосфатидилхолины (лецитины), фосфатидилэтаноламины (кефалины) и фосфатидилсерины). Кроме того, в тканях присутствуют фосфатидилинозиты, сфинофосфатиды и дифосфатидилглицерины, в частности, кардиолипин, который обладает иммуномодуляторными свойствами. Фосфолипиды содержатся преимущественно в биологических мембранах, являясь их главным липидным компонентом.

Получение фосфатидилхолинов из яичного желтка

Реактивы: 1) яичный желток; 2) CH_3COOH; 3) ацетон; 4) NaOH, 10% р-р; 5) $CdCl_2$, насыщенный р-р; 6) HCl, 10% р-р; 7) кислый сернокислый К, сухой; 8) Na_2CO_3, сухой; 9) KNO_3, сухой; 10) HNO_3, 10% р-р; 11) молибденовый реактив; 12) H_2O, дист.

Ход работы: помещают в стаканчик приблизительно 1/5 часть одного куриного желтка и добавляют при перемешивании около 10-15 мл горячего спирта. При охлаждении смесь фильтруют в сухую пробирку. Если в фильтрате появилась муть, то фильтрование повторяют до получения совершенно прозрачного раствора.

Осаждение ацетоном

В пробирку наливают 2-3 мл ацетона и по каплям приливают немного полученного фильтрата. Наблюдается появление мути в ацетоне, что указывает на выпадение холинфосфатидов, которые в ацетоне не растворимы.

Эмульгирование

К 2-3 мл спиртового раствора добавляют по каплям дистиллированную воду. Наблюдают образование устойчивой эмульсии фосфатидилхолинов.

Осаждение фосфатидилхолинов хлористым кадмием

При добавлении хлористого кадмия к спиртовому раствору фосфатидилхолинов последние выпадают в осадок, т.е. образуется соединение их с хлористым кадмием, в котором на 3 частицы фосфатидилхолинов приходится 4 части хлористого кадмия. Это соединение слабо растворимо.

Ход работы: в сухую пробирку наливают 5 капель спиртового раствора фосфатидилхолинов и добавляют 1-2 капли насыщенного раствора хлористого кадмия. Выпадает осадок.

Гидролиз фосфатидилхолинов

Ход работы: к оставшемуся спиртовому раствору фосфатидилхолинов добавляют 3-5 мл 10% р- ра едкого натра и

подвергают кипячению в течении 5-10 минут. Происходит гидролитический распад фосфатидилхолинов с отщепление холина, жирных кислот и глицеринфосфатной кислоты. При нагревании ощущается запах селедочного рассола или посинение лакмусовой бумажки, характерные для триметиламина, образующегося из холина. В растворе устанавливают наличие жирных кислот, глицерина, фосфорной кислоты.

Определение жирных кислот

Ход работы: Раствор разбавляют небольшим количеством воды и подкисляют 10% р-ром HCl, выпадает осадок свободных жирных кислот. Осадок отфильтровывают, фильтрат нейтрализуют 10% р-ром щелочи (на лакмус) и выпаривают на водяной бане досуха.

Обнаружение глицерина

В части сухого остатка определяют присутствие глицерина по акролеиновой пробе.

Обнаружение фосфора

Ход работы: Часть сухого остатка переносят в фарфоровый тигель и тщательно смешивают с двух-, трехкратным количеством смеси, состоящей из 2 частей карбоната натрия и 1 части нитрата калия. Тигель прикрывают крышкой и осторожно нагревают.

Реакция идет бурно, иногда она сопровождается небольшой вспышкой. Сплав осторожно прокаливают до полного окисления. После охлаждения тигеля серовато-бурую золу растворяют в 10% р-ре азотной кислоты (добавлять по каплям, растирая палочкой), и в полученном растворе обнаруживают фосфорную кислоту с помощью молибдата аммония или магнезиальной смеси, для чего к 2 мл молибденового реактива прибавляют небольшими порциями испытуемый раствор. Смесь слегка нагревают. Образуется желто-

зеленый осадок фосфомолибдата аммония:

$$12\ (NH_4)_2MoO_4 + 24\ HNO_3 = 12\ H_2MoO_4 + 24\ NH_4NO_3$$
$$H_3PO_4 + 12\ H_2MoO_4 = H_3PO_4 \times 12\ MoO_3 + 12\ H_2O$$
$$H_3PO_4 \times 12\ MoO_3 + 3\ NH_4NO3 = (NH_4)_3PO_4 \times 12\ MoO_3 + 3\ HNO_3$$

$$12\ (NH_4)_2MoO_3 + 21HNO_3 = 21\ NH_4NO_3 + (NH_4)_3PO_4 \times 12MoO_3 + 12H_2O$$

Результаты опытов и объяснение записывают.

