

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГБОУ ВО Брянский ГАУ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

**Учебно-методическое пособие
к лабораторным занятиям
Часть 1**

**Брянская область
2024**

УДК 577.11 (075)

ББК 28.072

Т 33

Талызина, Т. Л. **Биологическая химия**: учебно-методическое пособие к лабораторным занятиям. Ч. 1 / Т. Л. Талызина. - Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2024. - 48 с.

Учебно-методическое пособие содержит экспериментальные работы по дисциплине «Биологическая химия» раздел «Свойства биологически активных соединений». В лабораторных работах описан принцип метода исследования и методика проведения опыта. Имеются контрольные вопросы по темам для собеседования при защите лабораторных работ.

Данная разработка составлена в соответствии с компетентностными требованиями ФГОС ВО и предназначена для студентов очной и заочной формы обучения по специальности 36.05.01 Ветеринария и направлению подготовки бакалавриата 19.03.03 – Технология производства продуктов животноводства.

Рецензент: Мартынова Е.В. – кандидат биологических наук, доцент кафедры агрохимии, почвоведения и экологии БГАУ.

Рекомендовано к изданию учебно-методической комиссией института ветеринарной медицины и биотехнологии Брянского ГАУ протокол № 3 от 21 ноября 2024 года.

© Брянский ГАУ, 2024

© Талызина Т.Л., 2024

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая химия является одной из фундаментальных дисциплин, изучающих структуру, физико-химические свойства и функции живой материи, а также химические процессы, происходящие в живых организмах и лежащие в основе их жизнедеятельности.

Цель освоения дисциплины - сформировать у студентов системные знания о молекулярных механизмах функционирования биологических систем; обеспечить создание теоретической базы для дальнейшего изучения биологических и клинических дисциплин, связанных с созданием оптимальных условий содержания, кормления и эксплуатации животных, предупреждением заболеваний, оценкой здоровья, характера и степени нарушений деятельности органов и организма, определением путей и способов воздействий на организм в целях коррекции деятельности органов.

В результате освоения дисциплины студент должен:

Знать: предметную область дисциплины: биохимическую терминологию, строение и роль биологически активных соединений, особенности обменных процессов в организме животных при оптимальном и патологическом состоянии; актуальные направления научных исследований в области биохимии и физиологии для оптимизации метаболизма животных.

Уметь анализировать и обобщать имеющуюся информацию, отражающую состояние метаболизма; применять современные теоретические и экспериментальные методы исследований в учебной, научной и практической деятельности: спланировать и провести биохимический анализ, провести статистическую обработку полученных данных и сделать обоснованный вывод.

Владеть: способностью использовать знания, полученные при изучении дисциплины, для оценки и прогнозирования состояния обменных процессов в организме животных и человека и обладать способностью и готовностью к созданию новых перспективных средств в области ветеринарии и биологии

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. Выполнять работу всегда в халате, а при необходимости в перчатках.
2. Работать обдуманно, без спешки, оберегать от опасности товарищей.
3. Рабочее место держать в чистоте и опрятности. На лабораторный стол не класть ничего, кроме предметов, необходимых для работы.
4. Взятые для работы лабораторные приборы ставить на свое место.
5. Реактивы брать строго в количестве, указанном в описании работы.
6. Все опыты с ядовитыми и пахучими веществами следует проводить в вытяжном шкафу.
7. Не следует нюхать выделяющиеся при реакции газы. Их необходимо распознавать издали, слегка направляя ток воздуха к себе.
8. Следует нагревать пробирку, держа её отверстием от себя и от людей.
9. Запрещается избыток реактивов выливать из пробирок и колб обратно в склянку во избежание загрязнения всего реактива.
10. Запрещается стряхивать на пол из лабораторной посуды жидкости. Необходимо нейтрализовать случайно пролитые: кислоту – содой, щелочь – кислотой.
11. Запрещается проводить опыты со взрывчатыми и огнеопасными смесями. Опыты с малыми количествами легко воспламеняющихся веществ проводят вдали от огня.
12. Не пользоваться битой посудой. В стеклянных предметах края должны быть оплавленными.
13. Бумагу, фильтры, битую посуду следует выбрасывать в ведро.
14. Остатки концентрированных кислот, а также токсичных веществ выливают в специальные банки.
15. При ожогах кислотой нужно смыть пораженное место большим количеством воды, затем наложить компресс из марли, смоченной 2 % NaHCO_3 .
16. При ожогах щелочью нужно смыть пораженное место большим количеством воды, затем 2 % H_3BO_3 .
17. При термических ожогах нужно наложить компресс из ваты или марли на обожженное место, смоченный 5% раствором танина в 40% спирте.
18. При порезах стеклом поверхность смазать 3% раствором йода. Если кровотечение не останавливается, наложить тампон, смоченный 10% FeCl_3 .
19. При возникновении очага пожара гасить его с помощью песка, огнетушителя, кошмы. Средства огнетушения держать наготове.
20. После окончания работы следует вымыть посуду и привести в порядок рабочее место.

Лабораторная работа № 1

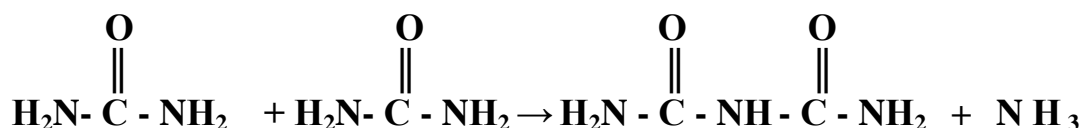
Качественные реакции на белки и аминокислоты

Цель работы. Изучить важнейшие качественные (цветные) реакции на аминокислоты и белки.

Реактивы, оборудование: 10% и 20% растворы гидроксида натрия, 1% раствор медного купороса, 0,5% водный раствор нингидрина, 1% раствор нингидрина в 95% растворе ацетона, конц. азотная и серная кислоты, реактив Миллона, реактив Фоля, 0,1% раствор фенола, ледяная уксусная кислота, 5% свежеприготовленный раствор нитропруссид натрия, 0,2% спиртовой раствор α -нафтола, раствор гипобромита натрия, крист. мочевины, 40% раствор мочевины, 0,01% раствор аргинина, 0,01% раствор тирозина, 0,005% раствор триптофана, раствор глиоксиловой кислоты, 1% раствор яичного белка, 1% раствор желатина, 10% раствор углекислого натрия, 1% раствор сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты (1:3), 5% раствор нитрита натрия; штативы с пробирками, держатели, спиртовки, стеклянные трубочки, пипетки.

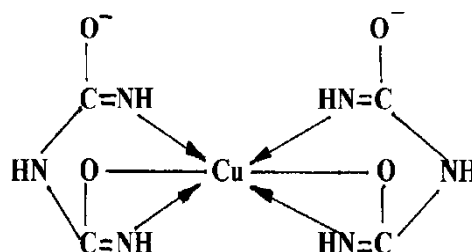
Опыт 1. Биуретовая реакция

Принцип реакции. Биурет – вещество, образующееся при нагревании мочевины и содержащее пептидные связи в молекулах. Если к раствору этого вещества добавить гидроксид натрия и несколько капель раствора медного купороса, то образуется продукт розового или сине-фиолетового цвета. Полученное окрашенное вещество называется биуретовым медным комплексом, а сама реакция получила название биуретовой.



мочевина

биурет



Биуретовый медный комплекс

Биуретовую реакцию могут давать все вещества, которые содержат не менее двух пептидных связей. Раствор белка в щелочной среде при взаимодействии с ионами меди также приобретает сине-фиолетовый цвет, а продукты не-

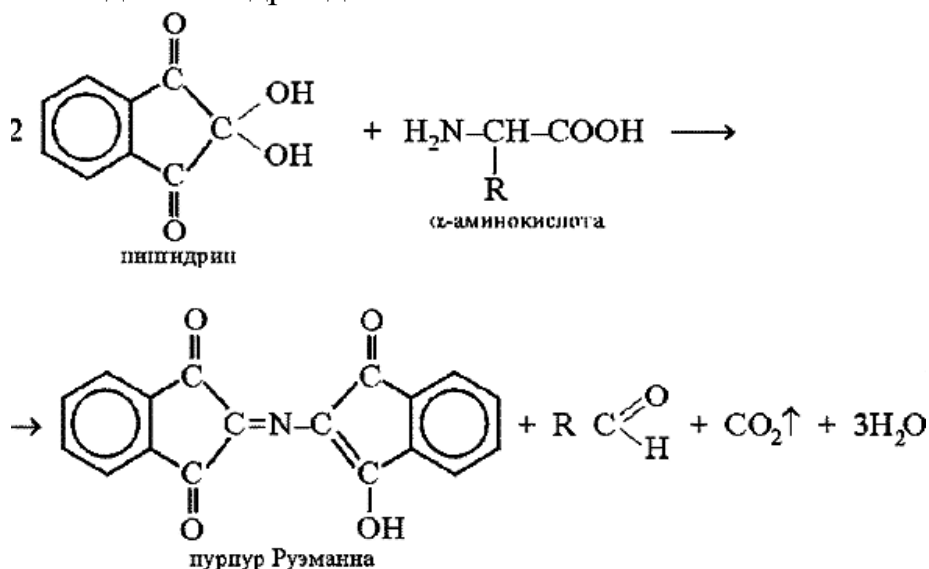
полного гидролиза белков дают розовое окрашивание. И в этом случае происходит образование биуретового медного комплекса.

Интенсивность окраски биуретового комплекса зависит от концентрации белка и количества медной соли в растворе, поэтому биуретовую реакцию можно использовать для определения концентрации белка в растворе.

Ход работы. К 1 мл 1% раствора яичного белка прибавляют 1 мл 10% раствора гидроксида натрия, 2-3 капли 1% раствора медного купороса и все перемешивают. Раствор приобретает фиолетовую окраску.

Опыт 2. Нингидриновая реакция ((реакция Руэмана).

Принцип реакции. Эту реакцию дают все аминокислоты, пептиды, белки, имеющие в α – положении аминогруппы. В результате взаимодействия α - аминокислоты с нингидрином образуется Шиффово основание, которое перегруппировывается, декарбоксилируется и в присутствии воды расщепляется на альдегид и аминодикетогидринден.



Аминодикетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина. Образующееся соединение после енолизации переходит в окрашенную форму, получившую название «сине-фиолетовый комплекс Руэмана». Если реакция протекает в среде с органическими растворителями (спиртом или ацетоном), то продукт этой реакции содержит в своем составе радикал исходной аминокислоты, который и обуславливает различную окраску этого продукта: голубую, красную, синюю, фиолетовую, а в присутствии пролина – желтую.

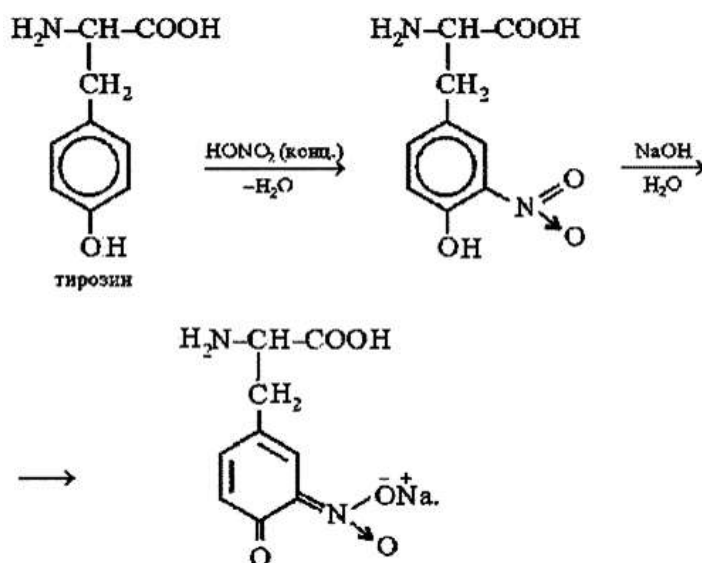
Эта реакция с раствором нингидрина в ацетоне или спирте используется для идентификации аминокислот после хроматографии, для открытия отдельных аминокислот и для определения их количества.

Ход работы. К 2 мл раствора белка добавляют несколько капель 0,5% водного раствора нингидрина и кипятят 1-2 мин. В пробирке появляется розово-фиолетовое окрашивание, а с течением времени раствор синее.

Аналогичную реакцию проделывают с раствором глицина и пролина.

Опыт 3. Ксантопротеиновая реакция

Принцип реакции. При добавлении к раствору белка концентрированной азотной кислоты появляется желтое окрашивание.



Если к полученному раствору добавить щелочь, то окраска переходит в оранжевую. Этой реакцией можно доказать присутствие в белке ароматических аминокислот: триптофана, тирозина, фенилаланина.

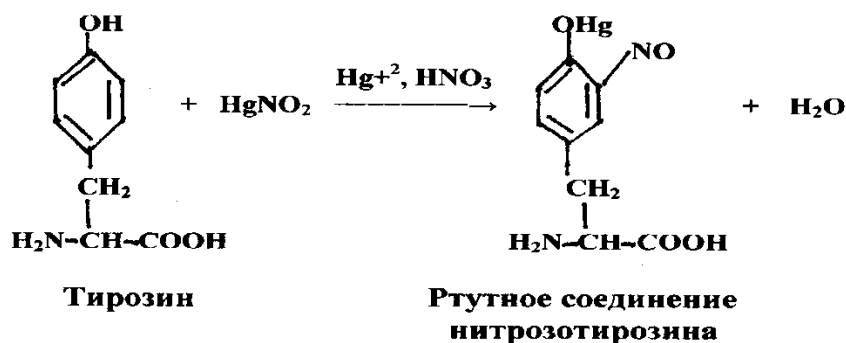
Ксантопротеиновая реакция не является строго специфичной. Так как она обусловлена нитрованием ароматического ядра, то ее дают многие ароматические соединения, не являющиеся аминокислотами, например, фенол.

В щелочной среде нитропроизводные аминокислот образуют соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет.

Ход работы. В одну пробирку наливают 2 мл раствора яичного белка, а в другую – 2 мл раствора желатина. В обе пробирки добавляют по 1 мл конц. азотной кислоты и нагревают. В первой пробирке образуется желтый осадок, а во второй – очень слабое окрашивание, так как желатин почти не содержит ароматических аминокислот. После охлаждения в каждую пробирку добавляют 20% раствор гидроксида натрия или концентрированный раствор аммиака до появления оранжевого окрашивания вследствие образования натриевой соли нитротирозина.

Опыт 4. Реакция Миллона

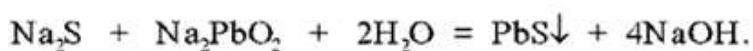
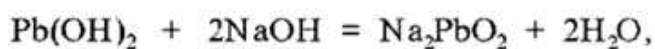
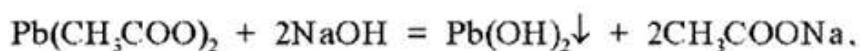
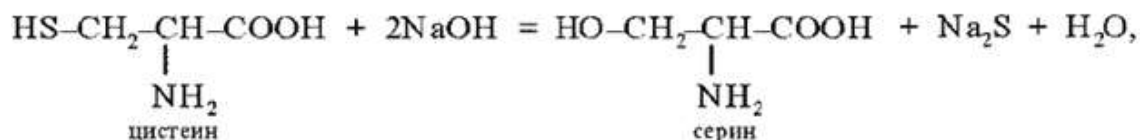
Принцип реакции. Аминокислота тирозин, а также белки, содержащие в своем составе эту аминокислоту, взаимодействуют с реактивом Миллона, (смесь нитратов и нитритов оксида ртути (I) и (II) в концентрированной азотной кислоте). При кипячении образуется кроваво-красный осадок ртутной соли динитротирозина. Белки, которые не содержат тирозина, такие как желатин, протамины, реакцию Миллона не дают.



Ход работы. Реакцию Миллона прodelьывают с тремя веществами: яичным белком, желатином и фенолом. В первую пробирку добавляют 2 мл 1% раствора яичного белка, во вторую – 2 мл 0,1% раствора фенола, в третью – 2 мл 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора Миллона и осторожно нагревают. В пробирке с яичным белком появляется кроваво-красное окрашивание, в пробирке с фенолом – красное, а в пробирке с желатином жидкость бесцветна или слегка желтеет.

Опыт 5. Реакция на слабосвязанную серу (реакция Фоля)

Принцип реакции. У белков, содержащих цистеин, при нагревании в щелочной среде происходит гидролиз сульфгидрильных групп с образованием сульфида натрия. Сульфид натрия с плюмбитом свинца дает черный или бурый нерастворимый осадок сульфида свинца. Реакция протекает по уравнению:

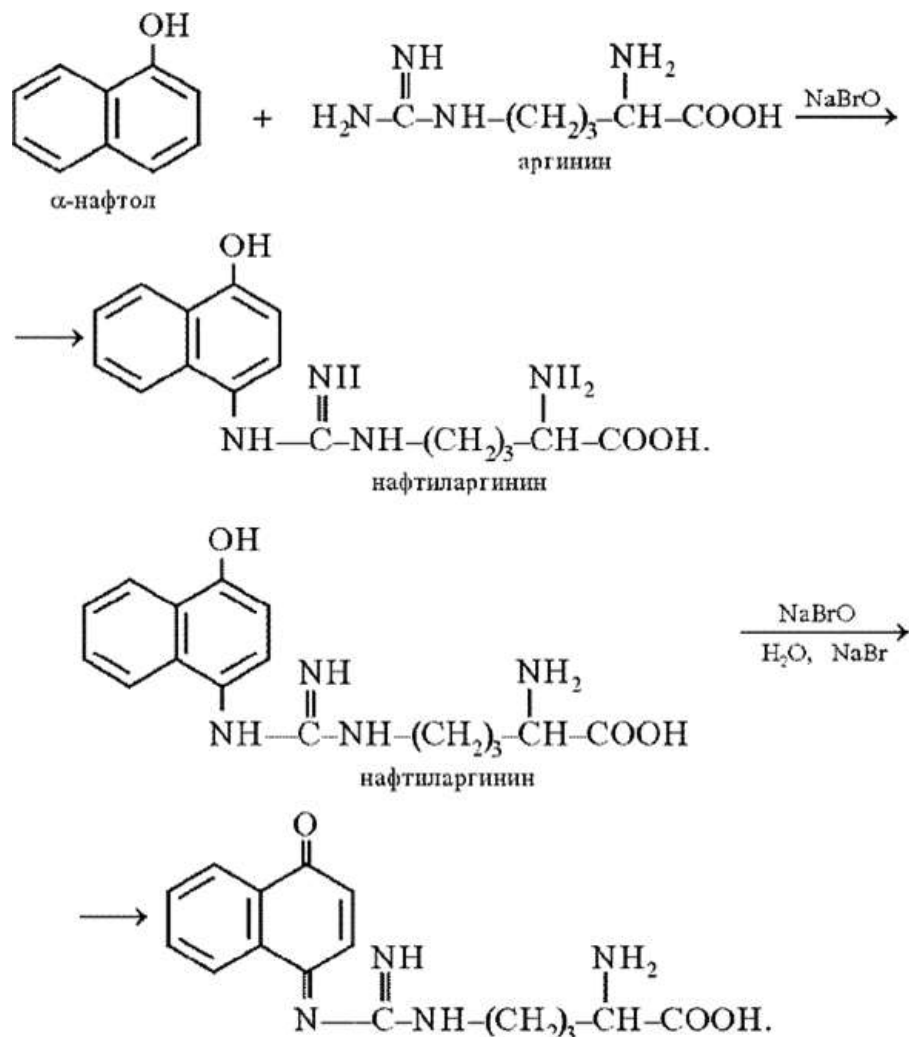


В аминокислоте метионин сера связана прочно, поэтому метионин в отличие от цистеина этой реакции не дает.

Ход работы. В пробирку налить 2 мл раствора белка и 2 мл реактива Фоля (к 5% водному раствору ацетата свинца добавляют 30% раствор гидроксида натрия до растворения образовавшегося осадка). Полученный раствор прокипятить, через 1 – 2 минуты появляется черный или бурый осадок сульфида свинца.

Опыт 6. Реакция Сакагучи

Принцип реакции. Эта реакция позволяет обнаруживать в белке аминокислоту аргинин. При взаимодействии аргинина с гипобромитом в щелочной среде в присутствии α -нафтола гуанидиновая группировка аргинина окисляется гипобромитом и образуется продукт конденсации розово-красного цвета.

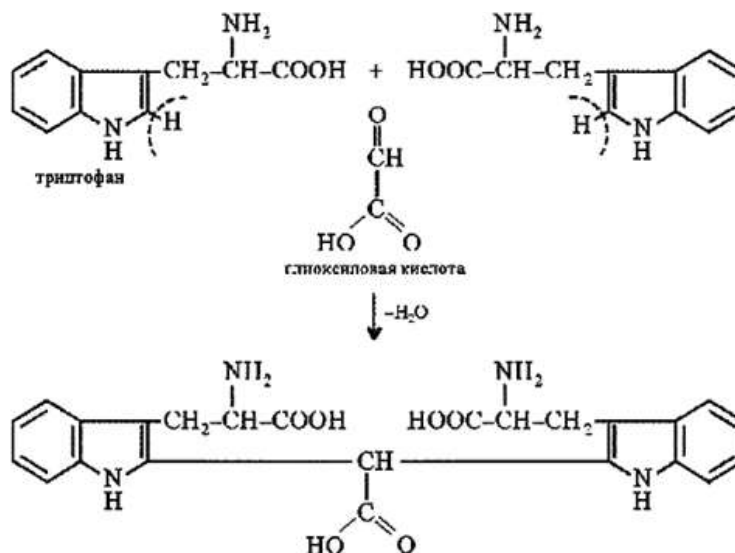


Образующийся нафтиларгинин может далее окисляться гипобромитом натрия с образованием соединения типа хинонимина. Не исключена, однако, вероятность образования еще более сложного соединения за счет дальнейшего окисления оставшихся NH-групп гуанидинового остатка и бензольного ядра α -нафтола.

Ход работы. Опыт проделывают с яичным белком и со свободным аргинином. В первую пробирку добавляют 2 мл 0,01% раствора аргинина, во вторую – 2 мл раствора яичного белка. В обе пробирки добавляют по 2 мл 10% раствора гидроксида натрия и по 2-3 капли 0,2% спиртового раствора α -нафтола, хорошо перемешивают и приливают в каждую пробирку по 2 мл гипобромита натрия. Для стабилизации быстроразвивающегося розово-красного окрашивания можно добавить 1 мл 40% раствора мочевины.

Опыт 7. Реакция на триптофан

Принцип реакции. Триптофан, реагируя в кислой среде с альдегидами, образует окрашенные продукты конденсации. Например, с глиоксиловой кислотой (являющейся примесью к концентрированной уксусной кислоте) реакция протекает по уравнению:

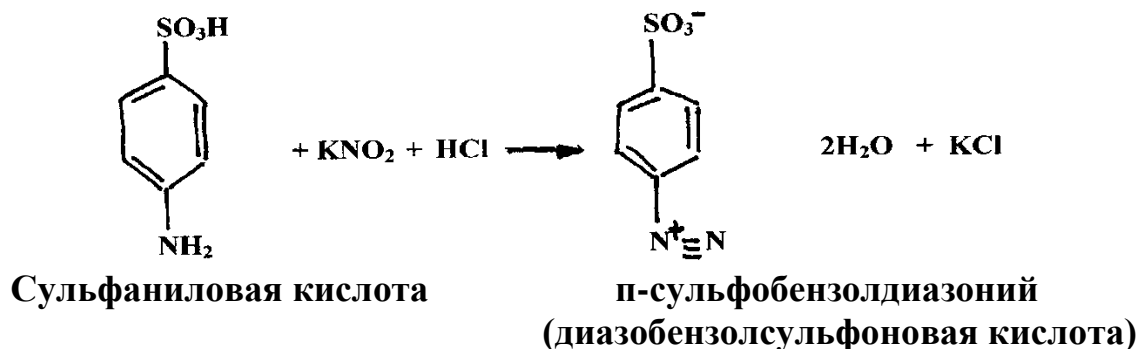


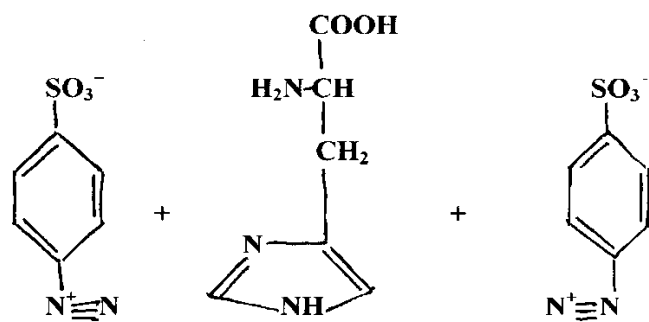
По аналогичной схеме протекает и реакция триптофана с формальдегидом.

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл 0,005% раствора триптофана, добавляют равный объем раствора глиоксиловой кислоты и 1 мл 0,04 М раствора сульфата меди. Осторожно по каплям прибавляют 2 – 3 мл конц. серной кислоты при охлаждении пробирки под струей водопроводной воды или во льду. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре и ставят на 5 мин в кипящую водяную баню. Развивается сине-фиолетовое окрашивание.

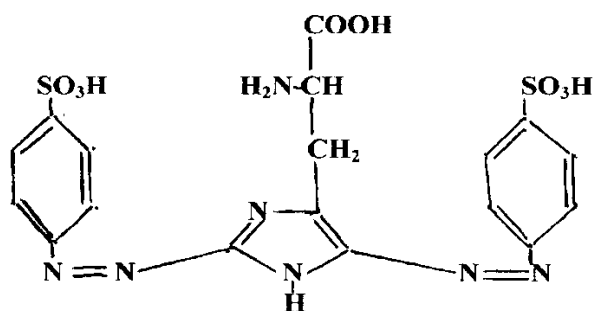
Опыт 8. Реакция Паули

Принцип реакции. При обработке диазореактивом в щелочной среде гистидин и тирозин образуют окрашенное в оранжевый цвет соединение:





Гистидин



2,5 – бис-п-сульфобензолазогистидин

Ход работы. В одну пробирку вносят 1 мл раствора тирозина, в другую – 1 мл раствора белка. В каждую добавляют по 2 мл диазореактива. (готовится перед опытом, смешиванием в отдельной пробирке 1% раствора сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты и 5% раствора нитрита натрия в соотношении 1:3). После этого в каждую пробирку добавляют 10% раствор углекислого натрия до появления желтой или оранжевой окраски, которая постепенно становится все более интенсивной.

Оформление работы

Необходимо в тетради привести название реакции, цель работы, название опыта, определяемое вещество, уравнение реакции, визуальные наблюдения (окраска раствора или осадка).

Сделать вывод основываясь на принципе реакции.

Оформить работу можно в виде таблицы (не обязательно)

Лабораторная работа № 2

Разделение аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге

Цель работы. Провести плоскостную хроматографию аминокислот. Рассчитать коэффициент R_f для отдельных аминокислот.

Реактивы и оборудование: Бутанол, ледяная уксусная кислота, стандартная смесь растворов аминокислот-свидетелей лизина, глицина, фенилаланина, 0,1 М растворы фенилаланина, глицина, лизина, 1% раствор нингидрина в ацетоне или в 96% этиловом спирте, хроматографические камеры, хроматографическая бумага, фильтровальная бумага, микропипетки, делительные воронки, колбы или стаканы на 50 мл, цилиндры мерные, линейки, ножницы, простые карандаши, иголки швейные, нитки, пластилин, стеклянные пластинки, сушильный шкаф или электрические плитки, пульверизатор или чашки Петри для проявления хроматограмм, таблицы со значениями R_f .

Принцип метода. Изучение аминокислотного состава различных биологических тканей представляет собой важную задачу. В настоящее время для анализа аминокислот с успехом применяются различные виды хроматографии, в том числе и распределительной.

Метод распределительной хроматографии на бумаге используется для разделения смесей разнообразных органических веществ, и основан он на различной растворимости веществ в разных несмешивающихся растворителях.

Если какое-нибудь растворенное вещество распределено между равными объемами двух несмешивающихся жидкостей, то отношение его концентраций в этих двух фазах в состоянии равновесия при данной температуре называют коэффициентом распределения.

$$\frac{\text{Концентрация вещества в растворителе 1}}{\text{Концентрация вещества в растворителе 2}} = \text{const (при данной } t)$$

Разделение веществ происходит вследствие различия в распределении их между двумя жидкими фазами, одна из которых подвижна, а другая – нет. Хроматографическая бумага обладает свойством поглощать воду из воздуха и задерживать ее между своими целлюлозными волокнами. Эту воду можно рассматривать как один из растворителей: она представляет собой неподвижную фазу. Когда по бумаге под действием капиллярных сил движется неводный растворитель (подвижная фаза), молекулы вещества, нанесенного на бумагу, распределяются между двумя фазами в соответствии с их коэффициентом распределения. Чем выше растворимость вещества в подвижной фазе, тем дальше оно продвинется по бумаге с растворителем и наоборот.