КОНТРОЛЬНЫ Е ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ «ЛИПИДЫ»

1. Биологическое значение и классификация липидов. Напишите формулы и охарактеризуйте простые липиды: ацилглицерины, стериды, воска.

2. Ацилглицерины, их строение, физико-химические свойства и роль в организме.

3. Строение, физико-химические свойства жирных кислот.

4. Строение фосфолипидов и их свойства.

5. Сфинголипиды. Их строение и свойства.

6. Стеролы и стериды. Наиболее важные биологически активные стериды (гормоны, желчные кислоты, витамин D).

7. Дайте общую характеристику сложных липидов. Какова их биологическая роль.

8. Привести формулу триацилглицерина, в состав которого входят олеиновая, стеариновая и пальмитиновая кислоты. Дать рациональное название.

9. Напишите структурную формулу цереброзидов. Дать рациональное название.10. Напишите формулы, отражающие общее строение сфингомиелинов и ганглиозидов.

11. Напишите структурную формулу сфингозина и дайте его рациональное название.

Лабораторная работа № 6. ВИТАМИНЫ И КОФЕРМЕНТЫ

Цель работы: изучить свойства водорастворимых витаминов и жирорастворимых витаминов

ТЕОРИТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Витамины — это низкомолекулярные органические вещества различной химической природы, требующиеся организму в очень небольших количествах (от нескольких мкг до нескольких мг). Они участвуют практически во всех биохимических и физиологических процессах, составляющих в совокупности обмен веществ. В отличие от других факторов питания, витамины, как правило, не являются материалом для биосинтезов или источником энергии. Одни организмы нуждаются в том, чтобы определенные витамины поступали к ним с пищей, другие наделены ферментными системами, способными частично или полностью их синтезировать. Например, аскорбиновая кислота синтезируется у большинства организмов, кроме человека, обезьян, морских свинок и плодоядных летучих мышей. Поэтому сейчас термин «витамин» применяется для обозначения жизненно важного вещества и не делается оговорки относительно того, способен ли организм сам его синтезировать или это вещество должно поступать в готовом виде. Однако с большой степенью достоверности можно утверждать, что каждый витамин выполняет у всех организмов одни и те же функции.

Существует несколько способов классификации витаминов, все они несовершенны. Наиболее приемлемая классификация основана на различии в растворимости витаминов, она учитывает их химическую природу и дает каждому тривиальное и буквенное название. Таким образом, различают:

1) водорастворимые: B1 (тиамин), B2 (рибофлавин), PP

(никотиновая кислота), С (аскорбиновая кислота), Н (биотин) и др.;

2) жирорастворимые: А (ретинол), D (кальциферол), Е (токоферол) и др.

Сейчас не принято выделять группу витаминоподобных веществ. Липоевая, пангамовая, оротовая, парааминобензойная кислоты и ряд других веществ считают витаминами. К ним же относят холин и инозитол несмотря на то, что последние являются компонентами фосфатидилхолинов, фосфатидилинозитолов, сфингомиелинов. Большинство водорастворимых витаминов — предшественники коферментов. Функции жирорастворимых витаминов связаны с процессами фоторецепции (А), свертывания крови (К), минерального обмена (D) и др.

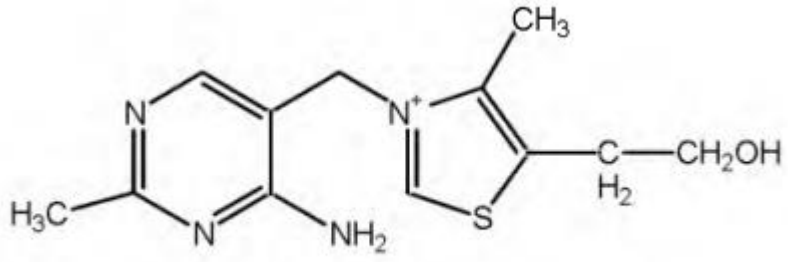
Для определения витаминов в продуктах питания, органах и тканях растений и животных, микроорганизмах, сыворотке крови, моче, биопсийном материале человека разработаны соответствующие физико-химические методы.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

6.1. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Качественные реакции на витамин В1 (тиамин)