Расстояние, пройденное нанесенным на бумагу соединением в направле-

нии движения растворителя, характеризуется величиной R_f (коэффициент подвижности) и определяется следующим отношением:

$$\frac{\text{Расстояние, пройденное растворенным соединением}}{\text{Расстояние, пройденное фронтом растворителя}} = R_f$$

В стандартных экспериментальных условиях эта величина является для данного соединения постоянной и соответствует его коэффициенту распределения. Чем больше различие в величинах R_f разделяемых веществ, тем лучше их разделение.

Для определения расположения аминокислот после хроматографии бумагу высушивают, просматривают в ультрафиолетовом свете или опрыскивают раствором нингидрина и нагревают.

Все операции с бумагой продельвают тщательно вымытыми руками или в перчатках. В противном случае после проявления на бумаге выступает много пятен, не относящихся к аминокислотам, выделенным из биологического материала.

Ход работы:

1. Подготовка растворителя и хроматографической камеры

Для хроматографии используется специальная или приспособленная стеклянная камера с плоским ровным дном. На дно камеры наливается бутаноловый растворитель в таком количестве, чтобы на дне камеры образовался слой высотой 7 – 10 мл. Он готовится смешиванием бутанола, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:5. Жидкости помещают в делительную воронку, осторожно встряхивают и дают отстояться образовавшейся эмульсии. Нижний слой сливают через кран делительной воронки, а верхний слой используют для дальнейшей работы.

2. Разметка бумаги и нанесение на нее растворов

Берут лист хроматографической бумаги, соответствующий размерам хроматографической камеры. По высоте он должен быть на 1 см ниже верхнего края камеры, а по ширине – не касаться стенок камеры. На расстоянии 2 см от одного из узких концов листа бумаги простым карандашом проводят линию старта и на ней карандашом отмечают места нанесения аминокислот – свидетелей и идентифицируемых аминокислот. На другом конце бумаги в центре иголкой прокалывают отверстие и пропускают через него нитку, с помощью которой лист бумаги будет закрепляться в хроматографической камере. На этом же конце бумаги карандашом пишется фамилия студента.

В качестве аминокислот – свидетелей берут смесь растворов аминокислот, например, лизина, глицина и фенилаланина. Для идентификации берут растворы тех же аминокислот, но приготовленных по отдельности и не подписанных (готовятся перед опытом лаборантом или преподавателем). Микропипеткой в одно отмеченное место наносят каплю смеси растворов аминокислот – свидетелей, а в другое – каплю идентифицируемой аминокислоты. Диаметр пятна не должен превышать 1 см. Бумагу держат на воздухе до полного

высыхания пятен. В место, куда наносят идентифицируемую аминокислоту, можно нанести каплю раствора другой аминокислоты, но только после полного подсыхания первой.

Хроматографическую камеру ставят в отведенное место. Листок бумаги с нанесенными аминокислотами осторожно опускают в камеру с растворителем почти до дна и закрепляют листок в подвешенном состоянии с помощью нитки, концы которой можно закрепить кусочками пластилина. Растворителя в камере должно быть столько, чтобы он не касался нижнего края пятен нанесенных растворов. Необходимо проследить, чтобы бумага нигде не касалась стенок камеры. Камеру сверху накрывают стеклом. Хроматографирование проводят в течение нескольких часов до достижения фронтом растворителя верхнего края бумаги. После этого бумагу вынимают, карандашом отмечают фронт растворителя и оставляют сушить на воздухе.

3. Проявление хроматограммы и идентификация аминокислот

Высушенную хроматограмму проявляют под тягой раствором нингидрина, равномерно смачивая этим раствором ее поверхность. Для этого используют кисточку из ваты или пульверизатор. При проявлении нельзя класть хроматограмму на стол, она должна находиться «на весу». Нельзя брать за смоченную поверхность руками, остаются отпечатки пальцев. Пропитанную хроматограмму помещают в сушильный шкаф на 15 мин при 70° С или держат ее над горячей плиткой до полного проявления.

Аминокислоты обнаруживаются в виде сине-фиолетовых пятен. Идентификацию аминокислот проводят по совпадению на хроматограмме положения анализируемых аминокислот и аминокислот-свидетелей.

Аминокислоты – свидетели будут располагаться в следующем порядке: нижнее пятно соответствует лизину, среднее – глицину, верхнее – фенилаланину. Аминокислоты, располагающиеся на одном уровне, являются идентичными. Определение аминокислот можно осуществить и по значению Rf. Для этого измеряют расстояние от линии старта до линии фронта растворителя (В) и расстояние от старта до центра пятна идентифицируемой аминокислоты (А). Отношение А/В дает значение Rf для данной аминокислоты в данном растворителе.

В справочной литературе содержатся сведения по коэффициентам Rf для многих веществ, разделяемых в различных системах растворителей (Справочник биохимика, с. 912).

Оформление работы

Записывают в тетради порядок выполнения работы с краткими пояснениями, рассчитывают значения Rf для каждой аминокислоты, указывают, какая аминокислота находилась в анализируемом растворе, хроматограмму приклеивают в тетрадь.

Лабораторная работа № 3

Реакции осаждения белков

Цель работы. Изучить методы обратимого осаждения белков (высаливание) и необратимого (денатурация)

Реактивы и оборудование: раствор яичного белка, кристаллический сульфат аммония, насыщенный раствор сульфата аммония, 1% и 10% растворы уксусной кислоты, 10% раствор гидроксида натрия, концентрированные растворы соляной, серной и азотной кислот, 5% раствор трихлоруксусной кислоты, 20% раствор сульфосалициловой кислоты, 1% раствор медного купороса, 1% раствор ацетата свинца, насыщенный водный раствор фенола, раствор формалина, этиловый спирт, спиртовки пробирки, воронки, бумажные фильтры.

Опыт 1. Высаливание белков сульфатом аммония

Принцип метода. В водном растворе белков их частицы заряжены и гидратированы, что обуславливает устойчивость белковых растворов. Но при высокой концентрации солей, ионы которых тоже гидратируются, происходит разрушение водных оболочек белковых молекул, и снимается заряд с белковой молекулы адсорбирующимися на ней ионами солей. В результате этих двух процессов белковые растворы теряют устойчивость, частицы белка слипаются друг с другом, укрупняются и выпадают в осадок. При добавлении воды восстанавливается гидратная оболочка белка, осадок растворяется. Обратимое осаждение.

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл раствора белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, встряхивают. Выпадает осадок глобулинов. Раствор фильтруют. Одну часть фильтрата нагревают до кипения и наблюдают свертывание альбуминов, находящихся в растворе. К другой части фильтрата добавляют кристаллический сульфат аммония до насыщения. Появляется муть или хлопья выпадающих в осадок белков альбуминов. Если понизить концентрацию солей добавлением дистиллированной воды, то осадок альбуминов вновь растворится. Объясняется это тем, что осаждение белков определенными солями является обратимым процессом.

Из приведенного опыта следует, что для высаливания различных белков требуется разная концентрация одной и той же соли.

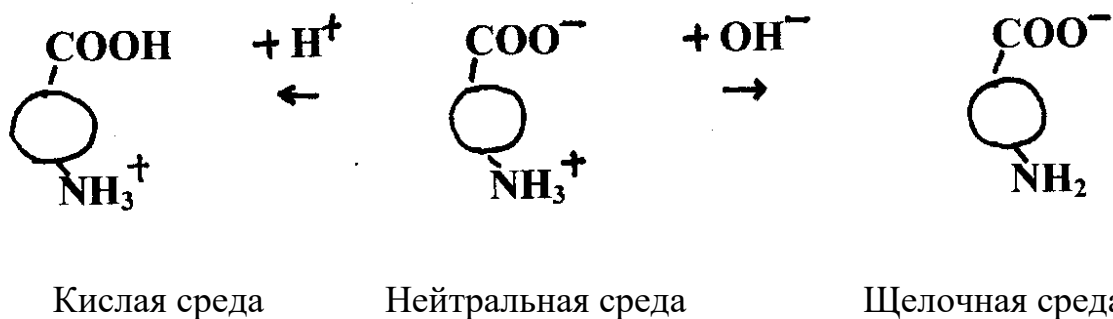
Необратимое осаждение (опыты 2-6)

Опыт 2. Осаждение белков при нагревании

Принцип реакции. Практически все белки при нагревании подвергаются денатурации. Но особенно быстро белки денатурируют вблизи их изоэлектри-

ческих точек (ИЭТ), то есть при том значении рН, когда суммарный заряд молекулы белка равен нулю. В этих условиях на молекулах белков имеется равное количество отрицательно и положительно заряженных групп. Благодаря этому белковые молекулы быстрее свертываются. ИЭТ яичных белков находится в слабо-кислой среде, поэтому добавление к раствору яичного белка небольшого количества слабой уксусной кислоты ускоряет свертывание белка при нагревании. Добавление к раствору белка нейтральных солей в кислой среде облегчает и ускоряет свертывание белков при кипячении благодаря дегидратации белковых молекул.

В кислой среде диссоциация белка по карбоксильным группам подавляется, молекулы заряжаются положительно, а в щелочной среде подавляется ионизация по аминогруппам, белки заряжаются отрицательно. И в том, и в другом случае молекулы отталкиваются друг от друга, и осадок не образуется даже при кипячении.



Ход работы. В пять пробирки наливают по 2 мл 1% раствор белка. Затем во вторую пробирку добавляют 2 капли 1% CH_3COOH , в третью – 2 капли 1% CH_3COOH и 2 капли насыщенного раствора NaCl , в четвертую – 2 капли 10% CH_3COOH , в пятую – 0,5 мл 10% NaOH . Содержимое всех пробирок довести до кипения. Отметить наличие осадка и скорость его образования.

Опыт 3. Осаждение белков минеральными кислотами

Принцип реакции. Белки при взаимодействии с концентрированными минеральными кислотами подвергаются необратимой денатурации и выпадают в осадок. В избытке серной и соляной кислот происходит постепенное растворение первоначально выпавших осадков. Избыток азотной кислоты практически не растворяет осадка белка, поэтому для обнаружения белка в исследуемом растворе пользуются азотной кислотой.

Ход работы. В три пробирки наливают по 2 мл концентрированной азотной, серной и соляной кислот. Затем осторожно по стенке добавляют в каждую пробирку по 1-2 мл раствора яичного белка. Наблюдают образование осадков белков на границе двух жидкостей. При перемешивании осадки, образующиеся при действии соляной и серной кислот, растворяются, а в растворе азотной кислоты осадка образуется еще больше.

Опыт 4. Осаждение белков органическими кислотами

Принцип реакции. Для осаждения белков часто используют органические кислоты, такие как сульфосалициловая и трихлоруксусная. Трихлоруксусная кислота осаждает только белки и не осаждает продукты распада белков и свободные аминокислоты, поэтому ею часто пользуются для полного удаления белков из биологических жидкостей.

Ход работы. В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка и добавляют в первую несколько капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты, а в другую – несколько капель 5% раствора трихлоруксусной кислоты. В обеих пробирках наблюдается образование осадков белка.

Опыт 5. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Принцип реакции. Соли тяжелых металлов вызывают необратимую денатурацию белков, образуя с ними нерастворимые в воде соединения. Но при избытке некоторых солей происходит растворение осадка за счет адсорбции ионов солей белковыми частицами. В результате белковые частицы приобретают заряд и вновь растворяются. Растворение осадков денатурированных белков в избытке солей тяжелых металлов называется адсорбционной пептизацией.

Способность белков образовывать с солями тяжелых металлов нерастворимые соединения используется при отравлениях этими солями, когда в качестве противоядия применяют молоко или яичный белок.

Ход работы. В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка. В одну добавляют несколько капель 10% раствора медного купороса, в другую – несколько капель 5% раствора ацетата свинца. В обеих пробирках белки денатурируют. При добавлении в пробирки избытка солей наблюдается растворение образующихся осадков.

Опыт 6. Осаждение белков фенолом и формалином

Ход работы. В три пробирки наливают по 1 мл раствора белка. В первую добавляют 1 мл насыщенного раствора фенола, а во вторую добавляют 1 мл раствора формалина. В пробирке, куда добавлен фенол, осадок образуется быстрее.

Оформление работы

Опыт 1 приводят полностью с объяснениями. Сделать вывод.

Результаты опытов 2-6 можно оформить в виде таблицы:

Название опыта	Название белка для опыта	Вещество, используемое для осаждения	Визуальные наблюдения	Вывод (основан на принципе метода)
----------------	--------------------------	--------------------------------------	-----------------------	------------------------------------

Лабораторная работа № 4

Разделение белков мышечной ткани методом диализа и высаливания

Цель работы. Изучить методы диализа и высаливания тканевых белков.

Реактивы и оборудование: мышечная ткань, 10% раствор хлорида натрия, насыщенный раствор хлорида натрия, кристаллический хлорид натрия, 10% раствор гидроксида натрия, 1% раствор сульфата меди, центрифуга, ступки, фильтры бумажные, пробирки, воронки, стаканчики или колбочки на 50 или 100 мл, стеклянные палочки и трубочки, цилиндры, марля, целлофановые мешочки, нитки, стаканы для диализа.

Принцип методов. Высаливание – обратимая реакция осаждения белков из растворов с помощью большой концентрации нейтральных солей: хлорида натрия, сульфата аммония, сульфата магния. При действии солей белковые частицы дегидратируются и быстрее выпадают в осадок. На процесс высаливания влияет ряд факторов: гидрофильность белка, его относительная молекулярная масса, заряд молекулы, в связи с чем для высаливания разных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей.

Альбумины и глобулины являются наиболее распространенными в природных объектах белками. Обычно они встречаются вместе, и отделение их друг от друга основано на различной их растворимости в воде и в различных по концентрации растворах минеральных солей.

Альбумины растворимы в воде и в крепких растворах солей (осаждаются лишь при более чем 50%-ом насыщении раствора солью), глобулины растворимы лишь в растворах солей средней концентрации (8–15%). В растворах с более высокой и более низкой концентрацией соли растворимость глобулинов уменьшается.

В мышечной ткани помимо альбуминов (растворимых в воде) и глобулинов (растворимых в солях средней концентрации) можно выделить белок миозин (основной сократительный фибриллярный белок мышечных волокон), актин – глобулярный белок. Эти два белка, а также еще тропонин и тропомиозин непосредственно участвуют в акте сокращения мышц. В мышечной ткани еще выделяют нерастворимые в воде и солях белки стромы – коллаген, эластин и другие.

Опыт 1. Выделение альбуминов из мышечной ткани

Ход работы. В ступке хорошо растирают 5 г мышечной ткани до образования однородной кашицы. Кашицу переносят в стаканчик или колбу и наливают 20 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают. При этом в раствор переходят альбумины, так как они в воде хорошо растворимы. С помощью марли отфильтровывают кашицу, и фильтрат дополнительно центрифугируют для удаления всех нерастворимых частиц мышечной ткани и белков. Осадок белков сохраняют для последующих опытов, а к центрифугату добавляют кри-

сталлический хлорид натрия до насыщения, альбумины при этом выпадают в осадок. Раствор с осадком альбуминов подвергают диализу.

Для диализа используют целлофановый мешочек длиной 10 см. Смачивают его водой, нижний конец завязывают ниткой. Через верхний конец мешочка вносят раствор с осадком альбуминов, стараясь не переносить в мешочек осадка хлорида натрия. В верхний конец вставляют стеклянную трубочку длиной 10-15 см, так, чтобы нижний конец трубочки был погружен в мешочек на 5-6 см. Мешочек прочно привязывают к стеклянной трубке.

К полученному диализатору привязывают в том же месте, но горизонтально другую стеклянную трубочку длиной 10-15 см, и в таком виде диализатор опускают в стакан с дистиллированной водой. Уровень воды в стакане не должен доходить до верхнего края мешочка. Мешочек не должен касаться стенок и дна стакана. Стакан с мешочком помещают на магнитную мешалку без нагревания и ведут диализ, периодически сменяя воду и проводя пробы на хлорид-ионы с помощью нитрата серебра.

Диализ будет завершен, когда проба на хлорид-ион станет отрицательной. Поскольку высаливание белков нейтральными солями процесс обратимый, то при диализе альбумины должны вновь перейти в раствор, так как в воде они хорошо растворимы. По окончании диализа раствор из мешочка переносят в пробирку и с раствором альбуминов проделывают биуретовую реакцию.

Опыт 2. Выделение глобулинов из мышечной ткани.

Ход работы. К оставшейся кашице из опыта 1 добавляют 20 мл 10% раствора хлорида натрия и хорошо перемешивают. При этом происходит экстракция глобулинов. Раствор с кашицей отфильтровывают через марлю. В фильтрате будут находиться глобулины, а в осадке на марле – белки стромы. С осадком белков стромы и с небольшой частью фильтрата проделывают биуретовую реакцию. Оставшийся фильтрат делят на две пробирки.

К одной части фильтрата добавляют равный объем насыщенного раствора хлорида натрия, получается полунасыщенный раствор, в котором выпадает осадок глобулинов. К другой части центрифугата добавляют порошок хлорида натрия до полного насыщения, при этом образуется осадок миозина.

Оформление работы

Составляют схему выделения всех белков мышечной ткани, а также таблицу, в которой указывают условия, при которых тот или иной белок находится в растворе или в осадке.

Для оформления опыта по диализу приводят рисунок диализатора.

Лабораторная работа № 5

Выделение казеина из молока

Цель работы. Изучить метод исследования и выделить казеин из молока

Реактивы и оборудование: 80 % уксусная кислота; молоко, колбы на 100 мл, капельницы, спиртовки, воронки, фильтры.

Краткая характеристика. Важнейшим белком молока является фосфопротеид казеиноген, содержание которого в коровьем молоке составляет 2,9 %. На казеиноген приходится около 80 % от всех белков молока. В молоке содержатся и простые белки: лактоальбумины и лактоглобулины (обычно суммарно не более 1%).

В качестве простетической группы казеиноген содержит ортофосфорную кислоту, связанную в белковой цепи по типу сложного эфира с остатком оксиаминокислот – серина и треонина; при этом в натуральном молоке водородные атомы фосфатной группы замещены кальцием.

Принцип метода. Казеиноген по своим свойствам является кислым белком, т.е. молекулы заряжены отрицательно. В слабокислой среде (изоэлектрическая точка) белок переходит в изоэлектрическое состояние. В этом состоянии белок проявляет наименьшую устойчивость и легко коагулирует, чему способствует нагревание до 70°C.

Ход работы. 25 мл молока разбавляют двойным объемом воды, прибавляют к смеси 3–4 капли 80 % уксусной кислоты и нагревают до 70°C, помешивая раствор плавными круговыми движениями. Выделяется казеин в виде белых крупных хлопьев.

Осадок белка переносят на фильтр, в фильтрате содержатся лактоальбумины и лактоглобулины. Осадок с фильтра переносят в стакан и промывают дистиллированной водой декантацией. Полученный казеин используют для определения изоэлектрической точки.

Этот метод осаждения используют для количественного определения казеина в молоке.

Оформление работы

Записывают в тетради цель работы, принцип метода и кратко порядок выполнения работы.

Лабораторная работа № 6

Определение изоэлектрической точки казеина

Цель работы. Изучить метод исследования и установить изоэлектрическую точку казеина

Реактивы и оборудование: 0,1 М, 0,2 М и 1 М растворы уксусной кислоты, 0,4 % раствор казеина в 0,2 М растворе ацетата натрия, 0,1 М раствор ацетата натрия, 1% раствор желатина, 96% этанол или ацетон, штативы, пробирки, фотоэлектроколориметр, кюветы, пипетки на 5 и 10 мл.

Принцип метода. Изоэлектрической точкой белка называется величина рН среды, при которой суммарный электрический заряд белка равен нулю. Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы, нейтральные молекулы белка легко выпадают в осадок. Вследствие этого определение изоэлектрической точки может быть сведено к определению рН раствора, при котором наблюдается наиболее полное и быстрое выпадение белка в осадок. Для получения растворов с различной величиной водородного показателя пользуются буферными растворами.

Опыт 1. Определение изоэлектрической точки казеина

Ход работы. В 7 сухих пробирок наливают последовательно реактивы в количествах (в мл), указанных в таблице 1.

Таблица 1

№ пробирок	Уксусная кислота, 0,2 М р-р, мл	Вода, мл	0,4% р-р казеина в 0,2 М р-ре ацетата натрия, мл	рН смеси
1	4,8	1,2	0,6	3,8
2	1,2	4,8	0,6	4,4
3	0,6	5,4	0,6	4,7
4	0,3	5,70	0,6	5,0
5	0,09	5,91	0,6	5,6

Растворы тщательно перемешивают. Казеин – гидрофобный белок, не имеет водной оболочки, менее устойчив и поэтому через 5-10 минут наблюдается помутнение растворов. Наибольшее помутнение наблюдается в той пробирке, где рН соответствует изоэлектрической точке казеина.

Если визуально определить пробирку с максимальным помутнением не удастся, следует использовать фотоэлектроколориметр. С помощью фотоэлектроколориметра нужно провести определение процента пропускания света (Т%) приготовленными растворами, мутность которых объясняется образованием осадков белков в виде стабильной суспензии.

Для этого за 15-20 мин до работы включают прибор, в дальнее кюветное отделение ставят кювету с дистиллированной водой, а в ближнее отделение ставят кювету с анализируемым раствором. Сначала свет пропускают через воду, стрелку прибора с помощью грубой и тонкой регулировки ставят на 100% пропускания света. Потом против пучка света ставят кювету с анализируемым раствором, определяют и записывают показания стрелки прибора (процент пропускания света).

Аналогичным образом определяют % пропускания света во всех пробирках. Пробирка, в которой пропускание света будет минимальным, соответствует изоэлектрической точке белка.

Оформление работы

Результаты опыта представляют на графиках, на которых по оси абсцисс откладывают значения рН, а по оси ординат откладывают обратные проценту пропускания света значения ($1/T$). Максимум на графиках будет соответствовать изоэлектрической точке казеина.

Лабораторная работа № 7

Качественные реакции на витамины

Цель работы. Изучить и провести качественные реакции на витамины.

Реактивы и оборудование: Витамины: ретинол, эргокальциферол, токоферол, тиамин, рибофлавин, аскорбиновая кислота; ледяная уксусная кислота, насыщенная сульфатом железа (II), концентрированная серная, соляная и азотная кислоты, раствор анилина в концентрированной соляной кислоте, бром в хлороформе (1:60), раствор хлорида железа (III), раствор красной кровяной соли, изобутиловый спирт, раствор сульфаниловой кислоты, 5% раствор нитрита натрия, 10% раствор карбоната натрия, металлический цинк, раствор метиленовой сини, 10% раствор соляной кислоты, штативы, пробирки, водяная баня, спиртовки, держатели для пробирок, флюороскоп.

В 1880 году русский ученый Н.И.Луниин установил, что для нормальной жизнедеятельности организма необходимы небольшие количества каких-то важных веществ, которые впоследствии польским ученым К. Функом были названы витаминами. Многие витамины входят в состав биологических катализаторов – ферментов, некоторые витамины действуют самостоятельно, другие выступают как активаторы ферментов. Был сделан вывод, что недостаток или отсутствие того или иного витамина приводит к нарушению обмена веществ в организме.

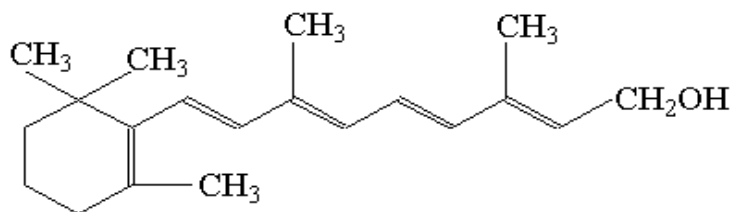
В настоящее время известно более 30 витаминов. Все они имеют различный состав и строение, обладают разнообразными физико-химическими свойствами. Все витамины делят на жирорастворимые и водорастворимые, что объ-

ясняется наличием в их составе неполярных и полярных группировок. Витамины вступают в разнообразные химические реакции, с помощью которых можно проводить их качественное и количественное определение.

Суточная потребность в витаминах мала: от десятых и сотых долей мг до нескольких мг. И только потребность в витамине С составляет около 1 мг на каждый кг массы тела.

Опыт 1. Качественная реакция на витамин А (Реакция Друммонда)

Краткая характеристика. Этот витамин относится к жирорастворимым витаминам и состоит из нескольких витамеров. Все витамеры являются производными каротинов и образуются только в организме животных. Каротины содержатся в овощах (перец, томаты, морковь, листовая зелень), витамин А - в сливочном масле, яичном желтке, печени, рыбьем жире. Недостаток витамина А вызывает нарушение роста, ослабление зрения (куриная слепота), поражение эпителиальных тканей (сухость, ксерофтальмия). Витамин А легко разрушается, особенно при нагревании. Суточная потребность человека в витамине А составляет 2,5 мг.



Витамин А₁ - ретинол (антиксерофтальмический)

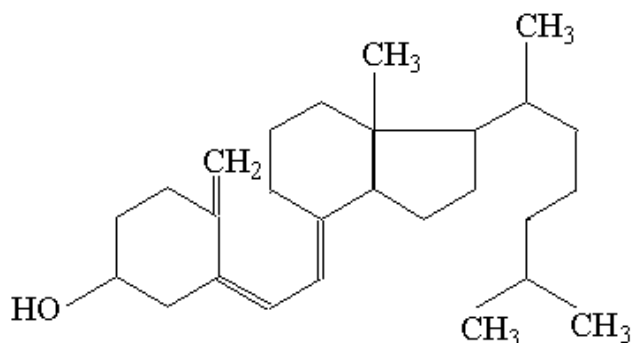
Ход работы. 2-3 капли раствора витамина А помещают в пробирку, быстро добавляют 1 мл хлороформа и 0,5 мл концентрированной серной кислоты. Появляется красно-фиолетовое окрашивание, переходящее в красно-бурое.

Опыт 2. Качественная реакция на витамин Д (бромхлороформная проба)

Краткая характеристика. Витамин Д относится к стероидам и является производным циклопентанопергидрофенантрена. Витамины группы Д существуют в виде нескольких витамеров. Наиболее распространенными являются витамин Д₂ – эргокальциферол и витамин Д₃ – холекальциферол.

Отсутствие этого витамина в пище приводит к возникновению рахита, что связано с нарушением нормального отложения фосфорнокислого кальция в костной ткани. Витамин Д₃ образуется в коже в организме человека из провитамина 7-дегидрохолестерола под действием ультрафиолетового излучения. Недостаток витамина Д проявляется у детей в виде поражения костной, мышечной и нервной систем (искривление костей нижних конечностей, деформация грудной клетки – «птичья грудь»), а у взрослых – в виде остеомалации и остеопороза, возникающих вследствие вымывания из костей солей кальция и фосфора.

Витамин Д содержится в рыбьем жире, сливочном масле, желтке яйца, печени животных, молоке. Суточная потребность человека в витамине Д составляет 0,0025 мг.



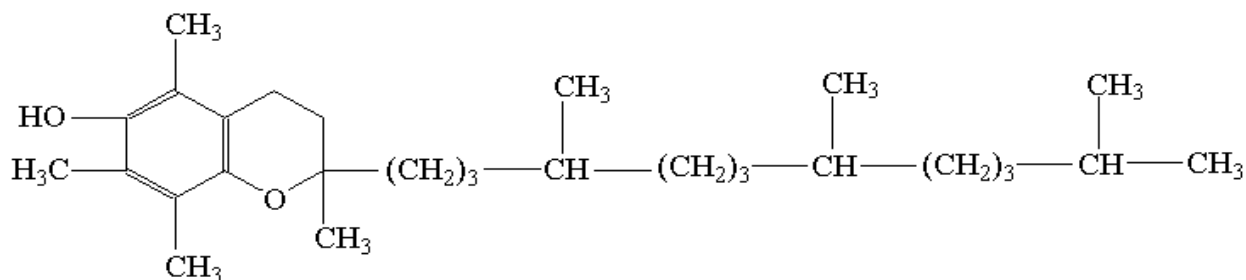
Витамин Д₃ - холекальциферол (антирахитический)

Ход работы. В сухую пробирку вносят 2-3 капли витамина Д и 1 мл раствора брома в хлороформе (1:60). В присутствии витамина Д постепенно появляется зеленовато-голубое окрашивание.