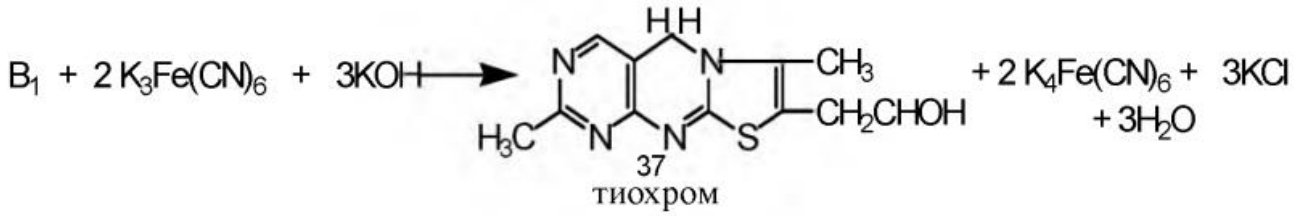
Витамин B_1 состоит из пиримидинового и тиазолового колец и получил название тиамина, поскольку содержит серу и азот.



Реакция окисления

Принцип метода: в щелочной среде тиамин окисляется в тиохром феррицианидом калия. Тиохром обладает синей флюоресценцией при ультрафиолетовом облучении раствора.

Химизм реакции следующий:



Реактивы: 1) NaOH, 10% р-р; 2) феррицианид калия, 5% р-р; 3) сульфаниловая кислота, 1% р-р; 4) нитрит натрия, 5% р-р; 5) бикарбонат натрия, 10% р-р; 6) тиамин (В1), 5% раствор (без изобутилового спирта).

Ход работы: к 1капле 5% раствора тиамина прибавляют 5-10 капель 10% р-ра NaOH, 1-2 капли 5% раствора феррицианида калия и взбалтывают, прогрев флюороскоп 10 минут, наблюдают синюю флюоресценцию.

Диазореакция

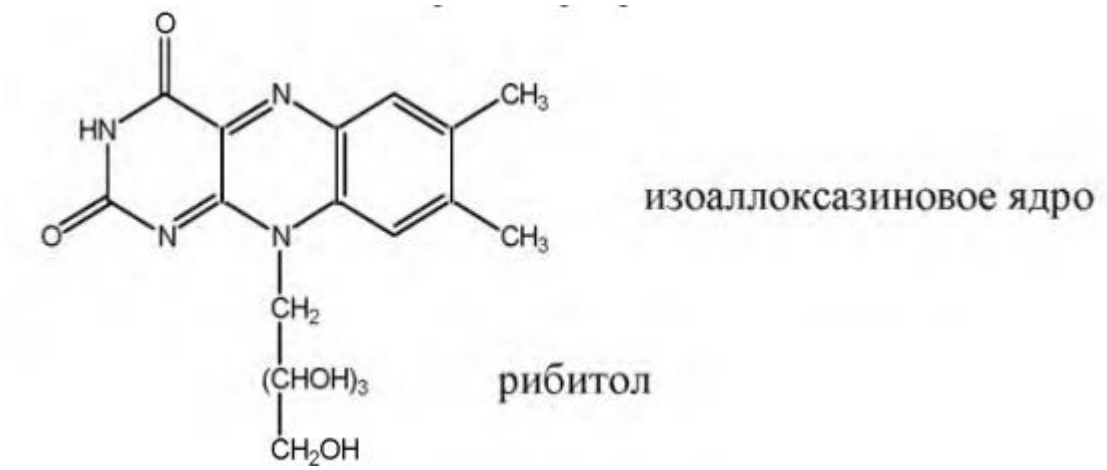
Принцип метода: в щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

Реактивы: 1) сульфаниловая кислота,1% р-р; 2) нитрит натрия, 5% р-р; 3) бикарбонат натрия, 10% р-р; 4) тиамин (B_1), 5% раствор (без изобутилового спирта).

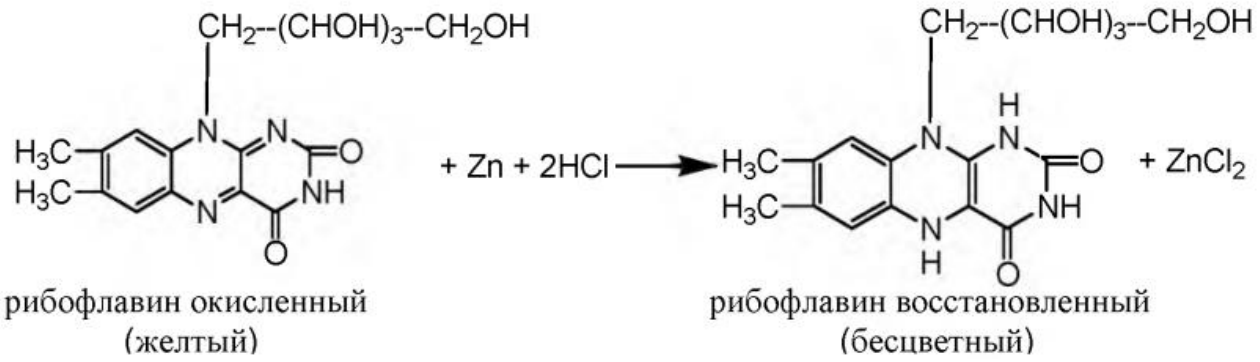
Ход работы: к диазореактиву, состоящему из 5 капель 1% р-ра сульфаниловой кислоты и 5 капель 5% р-ра нитрита натрия, добавляют 1-2 капли 5% р-ра тиамина и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5-7 капель 10% р-ра бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

Качественная реакция на Витамин B_2 (рибофлавин)

Рибофлавин состоит из изоаллоксазинового ядра и спирта рибитола:



Принцип метода: Окисленная форма витамина B_2 представляет собой желтое флюоресцирующее в ультрафиолетовых лучах вещество. Реакция на витамин B_2 основана на способности его легко восстанавливаться; при этом раствор витамина B_2, обладающий желтой окраской, приобретает сначала розовый цвет за счет образования промежуточных соединений, а затем обесцвечивается, так как восстановленная форма витамина B_2 бесцветна.

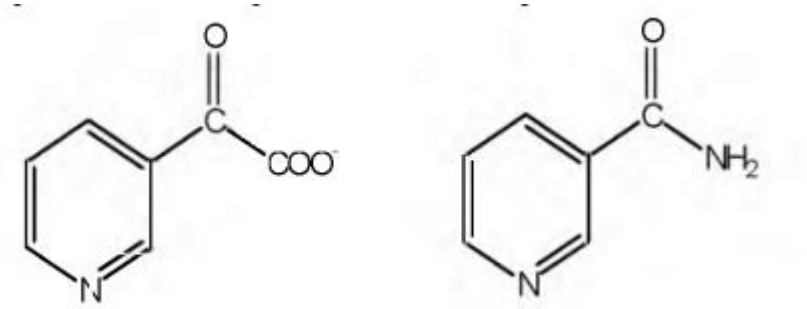


Реактивы: 1) хлористоводородная кислота конц.; 2) цинк металлический; 3) витамин B_2, 0,025% р- р (перед определением раствор можно развести в 5 раз).

Ход работы: в пробирку наливают 10 капель раствора витамина B_2, добавляют 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и опускают зернышко металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается.

Качественная реакция на витамин PP (амид никотиновой кислоты)

Витамин PP является производным пиримидинового ядра.



никотиновая кислота никотинамид

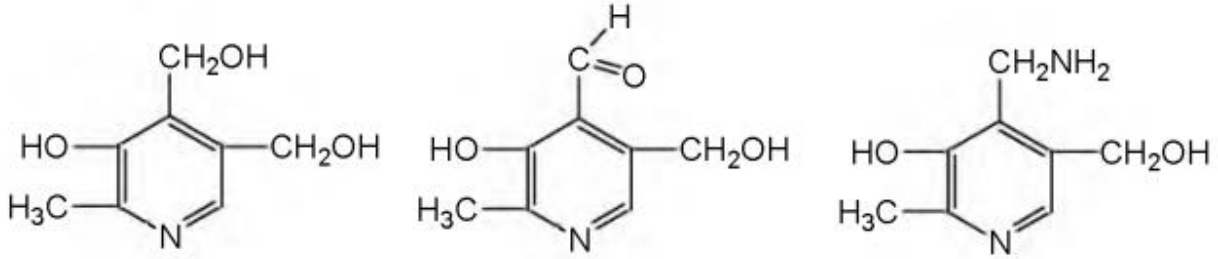
Принцип метода: Витамин PP при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок медной соли никотиновой кислоты, плохо растворимый.

Реактивы: 1) ацетат меди, 5% р-р; 2) витамин PP, 3% р-р в 10% уксусной кислоты.