Опыт 3. Качественная реакция на витамин Е

Краткая характеристика. Витамин Е представлен несколькими витамерами, получившими название α -, β - и γ - токоферолов. Он устойчив к нагреванию и действию кислот, разрушается под действием ультрафиолетовых лучей. Необходим для нормального развития эмбриона в организме матери, регулирует нормальное функционирование и структуру многих тканей, является самым сильным природным антиоксидантом, прежде всего липидов. При Е – авитаминозе развивается мышечная дистрофия, дегенерация спинного мозга, паралич конечностей, нарушается эмбриогенез.

Источники витамина Е – растительные масла, зародыши злаков, зеленые листья растений. Суточная потребность в витамине у человека составляет 15 мг.



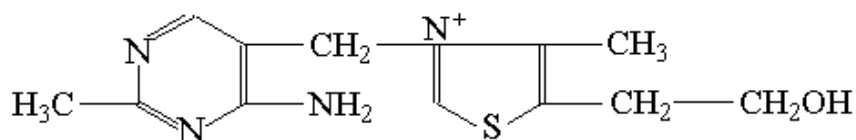
Витамин Е - токоферол (антистерильный)

Ход работы. В пробирку помещают 4-5 капель витамина Е, добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты и перемешивают. Образуется эмульсия, которая постепенно расслаивается: маслянистый верхний слой приобретает красную окраску. Окрашивание обусловлено окислением α – токоферола в токоферилхинон. Если окраска не появляется, необходимо осторожно нагреть пробирку.

Опыт 4. Качественная реакция на витамин В₁ (с диазореактивом)

Краткая характеристика. Этот витамин относится к водорастворимым витаминам, представляет собой мелкие бесцветные кристаллы горького вкуса. Устойчив при нагревании в кислой среде, но легко разрушается в щелочной среде. Этот витамин входит в состав фермента пируватдекарбоксилазы, катализирующего декарбоксилирование пировиноградной кислоты. При недостатке этого витамина происходит накопление в организме пировиноградной кислоты, являющейся сильным ядом для нервной системы. Развивающееся при этом заболевание получило название «бери-бери», или полиневрит, которое проявляется в прогрессирующей дегенерации нервных окончаний и проводящих пучков. Это приводит к потере кожной чувствительности нарушению моторики желудочно-кишечного тракта, сердечным болям и, в конечном итоге, к параличу и смерти.

Источником этого витамина для человека являются хлеб, особенно черный, крупы, внутренние органы животных, дрожжи. Суточная потребность в этом витамине у человека составляет 2 мг.



Витамин В₁ - тиамин (антиневритный)

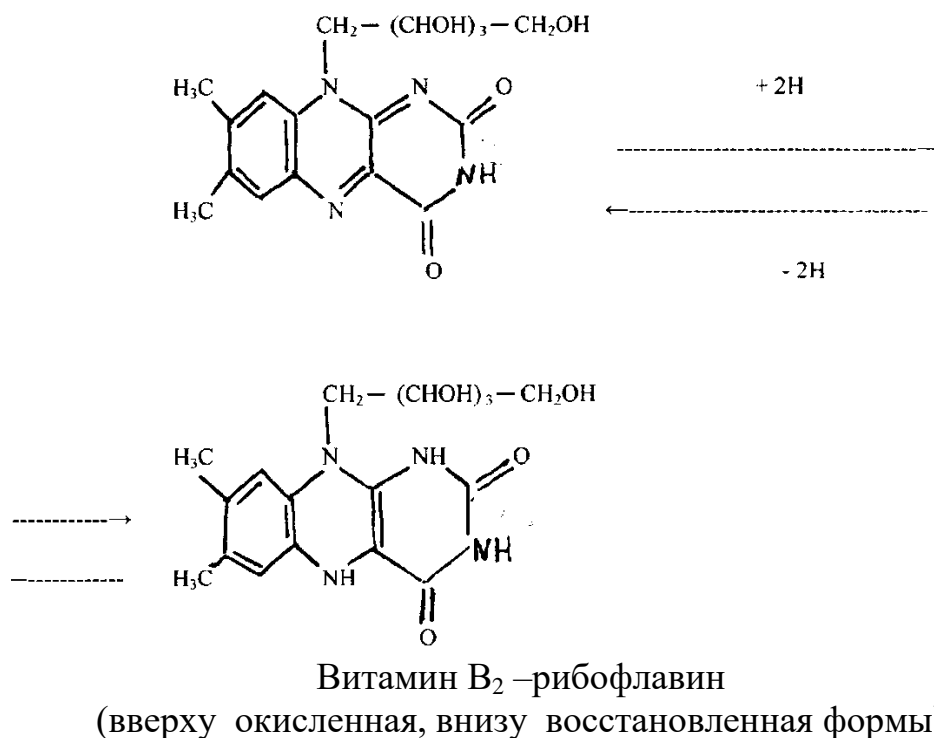
Ход работы. В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета. В пробирку помещают несколько кристаллов тиамин, добавляют 2 мл диазореактива, состоящего из 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты и 1 мл 5% нитрита натрия, а затем постепенно приливают 10% раствор карбоната натрия. В ходе реакции развивается интенсивная оранжевая окраска.

Опыт 5. Реакция восстановления витамина В₂

Краткая характеристика. Кристаллы рибофлавина имеют желто-оранжевый цвет, хорошо растворяются в воде, легко разрушаются при кипячении и на свету. Витамин рибофлавин способен легко окисляться и восстанавливаться, что лежит в основе биологического действия этого витамина. Он входит в состав коферментов (ФАД, ФМН) оксидоредуктаз, катализирующих окислительно-восстановительные реакции.

Недостаток витамина проявляется в остановке роста, поражении слизистых оболочек (особенно в уголках рта), понижении работоспособности, нарушении нормального синтеза гемоглобина. Источником витамина является молоко, зеленые овощи, внутренние органы животных, дрожжи. Суточная потребность человека в этом витамине составляет 2 мг.

Ход работы. В пробирку помещают несколько кристаллов витамина, добавляют 2 мл дистиллированной воды для растворения витамина, добавляют 2 мл концентрированной соляной кислоты и 2 – 3 кусочка цинка. Жидкость постепенно окрашивается в розовый, затем красный цвет. При отсутствии контакта с воздухом раствор постепенно обесцветится. Это обусловлено восстановлением рибофлавина выделяющимся водородом до бесцветного лейкофлавина. Если бесцветный раствор перелить в другую пробирку (удалить цинк), то вновь произойдет окисление восстановленной формы витамина до желтой, окисленной.

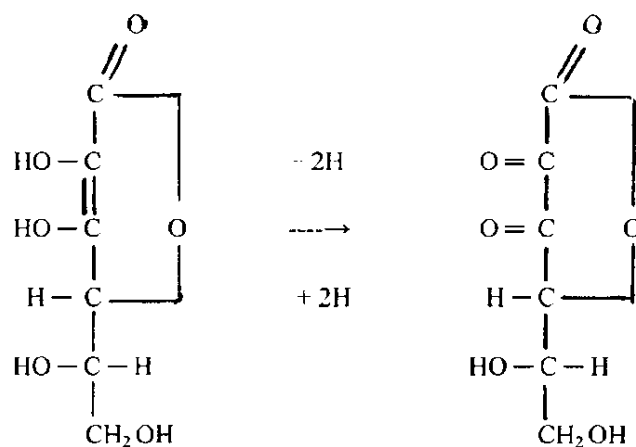


Опыт 6. Качественная реакция на витамин С

Краткая характеристика. Витамин С представляет собой бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в воде и спирте кислого вкуса. Аскорбиновая кислота легко разрушается в присутствии кислорода воздуха, в щелочных растворах, под действием ионов железа и меди. Витамин С участвует в окислительно-восстановительных процессах в организме, поскольку способен легко отдавать и присоединять два атома водорода.

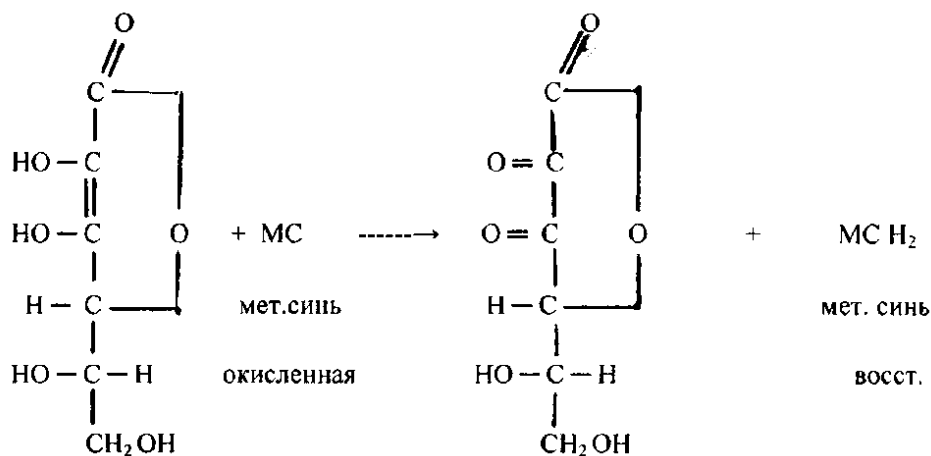
При недостатке витамина С у человека, обезьян и морских свинок развивается заболевание – цинга, которое проявляется в повышенной проницаемости и хрупкости кровеносных сосудов, спонтанных кровоизлияниях, а в конечном итоге, в разрушении зубов и десен. Это связано с его участием в синтезе белка соединительной ткани коллагена.

Аскорбиновую кислоту содержат самые разнообразные продукты растительного происхождения, но особенно много ее в плодах шиповника, черной смородине, облепихе, рябине, красном перце, лимонах, капусте. Суточная потребность человека в этом витамине составляет 75 – 100 мг.



Витамин С – аскорбиновая кислота
(слева – восстановленная, справа - окисленная формы)

Ход работы. Помещают в пробирку несколько кристаллов витамина С, растворяют в 2 мл дистиллированной воды, приливают 1 мл раствора метиленовой сини, перемешивают и ставят пробирку в стакан с водой (40°C). Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается за счет восстановления метиленовой сини в бесцветную лейкоформу, а аскорбиновая кислота окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты. Если бесцветный раствор энергично встряхнуть для контакта с кислородом, то он вновь приобретает синий цвет.



Оформление работы

Оформление работы рекомендуется сделать в форме таблицы, в колонках которой привести данные:

1. Название витамина, его химическая формула, название реакции;
2. Реактивы, условия проведения реакции, уравнение реакции;
3. Наблюдения и выводы.

Лабораторная работа № 8

Количественное определение каротина в сыворотке крови по Кари и Прейсу в модификации Юджина

Цель работы. Определить количество каротина в сыворотке крови КРС спектрофотометрическим методом.

Реактивы, оборудование: Сыворотка крови, этиловый спирт, петролейный эфир (или авиационный бензин) $K_2Cr_2O_7$ (720 мг/л, что соответствует по окраске 1 мг% каротина), спектрофотометр, штатив с пробирками, пипетки.

Краткая характеристика. Каротин — основной источник витамина А. Для клинических целей каротин определяют в сыворотке (плазме) крови крупного рогатого скота с 3-месячного возраста. У телят молочного периода его содержание в сыворотке крови очень низкое, поэтому анализы не имеют практического значения. У свиней, лошадей, овец и коз каротин в пищеварительном тракте всасывается только в трансформированной в витамин А форме, т. е. каротин через стенку кишечника не проникает, поэтому в крови, печени и молоке этих животных каротин не обнаруживают или находят следовые концентрации.

Концентрация каротина в крови крупного рогатого скота составляет в пастбищный период 1—2,8 мг%, в стойловый период 0,4—1,0 мг%. Снижение каротина наблюдается при дефиците его в кормах, плохом усвоении вследствие болезней желудочно-кишечного тракта, гепатитах и гепатозах, недостатке в рационах белка и легкоусвояемых углеводов, витамина В₁₂, разрушении каротиноидов вследствие порчи кормов, различных токсикозах, включая нитратные.

Принцип метода. Извлечение каротина из белков сыворотки (плазмы) производится петролейным эфиром или авиационным бензином. Экстинкции экстракта каротина измеряются на спектрофотометре (фотоэлектроколориметре). Расчет ведут по стандартному раствору калия двухромовокислого.

Ход работы:

1. Приготовление исследуемого раствора.

В пробирку внести 1 мл сыворотки крови, добавить 3 мл этанола для осаждения белков. Содержимое пробирки перемешать. Затем прилить 6 мл петролейного эфира (или авиационного бензина) для экстракции каротина. Энергично встряхивать 2 минуты. После этого добавить 2 мл $H_2O_{дист.}$ для лучшего расслоения жидкостей.

Верхний эфирный слой перенести в кювету спектрофотометра и колориметрировать с синим светофильтром ($\lambda = 460$ нм) в кювете толщиной слоя 1 см против дистиллированной воды.

2. Приготовление рабочего калибровочного (стандартного) раствора.

В пробирку внести 2,4мл раствора $K_2Cr_2O_7$ и добавить 2,6мл $H_2O_{дист.}$. Содержимое пробирки перемешать и колориметрировать в том же режиме.

Расчет произвести по формуле:

$$x = \frac{E_{пр}}{E_{к}} \cdot 1,0,$$

где x — количество каротина, мг%; $E_{пр}$ — экстинкция испытуемого образца; $E_{к}$ — экстинкция калибровочного рабочего раствора; 1,0 — коэффициент для пересчета в мг%.

Оформление работы

1. Записывают название работы, цель работы, принцип метода и порядок выполнения работы. Производят расчет. Делают вывод с учетом нормативных показателей. При отклонении от нормы описывают клиническое значение полученного показателя.

Примечание. Уровень каротина в сыворотке (плазме) крови при хранении снижается, что следует учитывать при проведении анализа и составлении вывода.

Лабораторная работа № 9

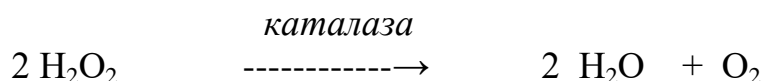
Качественные методы обнаружения ферментов

Цель работы. Изучить принцип метода исследований и провести качественные реакции на ферменты.

Реактивы и оборудование: 3% раствор пероксида водорода, кристаллический гидрохинон, насыщенный раствор тирозина, 5% раствор мочевины, 1% раствор сахарозы, фенолфталеин, красная лакмусовая бумага, сырой картофель, морковь, капуста, мясо, соевая мука, дрожжи, реактив Фелинга, центрифуга, ступки, песок, марля, воронки, пипетки, водяная баня.