Ход работы: перед определением 3% р-р витамина PP следует обязательно взболтать, затем набирать в пробирку 20 капель и нагреть до кипения; при этом мутный р-р становится прозрачным. Взболтать 5% р-р ацетата меди, прилить 20 капель к нагретому р-ру витамина PP. Содержимое пробирки довести до кипения и сразу охладить под струей холодной воды; на дне пробирки выпадет синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Качественная реакция на витамин B_6 (пиридоксин)

Группа витамина B_6: пиридоксол, пиридоксаль, пиридоксамин, являющиеся производными пиридина и носящие общее название пиридоксина, обладают активностью витамина B_6:



пиридоксол пиридоксаль пиридоксамин

Принцип метода: Витамин B_6 при взаимодействии с раствором хлорного железа образует комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.

Реактивы: 1) хлорное железо, 1% р-р; 2) витамин B_6, 1% р-р.

Ход работы: к 5 каплям 1% р-ра витамина B_6 приливают равное количество 1% р-ра хлорного железа и перемешивают. Развивается красное окрашивание.

Качественная реакция на витамин B_{12} (кобаламин)

Принцип метода: при взаимодействии ионов кобальта с тиомочевиной при нагревании образуется роданид кобальта зеленого цвета.

Реактивы: 1) тиомочевина, 10% р-р; 2) серная кислота конц.; 3) р-р витамина B_{12} в ампулах (можно использовать готовый минерализат; для этого содержимое одной ампулы переливают в пробирку, приливают 3-5 капель концентрированной серной кислоты и сжигают до обесцвечивания: по окончании минерализации осторожно добавляют в пробирку 1 мл H_2O).

Ход работы: на беззольный фильтр наносят 2-3 капли раствора тиомочевины и высушивают над сеткой газовой горелки. После этого

наносят на фильтр 1-2 капли минерализата и снова нагревают фильтр над сеткой. На фильтрате, чаще по краю, появляется зеленое окрашивание, свидетельствующее о наличии кобальта.

Выделение фолиевой кислоты из дрожжей и ее обнаружение

Фолиевая кислота является производным птеридина и содержит парааминобензойную и глутаминовую кислоты.

Принцип метода: Фолиевая кислота хорошо растворима в 0,1 н. р-ре гидроксида натрия. При экстрагировании фолиевой кислоты из дрожжей и ультрофиолетовом облучении наблюдается интенсивно голубая флюоресценция (при концентрации, равной 0,001%).

Реактивы: 1) NaOH, 0,1 н. и 0,005 н. р-ры; 2) ледяная уксусная кислота; 3) перманганат калия, 0,4% р-р; 4) пероксид водорода, 3% р-р; 5) дрожжи пищевые.

Ход работы: 1. Выделение фолиевой кислоты из дрожжей. В ступку помещают 10 г дрожжей, добавляют 10 мл 0,1 н. р-ра NaOH, 2г кварцевого песка и растирают 5 мин. Затем центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин.

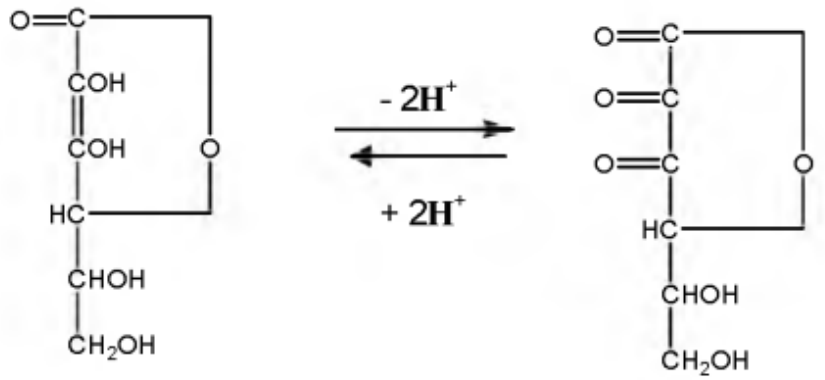
К 10 каплям надосадочной жидкости приливают 20 капель ледяной уксусной кислоты (pH 3,0) и приблизительно 10 капель 0,4% раствора $KMnO_4$ так, чтобы розовое окрашивание не исчезло в течении 10 мин (если окраска исчезла, следует прилить еще несколько капель $KMnO_4$). Через 10 мин удаляют избыток перманганата калия путем

добавления 4-5 капель 3% раствора H_2O_2 и приливают0,005 н. раствор едкого натрия (приблизительно 5 мл) до pH 4,0-4,5 в присутствии индикаторной бумаги.

2. Определение флюоресцирующей способности фолиевой кислоты. При ультрафиолетовом облучении фолиевой кислоты в щелочном растворе в флюороскопе наблюдается интенсивно голубая флюоресценция (если раствор с выделенной фолиевой кислотой поставить в холодильник, то он в течении нескольких недель сохраняет флюоресцирующую способность).

Качественная реакция на витамин С с красной кровяной солью и хлорным железом

Принцип метода: при добавлении раствора аскорбиновой кислоты или вытяжки из шиповника (капусты и др.), содержащей аскорбиновую кислоту, смеси растворов железосинеродистого калия ($K_3[Fe(CN)_6]$ — красная кровяная соль) и хлорного железа, бурая жидкость окрашивается в синий цвет. Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты и восстановлением железосинеродистого калия в железистосинеродистый, который образует с хлорным железом берлинскую лазурь.



аскорбиновая кислота дегидроаскорбиновая кислота

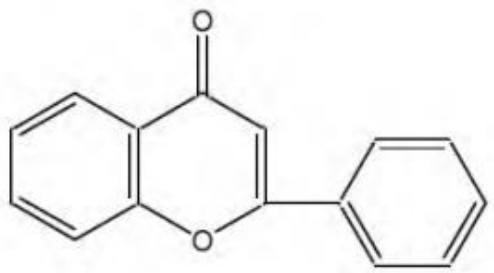
Реактивы: 1) раствор аскорбиновой кислоты или вытяжка шиповника, 1%; 2) 5% раствор $K_3[Fe(CN)_6]$; 3) раствор $FeCl_3$; 4) дистиллированная вода.

Ход работы: В 2 пробирки наливают по 1 капле 5%-го раствора красной кровяной соли и по одной капле раствора хлорного железа. В первую пробирку к зеленовато-бурой жидкости добавляют 5-10 капель 1%-ной вытяжки из шиповника, во вторую — такое же количество дистиллированной воды.

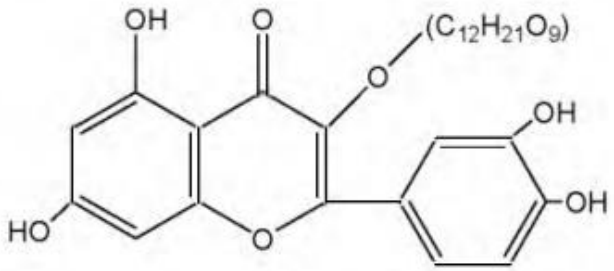
Жидкость в первой пробирке приобретает зеленовато-синюю окраску и выпадает осадок берлинской лазури. При осторожном наслаивании дистиллированной воды осадок на дне пробирки становится более отчетливым. Во второй пробирке окраска раствора остается без изменений.

Количественное определение витамина Р в чае (по Левенталю)

Известно несколько соединений, оказывающих Р-витаминное действие (рутин и др.). В основе их лежит скелет флавона. Наиболее изучены строение и свойства рутина



флавон



рутин

Принцип метода: Рутин способен окисляться перманганатом калия; в качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом калия после того, как окислится весь рутин. Экспериментально установлено, что 1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия окисляет 6,4 мкг рутина.

Реактивы: 1) перманганат калия, 0,05 н. р-р; 2) индикатор индигокармин; 3) чай или готовый экстракт.

Ход работы: К 100 мг чая приливают 50 мл горячей

дистиллированной воды и проводят экстракцию в течении 5 мин. 5 мл экстракта чая отмеривают в стаканчик или колбочку, добавляют 5 мл дистиллированной воды и 5 капель индгокармина (появляется синее окрашивание). Титруют из микробюретки 0,05 н. р-ром $KMnO_4$ до появления устойчивой желтой окраски.

Определяют процентное содержание рутина в чае. Расчет производят по следующей формуле:

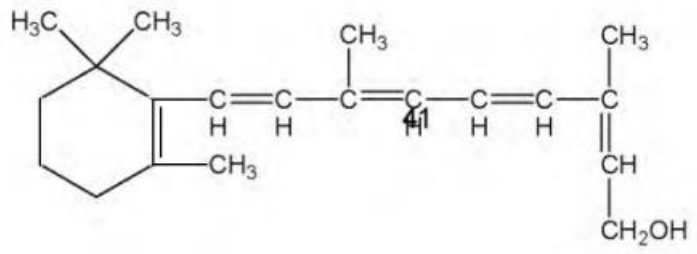
$$x = \frac{3{,}2 \times A \times V_1 \times 100}{V_2 \times P \times 1000}$$

где x - содержание витамина Р в препарате, в %; 3,2 - стандартный пересчетный коэффициент; А - результат титрования 0,05 н. раствором перманганата калия, мл; V 1 - объем. в котором растворена взятая для анализа навеска, мл; 100 - общее количество вещества для расчета процентного содержания, г; V2 - объем р-ра. взятого для титрования, мл; Р - навеска, мг; 1000 - перевод микрограммов в миллиграммы (Р = 30-50 мг/100г).