Опыт 1. Обнаружение каталазы в мышечной ткани

Принцип метода. Перекись водорода может образовываться в организмах как конечный продукт дыхания, но поскольку в больших концентрациях перекись водорода является ядом для живых клеток, существуют ферменты, способные ее обезвреживать. К таким ферментам относится каталаза. Она расщепляет пероксид до воды и кислорода. Каталаза вызывает бурное выделение пузырьков кислорода при промывании ран пероксидом водорода. Содержится каталаза и в растительных объектах, например, в картофеле, моркови.

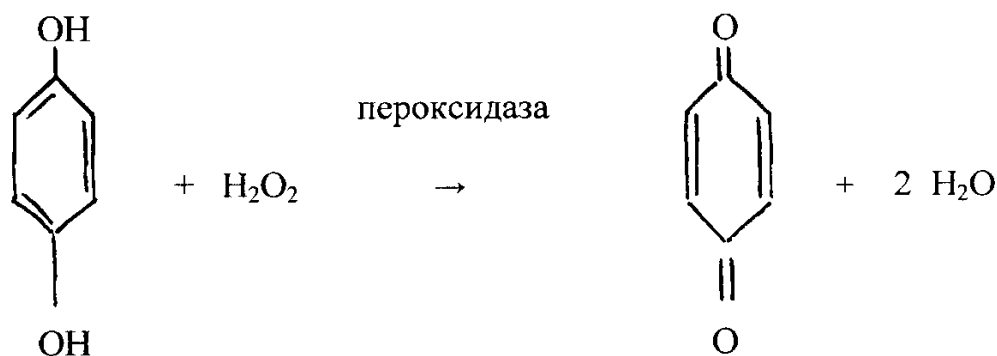


Ход работы. В пробирку помещают 0,5 – 1 г мышечной ткани, добавляют 2 мл дистиллированной воды и 1 мл 3% раствора пероксида водорода. Встряхивают пробирку и наблюдают выделение пузырьков газа. Используя тлеющую лучинку, можно доказать, что выделяющийся газ – кислород.

Опыт 2. Обнаружение пероксидазы в растительных тканях

Принцип метода. Некоторые ферменты выделяющийся в ходе разложения пероксида водорода кислород используют для окисления органических соединений. К таким ферментам относят пероксидазу. С помощью пероксидазы, содержащейся в больших количествах в растительных клетках, происходит окисление дифенолов в хиноны, в результате чего темнеет лежащий на воздухе очищенный картофель и другие растительные продукты. Много пероксидазы содержится в хрене, поэтому вместо картофеля можно использовать это растение.

Ход работы. В две пробирки наливают по 3 мл 3% раствора пероксида водорода. В одну из них помещают 2-3 кусочка свеженарезанного картофеля. В обе пробирки добавляют одинаковое количество кристаллического гидрохинона. Содержимое пробирок встряхивают. Через некоторое время наблюдают образование розово-красной окраски в пробирке с картофелем вследствие окисления гидрохинона в хинон перекисью водорода под действием пероксидазы.



Опыт 3. Обнаружение тирозиназы в картофеле

Принцип метода. Тирозиназа катализирует окисление фенолов и родственных по строению соединений. Она является металлопротеином, содержащим медь, которая служит переносчиком электронов от субстрата на кислород воздуха. Тирозиназа содержится в растениях, грибах, в отдельных органах и тканях животных.

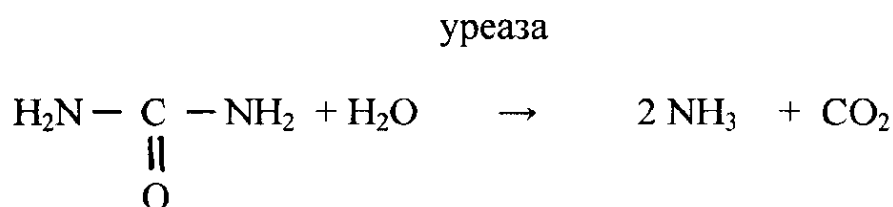
Ход работы. Несколько кусочков свежего картофеля растирают в ступке с чистым песком, добавляют в ступку 10 – 15 мл дистиллированной воды и фильтруют через двойной слой марли. Экстракт делят на две равные части. Одну часть в пробирке или колбочке кипятят для денатурации фермента.

В две пробирки наливают по 1 мл раствора аминокислоты тирозина. В одну пробирку добавляют первую часть некипяченого экстракта картофеля. Во вторую пробирку наливают охлажденный кипяченый экстракт. Обе пробирки ставят в водяную баню (40°C). Время от времени пробирки встряхивают. Через некоторое время наблюдают, что в первой пробирке раствор постепенно становится розово-красным, потом бурым и, в конце концов, черным. В пробирке с кипяченым экстрактом фермент не активен из-за денатурации и поэтому окисление тирозина происходит значительно медленнее.



Опыт 4. Обнаружение уреазы в соевой муке

Принцип метода. Уреаза гидролитически расщепляет мочевины на аммиак и углекислый газ. Реакция высокоспецифична. Фермент в значительных количествах содержится в сое.



Ход работы. В пробирку наливают 3 мл 5% раствора мочевины, добавляют 20 – 30 мг соевой муки и 2 капли фенолфталеина. Пробирку оставляют при комнатной температуре и наблюдают за появлением розовой окраски, что происходит вследствие смещения pH раствора в щелочную сторону за счет образования аммиака. За образованием аммиака также можно наблюдать по изменению окраски влажной красной лакмусовой бумажки, помещенной в отверстие пробирки. Через некоторое время бумажка синееет от выделяющегося аммиака, который можно обнаружить и по запаху.

Опыт 5. Обнаружение сахаразы в дрожжах

Фермент сахараза катализирует реакцию гидролиза сахарозы до глюкозы и фруктозы. Большое количество этого фермента содержится в дрожжах.

Ход работы. 2 – 3 г дрожжей растирают в ступке с чистым песком, добавляют 15 мл дистиллированной воды, настаивают при перемешивании 10

мин, сначала фильтруют через марлю, а потом центрифугируют 5 мин (3 тыс. об/мин). Полученный центрифугат используют для проведения опыта.

В две пробирки наливают по 1 мл раствора сахаразы – экстракта из дрожжей. Одну пробирку, контрольную, кипятят для разрушения фермента и охлаждают. В обе пробирки наливают по 2 мл 1% раствора сахарозы и ставят в водяную баню (40°C) на 10 – 15 минут.

По истечении времени в обеих пробирках проводят реакцию Троммера. Для этого в пробирку добавляют 1-2 мл 10% NaOH и 1-2 капли 1% CuSO₄. В пробирке с активным ферментом образуется красный осадок закиси меди, поскольку в ходе гидролиза образовалась глюкоза, которая восстановила медь из Cu⁺² до Cu⁺¹. В контрольной пробирке образование оксида не наблюдается.

Оформление работы

По каждому опыту описывается порядок его выполнения, записываются наблюдения и вывод.

Лабораторная работа № 10

Изучение свойств фермента амилазы слюны

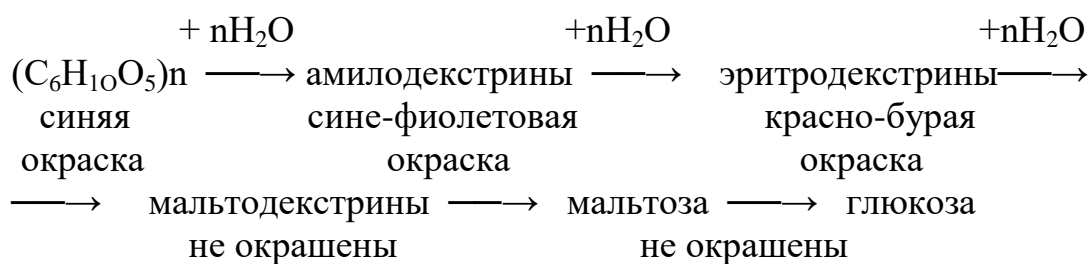
Цель работы. Приготовить раствор фермента амилазы слюны и изучить его специфические свойства (термолабильность, влияние pH среды, влияние активаторов и ингибиторов и специфичность действия).

Реактивы и оборудование: раствор I₂ в KI, 1%-ный раствор крахмала, раствор Фелинга, 1% раствор хлорида натрия, 1% раствор медного купороса, 0,1 М растворы гидрофосфата и дигидрофосфата калия, 1% раствор сахарозы, 10% раствор гидроксида натрия, пробирки, пипетки, бюретки, индикаторная бумага, прибор Алямовского, pH-метр, стеклянные трубочки, мерные цилиндры, пластинки с ячейками, стаканчики на 50 - 100 мл, воронки, водяные бани, стаканы, марля, лед, электроплитки, термометры, спиртовки, штативы.

Краткая характеристика. Ферменты амилазы катализируют реакции гидролиза крахмала, относятся к классу гидролаз. Различают несколько типов амилаз: α-, β- амилазы, глюкоамилазы, амило-1,6 – глюкозидазы. Они катализируют гидролиз α-1,4 и α-1,6 связей в полисахаридах и олигосахаридах с образованием в качестве конечных продуктов мальтозы и глюкозы.

В процессе гидролиза крахмала под действием амилаз происходит образование промежуточных продуктов – декстринов разной величины.

За ходом гидролиза можно наблюдать по изменению окраски с йодом. Молекулярная масса амилодекстринов ≈10000 (сине-фиолетовая окраска), эритродекстринов - 4000-6000 (от красно- бурого до красного) , мальтодекстринов - около 1000 (не дают окрашивания)



Приготовление разбавленной слюны

Ополаскивают рот водой 2-3 раза, и в чистый стаканчик собирают слюны столько, чтобы при ее разведении дистиллированной водой в 3 раза получилось 30 мл раствора. Полученный препарат амилазы фильтруют через марлю и используют для опытов.

Опыт 1. Влияние температуры на активность амилазы слюны

Принцип метода. При низкой температуре ферментативные реакции идут медленно. По мере повышения температуры скорость ферментативных реакций возрастает, причем с каждым повышением на 10 градусов скорость реакции возрастает в 2 – 3 раза (у небактериальных катализаторов в 2 – 4 раза). При достижении некоторого оптимума дальнейшее повышение температуры ведет к падению активности фермента и вследствие этого к снижению скорости ферментативных реакций. Объясняется это денатурацией ферментов, имеющих белковую природу. У большинства ферментов температурный оптимум лежит в пределах 40 - 60°C.

Ход работы. В 3 пробирки наливают по 2 мл раствора препарата фермента. Одну пробирку помещают в стакан со льдом, другую – в кипящую водяную баню, третью в термостат при 40°C. Пробирки при указанных температурах необходимо выдержать не менее 5 минут. После этого во все пробирки (не меняя температурных условий!), очень быстро добавляют по 4 мл раствора крахмала и хорошо перемешивают. Через 10 минут пробирки переносят в штатив на лабораторном столе и в каждую добавляют 1-2 капли раствора Люголя.

Результаты проведения опыта рекомендуется представить в форме таблицы:

№ пр-ки	Субстрат (крахмал), мл	Фермент (амилаза), мл	Температура, °С	Реакция с Люголем	
				цвет раствора	пол/отр (+/-)
1	4	2	0		
2	4	2	40		
3	4	2	100		

Результаты наблюдений анализируют и делают выводы о степени гидролиза крахмала в каждой пробирке.

Опыт 2. Влияние рН на активность амилазы слюны

Принцип метода. Известно, что ферменты проявляют свою максимальную активность при оптимальных значениях рН и очень чувствительны к изменению кислотности среды в которой они действуют. Изменение кислотности среды в ту или иную сторону от оптимума рН вызывает понижение активности фермента, что объясняется действием ионов водорода на ионизацию белковой молекулы, а, следовательно, на пространственную структуру фермента.

Ход работы. В три пробирки наливают по 4 мл буферных смесей соответственно с рН 5,0; 6,8 и 8,0, добавляют по 2 мл препарата фермента амилазы и по 4 мл раствора крахмала, тщательно перемешивают. После этого все пробирки помещают в термостат при 40°C. Через 10 минут в каждую пробирку добавляют 1-2 капли раствора Люголя.

Результаты проведения опыта представить в форме таблицы:

№ пр-ки	Субстрат (крахмал), мл	Фермент (амилаза), мл	рН	Реакция с Люголем	
				цвет раствора	пол/отр (+/-)
1	4	2	5,0		
2	4	2	6,8		
3	4	2	8,0		

Результаты наблюдений анализируют и делают выводы об оптимальных условиях гидролиза крахмала по величине рН.

Опыт 3. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны

Принцип метода. На активность ферментов оказывают воздействие активаторы и ингибиторы. Активаторы – это вещества, которые усиливают действие ферментов, а ингибиторы, наоборот, подавляют действие ферментов. В данном опыте предлагается экспериментально определить, какое из двух веществ – хлорид натрия или медный купорос является активатором, а какое – ингибитором фермента амилазы.

Ход работы. В две пробирки наливают по 2 мл препарата фермента амилазы. В первую пробирку добавляют 2 мл 1% раствора хлорида натрия, во вторую – 2 мл 1% раствора медного купороса. Во все пробирки добавляют по 4 мл раствора крахмала, перемешивают. После этого все пробирки помещают в термостат при 40°C. Через 10 минут в каждую пробирку добавляют 1-2 капли раствора Люголя.

Результаты проведения опыта представить в форме таблицы:

№ пробы	Субстрат (крахмал), мл	Фермент (амилаза), мл	Активатор (ингибитор), 2 мл	Реакция с Люголем	
				цвет раствора	пол/отр (+/-)
1	4	2	NaCl		
2	4	2	CuSO ₄		

Результаты наблюдений анализируют и делают вывод.

Опыт 4. Исследование специфичности амилазы

Принцип метода. Специфичность ферментов проявляется в том, что они катализируют преобразование только своего субстрата и не действуют на другие вещества.

Ход работы. В две пробирки наливают по 2 мл раствора амилазы, добавляют в первую пробирку 4 мл раствора крахмала, а во вторую – 4 мл раствора сахарозы. После этого все пробирки помещают в термостат при 40°C.

Через 15 минут с растворами в обеих пробирках прodelьывают реакцию Троммера. В пробирки добавляют по 1 мл 10% раствора гидроксида натрия, несколько капель 1% раствора медного купороса, перемешивают и нагревают до кипения. Выпадает желтый осадок гидроксида меди (I) или красный осадок оксида меди (I) вследствие окисления глюкозы и восстановления гидроксида меди (II).

Результаты проведения опыта представить в форме таблицы:

№ пробы	Субстрат (крахмал), мл	Субстрат (сахароза), мл	Фермент (амилаза), мл	Реакция Троммера	
				цвет раствора	пол/отр (+/-)
1	4	-	2		
2	-	4	2		

Результаты наблюдений анализируют и делают вывод.

Оформление работы

Написать название лабораторной работы, цель работы, название опыта, результаты проведения опыта (таблица), вывод.

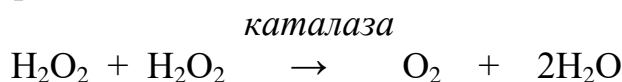
Лабораторная работа № 11

Определение активности фермента каталазы перманганатометрическим методом

Цель работы. Приготовить раствор каталазы из растительного сырья и рассчитать активность фермента.

Реактивы и оборудование: растительные объекты для исследования – свежие капуста, картофель, морковь, перец, лук, чеснок и др., 0,1 н раствор пероксида водорода, 0,1 н раствор перманганата калия, 10% раствор серной кислоты, порошок карбоната кальция, песок, ступки, марля, воронки, центрифуга, колбы или стаканчики, плитка, пипетки, бюретки для титрования, цилиндры, весы технические.

Принцип метода. Фермент каталаза катализирует реакцию разложения пероксида водорода:



Каталаза относится к одному из самых активных ферментов. 1 моль фермента способен катализировать превращение 10^7 моль субстрата в минуту.

Каталаза найдена во всех типах клеток с аэробным типом обмена. Считают, что функция каталазы заключается в разрушении пероксида водорода, ядовитого для организма.

Определение активности фермента можно проводить газометрическим методом, определяя объем кислорода, выделившегося при разложении каталазой пероксида водорода. В перманганатометрическом методе расчет активности фермента основан на определении количества оставшегося после действия каталазы пероксида водорода, который определяется титрованием раствором перманганата калия.

Для предотвращения инактивации фермента субстратом реакцию ведут при низких концентрациях пероксида водорода. Оптимум рН каталазы – 7,6.

Ход работы:

1. Получение препарата фермента каталазы

Взвешивают на весах 4-5 г свежего растительного материала (картофель, морковь, перец и др.), растирают в ступке с чистым песком, добавляя 4-5 мл дистиллированной воды. Поскольку каталаза более активна при рН 7,6, для уменьшения кислой реакции добавляют на кончике шпателя порошок карбоната кальция до прекращения выделения пузырьков углекислого газа.

Полученную массу количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки. Для экстракции препарата фермента колбу оставляют на 10 минут, периодически помешивая, после чего вытяжку сначала фильтруют через двойной слой марли, а потом центрифугируют 5 мин при 3 тыс. об/мин. Осадок отбрасывают, а центрифугат используют в опыте.

2. Определение активности каталазы методом перманганатометрии.

Приготавливают две колбы или стаканчика на 100 – 200 мл. В обе колбы добавляют по 20 мл препарата фермента, одну из них (контроль) ставят на плитку и нагревают до кипения для инактивации фермента, после чего охлаждают.

После этого в обе колбы быстро добавляют по 25 мл 0,1 н раствора пероксида водорода. С этого момента замечают время и оставляют колбы на столе на 30 минут. По окончании этого времени действие фермента прекращают добавлением 5 мл 10% раствора серной кислоты.

Растворы в обеих колбах титруют 0,1 н раствором перманганата калия до образования устойчивой в течение примерно 30 сек розовой окраски. Отмечают количество мл затраченного на титрование не разложившегося пероксида водорода, как в опытной, так и в контрольной пробе.

По разности между контрольным и опытным титрованием находят количество перманганата, эквивалентное количеству разложенного ферментом пероксида водорода.

Расчет количества пероксида водорода, разложенного ферментом, ведут в соответствии с уравнением реакции:



согласно которому 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг пероксида водорода.

Пример расчета: для опыта взяли 1,25 г моркови, из которой приготовили 100 мл вытяжки. На титрование опытной пробы затратили 15,5 мл, а контрольной 24,2 мл 0,1 н раствора перманганата калия. Количество разложенного пероксида водорода в пробе эквивалентно $24,2 - 15,5 = 8,7$ (мл) 0,1 н раствора перманганата калия и, следовательно, равно $8,7 \cdot 1,7 = 14,8$ (мг).

В 1 г сырой моркови содержится количество каталазы, способное за 30 минут разложить

$$\frac{14,8 \cdot 100}{20 \cdot 1,25} = 59,16 \text{ (мг) H}_2\text{O}_2, \text{ а за 1 минуту} - \frac{59,16}{30} = 1,97 \text{ (мг)}$$

Так как 1 мкмоль пероксида водорода составляет 0,034 мг, то активность каталазы, выраженная в мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин} \cdot \text{г}$ сырого веса моркови, составляет $1,97 : 0,034 = 58,0$ единиц.

Таким образом, для расчета активности каталазы можно составить формулу:

$$A = \frac{(V_2 - V_1) \cdot n \cdot C}{m \cdot C_1 \cdot t \cdot 0.034}$$

A — активность каталазы (мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин} \cdot \text{г}$ сырого веса моркови);

V_2 — количество перманганата калия, пошедшее на титрование контрольной пробы, мл;

V_1 — количество перманганата калия, пошедшее на титрование опытной пробы, мл;

n – количество пероксида водорода, эквивалентное 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия, мг;

m – навеска растительного материала, г;

C – объем приготовленной вытяжки, мл;

C_1 – объем смеси, взятой для опыта, мл;

t – время опыта, мин,

0,034 – количество пероксида водорода, соответствующее его 1 мкмоль, мг.

Оформление работы

1. В тетради записывают порядок приготовления вытяжки фермента
2. Приводят уравнение катализируемой реакции и уравнение реакции взаимодействия пероксида водорода с перманганатом калия в кислой среде.
3. Записывают все данные, необходимые для расчета активности фермента, и приводят расчет активности каталазы.
4. Сравнивают активность каталазы в разных объектах и делают соответствующие выводы.

Лабораторная работа № 12

Гидролиз нуклеопротеинов

Цель работы. Провести гидролиз нуклеопротеинов из дрожжей и установить качественный состав продуктов гидролиза

Реактивы и оборудование: дрожжи, эфир, 10%, 20% и 0,1н раствор гидроксида натрия, 3% раствор уксусной кислоты, 10% раствор серной кислоты, концентрированная серная кислота, 1% и 5 % раствор медного купороса, спиртовой раствор α -нафтола, 2% раствор азотнокислого серебра, концентрированный раствор аммиака, молибденовый реактив, 1% раствор дифениламина, песок, ступки, колбочки с обратным воздушным холодильником на 50 мл, воронки, стеклянные палочки и трубочки, пипетки, стаканы, пробирки, штативы, плитки или песчаная баня, марля, центрифуга, бумажные фильтры, спиртовки, лакмусовая бумага.

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные органические вещества, структурным звеном которых является нуклеотид. Нуклеотид в свою очередь состоит из азотистого основания, рибозы или дезоксирибозы и фосфорной кислоты. Нуклеиновые кислоты в организмах, как правило, образуют комплексы с белками, которые называются нуклеопротеинами.

В живых организмах гидролиз нуклеопротеинов осуществляется при действии ферментов. В лабораторных условиях гидролиз нуклеопротеинов можно осуществить при нагревании в 10% растворе серной кислоты.

Опыт 1. Выделение нуклеопротеинов из дрожжей и их гидролиз

Принцип метода. Дрожжи помимо нуклеиновых кислот содержат свободные углеводы, белки, фосфаты и другие соединения, которые предварительно необходимо удалить. 10 г сухих дрожжей помещают в ступку и растирают с песком до порошкообразного состояния. Далее в ступку добавляют около 5 мл эфира, предварительно убедившись в отсутствии работающих горелок и включенных электроплиток! Растирание проводят под тягой до полного испарения эфира. Эфир разрушает клеточные оболочки, после чего нуклеопротеины можно извлечь раствором едкого натрия.

Ход работы:

1. Выделение нуклеопротеинов из гидролизата дрожжей

В ступку добавляют 20 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, стеклянной палочкой тщательно гомогенизируют смесь, оставляют на 5 минут, фильтруют через марлю для удаления крупных неразрушенных частиц и удаления песка. После этого центрифугируют 5 минут при 3 тыс. об/мин.

После центрифугирования осадок отбрасывают, а к раствору, содержащему нуклеопротеины, добавляют двойной объем 3% уксусной кислоты. В этих условиях нуклеопротеины выпадают в осадок. Вновь центрифугируют при тех же условиях. Центрифугат сливают, а осадок из центрифужных пробирок переносят в колбу на 50 мл. Для этого в центрифужную пробирку с осадком добавляют 2-3 мл дистиллированной воды, тщательно соскабливают осадок со стенок и дна пробирки стеклянной палочкой и переносят в колбу.

В колбу добавляют 30 мл 10% раствора серной кислоты, закрывают пробкой с обратным воздушным холодильником и осторожно кипятят на плитке в течение 30 минут. По окончании гидролиза колбу охлаждают, раствор фильтруют через бумажный фильтр и проводят качественные реакции на составные части нуклеопротеинов.

2. Качественные реакции на продукты гидролиза

Биуретовая реакция на белки

К 2 мл гидролизата приливают 3 мл 10% раствора гидроксида натрия до щелочной реакции по лакмусовой бумажке, затем добавляют несколько капель 1% раствора медного купороса. Появляется розовая или розово-фиолетовая окраска.

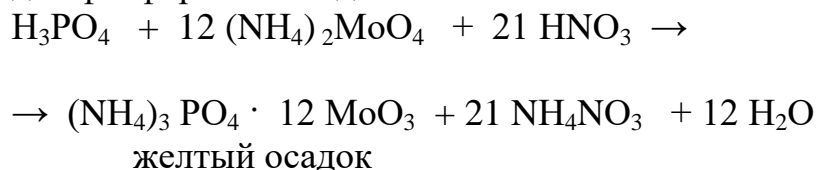
Реакция на дезоксирибозу и рибозу с дифениламином

Дифениламин с дезоксирибозой дает синее окрашивание, а с раствором рибозы – зеленое. К 2 мл гидролизата добавляют 4 мл 1% раствора дифениламина и кипятят в водяной бане в течение 15 минут; при этом образуется сине-зеленое окрашивание.

Молибденовая проба на фосфорную кислоту

К 3 мл гидролизата приливают 4 мл молибденового реактива и кипятят. При этом жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. Пробирку охлажда-

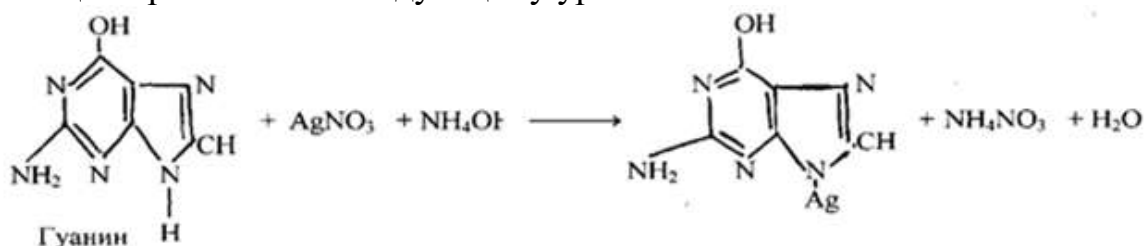
ют под холодной водой. На дне пробирки образуется кристаллический лимонно-желтый осадок фосфорномолибденового окисного аммония:



Серебряная проба на пуриновые основания

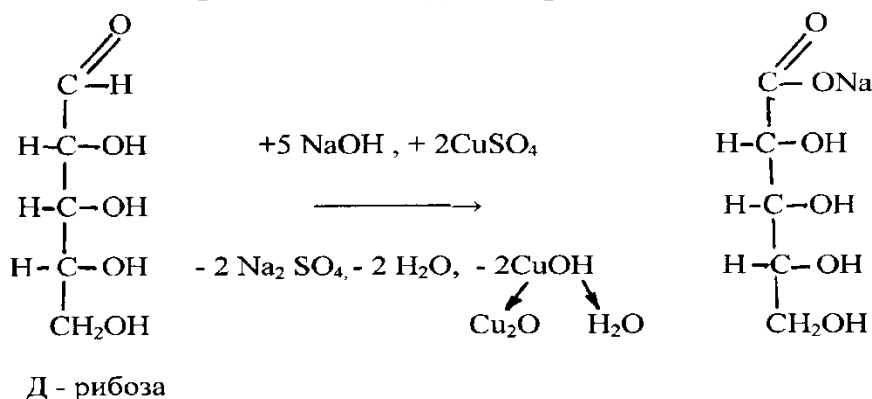
2 мл гидролизата добавляют крепкий раствор аммиака до щелочной реакции по лакмусу, затем добавляют 1 мл 2% раствора нитрата серебра. При стоянии через 3-5 минут образуется светло-коричневый осадок серебряных солей пуриновых оснований.

Реакция протекает по следующему уравнению:



Реакция Троммера на рибозу и дезоксирибозу

К 2 мл гидролизата добавляют 4 мл 20% раствора гидроксида натрия и 1-3 капли 5% раствора медного купороса до появления не исчезающей мути гидроксида меди (II). Раствор в пробирке перемешивают. При нагревании до кипения выпадает желтый осадок гидроксида меди (I) или красный осадок оксида меди (I)



Оформление работы

В тетради записывают порядок выполнения работы. Результаты опытов по качественным реакциям на продукты гидролиза можно представить в виде таблицы, в которой указать:

1. Название реакции, условия выполнения опытов, уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Лабораторная работа № 13

Качественные пробы на липиды и продукты их обмена

Цель работы. Изучить и провести качественные реакции на липиды.

Реактивы и оборудование: говяжий жир, желчь, раствор яичного белка, растительное масло, 1% раствор мыла, 1% раствор сахарозы, концентрированная серная кислота, 10% раствор гидроксида натрия, 10% раствор нитропруссиды натрия (свежеприготовленный), ледяная уксусная кислота, раствор йода в йодиде калия, концентрированный и разбавленный раствор аммиака, безводный гидросульфат калия, бромная вода, 1% раствор азотнокислого серебра, глицерин, 2% раствор медного купороса, насыщенный раствор хлорида натрия, штативы, пробирки, колбочки на 50 мл с обратным воздушным холодильником, воронки, фильтры. Пипетки, плитки.