6.2. ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Качественные реакции на витамин А

Витамины группы А содержат β-ионовое кольцо и боковую цепь, состоящую из двух остатков изопрена и первичной спиртовой группы, в результате чего они получили название ретинолов.



витамин А

Проба с серной кислотой

Реактивы: 1) серная кислота, конц.; 2) раствор ретинола ацетата; 3) хлороформ; 4) растительное масло.

Ход работы: в одну пробирку наливают 5 капель растительного масла, в другую — 5 капель ретинола ацетата. В обе пробирки добавляют по 10-15 капель хлороформа и 15-20 капель концентрированной серной кислоты. В присутствии витамина А (во второй пробирке) появляется синяя окраска, переходящая в фиолетовую, а затем в красно-бурую.

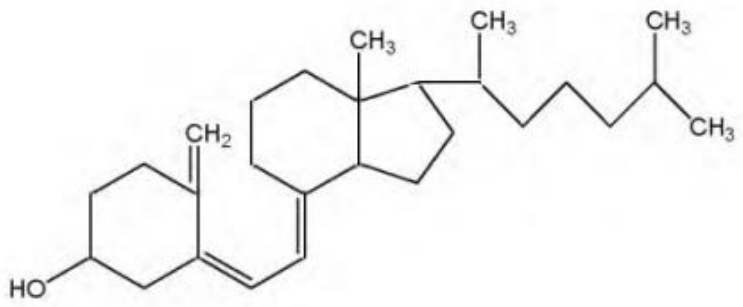
Реакция с сульфатом железа

Реактивы: 1) 0,05% раствор витамина А в хлороформе; 2) ледяная уксусная кислота, насыщенная сульфатом железа; 3) серная кислота, конц.

Ход работы: к 1-2 каплям рыбьего жира или 0,05% раствора витамина А в хлороформе приливают 5-10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа, и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание. постепенно переходящее в розово-красное. Каротины дают при этой реакции зеленоватое окрашивание.

Качественные реакции на витамин D

Витамин D относится к стероидам и является производным циклопентанпергидрофенантрена. Витамины группы D существуют в виде нескольких изомеров. Наиболее распространен эргокальциферол - витамин D_2 и холекальциферол - витамин D_3.



витамин D_3 (холикальциферол)

Реактивы: 1) раствор брома в обезвоженном хлороформе в соотношении 1:60; 2) анилиновый реактив (смешивают 15 частей анилина и 1 часть конц. хлористоводородной кислоты); 3) хлороформ; 4) рыбий жир или концентрат витамина D.

Бромхлороформая проба

Принцип метода: Витамин D, содержащийся в рыбьем жире, при взаимодействии с раствором брома в хлороформе приобретает зеленовато-голубую окраску.

Ход работы: в сухую пробирку вносят 2-3 капли рыбьего жира или 1 каплю концентрата витамина D и 2-4 капли р-ра брома в хлороформе (1:60). В присутствии витамина D постепенно появляется зеленовато-голубое окрашивание.

Анилиновая проба

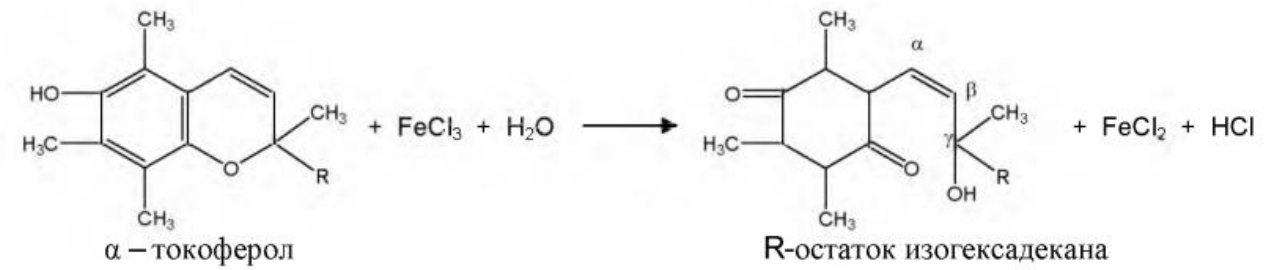
Принцип метода: Витамин D при взаимодействии с анилиновым реактивом при нагревании окрашивается в красный цвет.

Ход работы: в сухую пробирку вносят 2 капли рыбьего жира и 10 капель хлороформа, а затем добавляют при постоянном перемешивании 1-2 капли анилинового реактива. Осторожно нагревают при постоянном перемешивании и кипятят полминуты. При наличии витамина D желтая эмульсия приобретает сначала зеленый, а затем красный цвет.

Качественная реакции на витамин Е

Витамин Е существует в виде нескольких изомеров: α-, β- и γ-токоферолов. Изомеры отличаются друг от друга в основном порядком расположения метильных групп в бензольном кольце.

Принцип метода: Спиртовой р-р а -токоферола окисляется хлоридом железа (Fe+3) в токоферилхинон и р-р окрашивается в красный цвет:

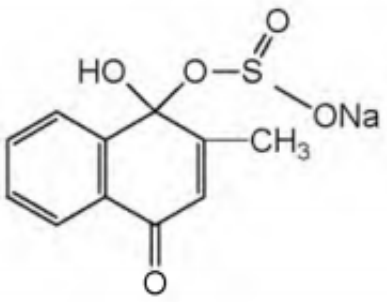


Реактивы: 1) витамин Е, 0,1% спиртовой р-р; 2) хлорид железа, 1% р-р.

Ход работы: в сухую пробирку берут 4-5 капель 0,1% спиртового р-ра а -токоферола, прибавляют 0,5 мл 1% р-ра хлорида железа, тщательно перемешивают. Содержимое пробирки приобретает красное окрашивание.

Качественная реакция на викасол (реакция со щелочным раствором цистеина)

Известны две группы природных витаминов - K_1 и K_2, являющихся производными нафтохинона. Витамины K_1 - филлохиноны и K_2 - менохиноны. Викасол - искусственно синтезированный аналог витамина K_1, обладает биологической активностью витамина.



викасол

Принцип метода: викасол в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Реактивы: 1) викасол, 0,05% р-р; 2) цистеин, 0,025% р-р (хранят в холодильнике); 3) NaOH, 10% р-р.

Ход работы: на сухое часовое стекло наносят 5 капель раствора викасола, добавляют 5 капель раствора цистеина и 1 каплю 10% р-ра едкого натрия. Появляется лимонно-желтое-окрашивание.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ «ВИТАМИНЫ И КОФЕРМЕНТЫ»

1. Общая характеристика витаминов, классификация, номенклатура, роль в обмене веществ. Дайте биохимическую характеристику следующих витаминов:

2. Ретинолы (A_1, A_2, цис-формы A_1). Образование из α-, β-, γ-каротинов. Участие в процессах фоторецепции; роль в регуляции проницаемости мембран, транспорта, метаболизма; антиоксидантные свойства.

3. Кальциферолы (D_2, D_3, D_4). Основные функции в организме (регуляция транспорта и метаболизма ионов Са и Р).

4. Токоферолы (α-, β-, γ- и др.). Антиоксидантные свойства. Нарушения обмена веществ, обусловленные недостаточностью вит.Е.

5. Филло- и менахиноны (K_1 и K_2 ряд). Роль в процессах окислительного фосфорилирования, механизмах свертывания крови.

6. Тиамин (B_1) и его производные. Коферментные функции тиаминдифосфата, примеры и значение реакций с его участием.

7. Рибофлавин (B_2). Примеры и значение реакций с участием его коферментных производных — флавинмононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД).

8. Пиридоксин (B_6). Реакции с участием пиридоксаминфосфата и пиридоксальфосфата и их значение.

9. Никотиновая кислота (PP). Никотинамид и его коферментные формы (НАД, НАДФ). Участие в окислительно-восстановительных реакциях, фотосинтезе.

10. Кобаламин (B_{12}). Кобаламиновые или кобамидные коферменты (5-дезоксиаденозилкобаламин, метилкобаламин), участие в реакциях трансметилирования и изомеризации.

11. Аскорбиновая кислота (С). Участие в окислительно-восстановительных реакциях и реакциях гидроксилирования.

12. Биофлавоноиды (Р). Антиокислительное действие рутина и

других фенольных соединений.

13. Биотин (Н). Структура КоА и ацилпереносящего белка, их роль в реакциях метаболизма.

14. Фолиевая кислота (Вс). Примеры реакций с участием 5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты и их значение.

15. Липоевая, парааминобензойная, оротовая кислоты и их участие в метаболических процессах в организме.

16. Взаимодействие витаминов. Антивитамины (авидин, сульфаниламиды, кумарин и др.), механизмы их действия.