Краткая характеристика. К липидам относят вещества, нерастворимые в воде, но растворимые в органических растворителях. В составе липидов обнаружены разнообразные спирты, остатки высших жирных кислот, фосфорная кислота, азотистые основания, углеводы и другие соединения. В зависимости от состава, строения и роли в организме липиды классифицируют на следующие группы.

К простым относят нейтральные жиры (глицериды) – сложные эфиры высших жирных кислот и трехатомного спирта глицерина; воски – сложные эфиры высших жирных кислот и высших спиртов; стериды – сложные эфиры высших жирных кислот и полициклических спиртов – стеролов.

К сложным относят фосфолипиды, состоящие из жирных кислот, спиртов, фосфорной кислоты и азотистых оснований; гликолипиды, состоящие из спиртов, жирных кислот и углеводов; к сложным относят диольные липиды и орнитинолипиды, в составе которых имеются как простые, так и сложные липиды.

Простые и сложные липиды подвергаются омылению, так как содержат сложные эфирные связи.

Среди липидов обнаружены и такие, которые, как и все липиды, нерастворимы в воде, но являются неомыляемой фракцией. Это свободные жирные кислоты, разнообразные спирты, жирорастворимые витамины и другие.

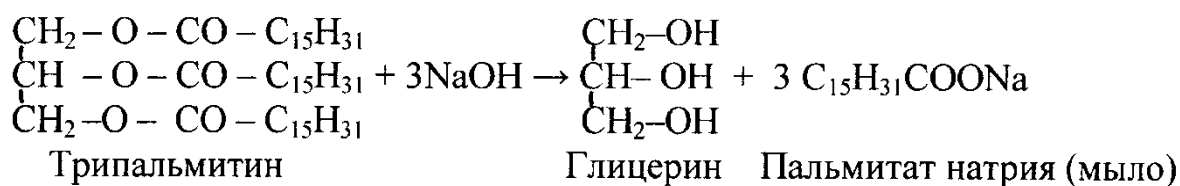
Функции липидов разнообразны. Наиболее важными являются энергетическая функция (при распаде 1 г жира освобождается 38,9 кДж), а также структурная – липиды являются основой любой биологической мембраны. Участвуют липиды и в регуляции клеточного метаболизма, выполняют защитные функции и другие.

У животных и человека переваривание липидов происходит в основном в кишечнике под влиянием панкреатической липазы. Чтобы подвергнуться действию липаз, липиды должны быть эмульгированы. Основным эмульгатором являются желчные кислоты, к которым относятся холевые кислоты. Желчные кислоты также активируют ферменты, участвующие в переваривании липидов.

Опыт 1. Омыление жиров (щелочной гидролиз)

Принцип метода. Жиры, как и все сложные эфиры, подвергаются гидролизу. Гидролиз жиров, сам по себе медленный, катализируется кислотами, щелочами, ферментами. Ферментативный гидролиз жиров происходит в кишечнике под действием ферментов – липаз.

При гидролизе жира в нейтральной или кислой среде получают глицерин и жирные кислоты. В щелочной среде вместо свободных кислот образуются мыла – натриевые и калиевые соли высших жирных кислот. Именно поэтому гидролиз жиров в присутствии щелочей получил название омыления. Натриевые мыла – твердые, а калиевые – жидкие.

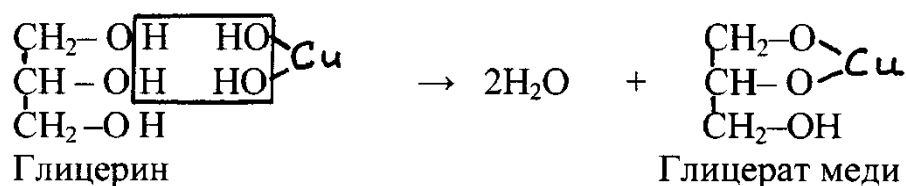


Ход работы. Взвешивают на весах 2-3 г говяжьего жира, помещают в колбочку на 50 мл с обратным воздушным холодильником (длина трубки 60-70 см), добавляют 10-15 мл 15% спиртового раствора гидроксида натрия и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут.

По окончании нагревания раствор из колбочки выливают в фарфоровую чашку и добавляют горячий насыщенный раствор поваренной соли. Не дожидаясь охлаждения раствора, его быстро фильтруют через бумажный фильтр. Мыло высаливается, твердая масса приобретает форму воронки, а в фильтрате остается глицерин. Глицерин в растворе можно определить по реакции образования глицерата меди.

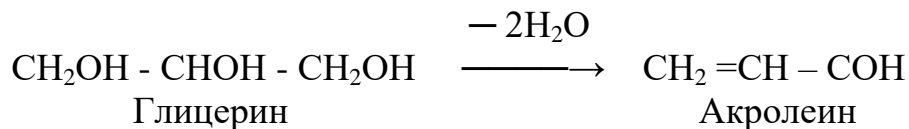
Опыт 2. Качественная проба на глицерин

Ход работы. В пробирку наливают 3-4 капли 2% раствора медного купороса, добавляют 3-4 мл 10% раствора гидроксида натрия. Образуется голубой осадок гидроксида меди. В пробирку с этим осадком добавляют 2-3 мл раствора, получившегося после омыления жира. Голубой осадок растворяется с образованием ярко-синего раствора глицерата меди за счет взаимодействия с глицерином, образовавшимся в результате омыления жира. Опыт повторяют с готовым глицерином.



Опыт 3. Акролеиновая проба на глицерин

Принцип метода. Реакция основана на отщеплении от глицерина под влиянием водоотнимающих веществ двух молекул воды с образованием непредельного альдегида акролеина, имеющего специфический запах:



Ход работы. В пробирку наливают 0,5 мл масла, прибавляют избыток безводного KHSO_4 и осторожно нагревают на пламени горелки до появления белых густых паров и специфического запаха акролеина. Гидросульфат калия при сильном нагревании образует пироксернистый калий $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$, который проявляет сильные водоотнимающие свойства.

В пары акролеина вносят кусочек фильтровальной бумаги, смоченной аммиачным раствором оксида серебра. Бумага чернеет вследствие выделения металлического серебра.

Опыт 4. Определение непредельности жира

Принцип метода. В свободных и связанных с глицерином жирных кислотах некоторых жиров, в особенности растительных масел, имеются ненасыщенные связи, благодаря которым жиры способны присоединять галогены.

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл масла, приливают 2 мл бромной воды и тщательно взбалтывают. Происходит обесцвечивание бромной воды.

Опыт 5. Эмульгирование жира

Ход работы. Берут четыре пробирки. В первую наливают 2 мл дистиллированной воды, во вторую – 2 мл желчи, в третью – раствор яичного белка, в четвертую – раствор мыла. В каждую пробирку добавляют по 2-3 капли растительного масла, и все пробирки одновременно сильно встряхивают в течение 30 секунд.

Отмечают, в какой пробирке быстрее происходит расслаивание содержимого. Пробирки оставляют в штативе и наблюдают, при действии какого эмульгатора стойкость эмульсии сохраняется дольше всего. Наблюдения записывают.

Опыт 6. Качественная реакция на желчные кислоты

Принцип метода. Желчные кислоты (холевая, дезоксихолевая и др.) при взаимодействии с фурфуролом образуют окрашенные соединения. В качестве источника фурфурола при реакции на желчные кислоты берется сахароза, превращающаяся под действием серной кислоты в оксиметилфурфурол.

Ход работы. В пробирку вносят 2 мл желчи, добавляют 1-2 капли 1% раствора сахарозы и встряхивают. Осторожно по стенке приливают 1-2 мл концентрированной серной кислоты, она опускается на дно, а на границе соприкосновения слоев кислоты и желчи возникает красно-фиолетовое кольцо.

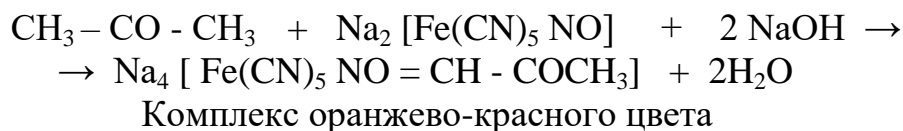
Необходимо избегать избытка сахарозы и саморазогревания свыше 70°C, что может привести к обугливанию сахара и затемнению окраски.

Опыты 7. Качественные реакции на кетоновые тела

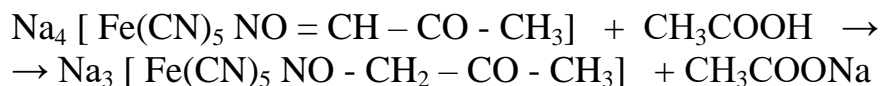
Принцип метода. К кетоновым телам относятся ацетон, β – оксимасляная кислота и ацетоуксусная кислота:



Ацетон и ацетоуксусная кислота в щелочной среде образуют с нитропруссидом натрия оранжево-красное окрашивание



После подкисления ледяной уксусной кислотой образуется соединение вишневого цвета:



Ход работы. В 2 пробирки наливают 1 мл ацетона, добавляют 1 мл 10% раствора гидроксида натрия.

Затем в первую пробирку добавляют и 1 мл нитропрусида натрия. Появляется оранжево-красное окрашивание. Добавляют 3 мл ледяной уксусной кислоты, после чего появляется вишнево-красное окрашивание.

Во вторую пробирку добавляют несколько капель раствора йода в йодистом калии. В щелочной среде при взаимодействии ацетона с йодом образуется йодоформ, выпадающий в виде характерного осадка и специфического запаха.

Оформление работы

В тетради записывают порядок выполнения опытов, приводят уравнения наблюдаемых реакций, записывают происходящие изменения и делают соответствующие выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ СОБЕСЕДОВАНИЯ

Тема № 1. Аминокислоты, белков.

1. Белки - составная часть всех живых организмов. Биологическая роль и функции белков.
2. Аминокислоты - структурные компоненты белков. Качественные реакции на белки и аминокислоты.
3. Физико-химические свойства белков: молекулярная масса, ИЭТ, растворимость, осаждаемость:
 - а) понятие о высаливании, высаливающие факторы, механизм, обратимость, применение в медицине;
 - б) понятие о денатурации, факторы, вызывающие денатурацию, механизм, обратимость, применение реакций осаждения белка для его обнаружения в биологических жидкостях.
4. Структурная организация белков (первичная, вторичная, третичная, четвертичная структуры).
5. Классификация сложных белков. Краткая характеристика.
6. Нуклеопротеины:
 - а) нуклеиновые кислоты, биологическая роль.
 - б) структуры нуклеиновых кислот.
7. Хромопротеины: гемопроотеины (гемоглобин, миоглобин) строение и биологическая роль.
8. Гликопротеины. Фосфопротеины. Строение, биологическая роль.

Тема № 2. Нуклеиновые кислоты

1. Продукты гидролиза нуклеопротеидов ДНК и РНК.
2. Строение и биологическая роль нуклеиновых кислот.
3. Строение нуклеотидов и нуклеозидов.
4. Различия в строении ДНК и РНК.
5. Написать пептид по заданной последовательности нуклеотидов: А-А-Г-Ц-Ц-У-У-У-Г
6. Написать формулу уридил-аденозил-гуанозинтринуклеотида (У-А-Г).
7. Написать формулу НАД. Какова его роль?
8. Написать формулу ФАД. Какова его роль?
9. Написать формулы АМФ, АДФ и АТФ. Какова их роль?
10. Написать уравнение реакции образования молекулы АТФ.
11. Написать уравнение реакции образования АТФ из АДФ.
12. Написать уравнение реакции образования нуклеотида из урацила, β -D-рибофуранозы и фосфорной кислоты.
13. Написать уравнение реакции образования нуклеотида из гуанина, β -D-дезоксирибофуранозы и фосфорной кислоты.
14. Написать уравнение реакции образования адениловой кислоты.
15. Написать уравнение реакции образования цитидиловой кислоты.

Тема № 3. Витамины.

1. Понятие о витаминах. Заслуги ученых в развитии учения о витаминах.
2. Классификация и номенклатура витаминов. Провитамины.
3. Гиповитаминозы, авитаминозы, гипervитаминозы.
4. Общая сравнительная характеристика жирорастворимых и водорастворимых витаминов.
6. Жирорастворимые витамины (А, Д, Е, К). Химическое строение, биологическая роль, источники.
7. Водорастворимые витамины (В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₁₂, В_с, С, Р). Химическое строение, биологическая роль, источники.
8. Антивитамины. Механизм действия. Примеры.

Тема № 4. Ферменты.

1. Понятие о ферментах и их биохимическая роль в организме.
2. Химическая природа. Строение простых и сложных ферментов. Роль активных центров.
3. Механизм действия ферментов. Кинетика ферментативных реакций.
4. Общие свойства ферментов: специфичность, влияние температуры, рН среды на активность ферментов.
5. Активаторы и ингибиторы ферментов, механизмы их влияния и значение.
6. Изоферменты, механизм образования, биологическая роль.
7. Иммуобилизованные ферменты, значение в медицине.
8. Связь витаминов с ферментами.
9. Номенклатура, классификация ферментов.

Содержание

Введение	3
Правила техники безопасности при работе в химической лаборатории	4
Лаб. работа № 1. Качественные реакции на белки и аминокислоты	5
Лаб. работа № 2 Разделение аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге	12
Лаб. работа № 3 Реакции осаждения белков	15
Лаб. работа № 4 Разделение белков мышечной ткани методом диализа и высаливания	18
Лаб. работа № 5 Выделение казеина из молока	20
Лаб. работа № 6 Определение изоэлектрической точки казеина	21
Лаб. работа № 7 Качественные реакции на витамины	22
Лаб. работа № 8 Количественное определение каротина в сыворотке крови по Кари и Прейсу в модификации Юдкина	
Лаб. работа № 9 Качественные методы обнаружения ферментов	29
Лаб. работа № 10 Изучение свойств фермента амилазы слюны	32
Лаб. работа № 11 Определение активности фермента каталазы перманганатометрическим методом	36
Лаб. работа № 12 Гидролиз нуклеопротеинов	38
Лаб. работа № 13 Качественные пробы на липиды и продукты их обмена	41
Контрольные вопросы для собеседования	45

Учебное издание

Талызина Татьяна Леонидовна

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Учебно-методическое пособие
Часть 1

Редактор Осипова Е.Н.

Подписано к печати 10.12.2024 г. Формат А4.

Бумага офсетная. Усл. п. л. 2,79. Тираж 25 экз. Изд. №7779.

Издательство Брянского государственного аграрного университета
243365 Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянский ГАУ