

сибирский медицинский университет
кафедра биохимии

Серебров В.Ю., Федорова Т.С., Канская Н.В.,
Каракулова Е.В., Тимин О.А., Ситожевский А.В.,
Иванов В.В., Кожанова А.А., Позднякова И.А.,
Мороз В.В., Колесова Н.И.

Лабораторный практикум по биологической химии

для студентов 2 курса врачебных факультетов

Часть 1

Томск — 1999

УДК 577.1.

АВТОРЫ И СОСТАВИТЕЛИ:

Профессор, доктор медицинских наук
СЕРЕБРОВ Владимир Юрьевич

Профессор, доктор медицинских наук
ФЕДОРОВА Татьяна Сергеевна

Профессор, доктор медицинских наук
КАНСКАЯ Наталья Викторовна

Старший преподаватель, кандидат биологических наук
КАРАКУЛОВА Елена Владимировна

Старший преподаватель, кандидат медицинских наук
ТИМИН Олег Алексеевич

Доцент, кандидат медицинских наук
СИТОЖЕВСКИЙ Алексей Викторович

Доцент, кандидат биологических наук
ИВАНОВ Владимир Владимирович

Ассистент, кандидат биологических наук
ПОЗДНЯКОВА Ирина Анатольевна

Ассистент
КОЖАНОВА Анна Александровна

Ассистент
МОРОЗ Валентина Васильевна

Ассистент
КОЛЕСОВА Нина Ивановна

Под редакцией профессора Федоровой Т.С.

*Памяти профессора, д.м.н.
Николая Александровича Удинцева
и ассистента, к.м.н.
Эммы Исаевны Волошиной
посвящается*

ВВЕДЕНИЕ

Для проведения практических занятий по биологической химии в медицинских учебных заведениях имеются хорошие руководства и практикумы (Е.А.Строев, В.Г.Макарова, 1986; А.Я.Николаев, 1989; О.Д.Кушманова, Г.М.Ивченко, 1983 и др.). К сожалению, книги при работе с ними в химических лабораториях быстро ветшают, обеспечить студентов нужным количеством их трудно, поэтому студентам приходится использовать практикумы разных авторов, что затрудняет унификацию проведения лабораторных работ. Кроме того, по разным причинам приходится модифицировать работы, вводить новые задания. Преподавание биохимии требует от студента не только умения технически грамотно провести анализ, но и осмыслить его результаты. Поэтому ряд работ проводится в аспекте поискового исследования, когда студент выбирает нужный вариант анализа в зависимости от результатов предшествующего этапа.

Все сказанное привело к необходимости издания нового, дополненного и исправленного варианта методических разработок. Задачей его является краткая характеристика принципа лабораторной работы, описания ее проведения. В ряде случаев поставлены вопросы, ответ на которые позволяет студенту оформить протокол и понять смысл исследования. Дается краткая характеристика клинического значения изучаемых показателей.

Методические разработки составлены в соответствии с программой по биохимии, утвержденной Министерством здравоохранения РФ.

Наш практикум ни в коей мере не исключает пользование различными руководствами, а является дополнением к ним.

ЗАНЯТИЕ 1. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ. СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ БЕЛКА.

Актуальность: Белки — важнейший пластический материал клеток живого организма, по структуре являются сложными полимерными соединениями, состоящими из простых, низкомолекулярных веществ-мономеров, роль которых выполняют аминокислоты. Именно особенностями аминокислотного состава обусловлено огромное разнообразие состава, структуры. Знание структурной организации и свойств белковых молекул необходимо для понимания основных специфических функций (каталитической, регуляторной, рецепторной, транспортной и т.д.), благодаря которым белкам принадлежит решающая роль во всех процессах жизнедеятельности.

Цель:

- 1) Знакомство со строением аминокислот, входящих в состав белков организма человека, классификациями аминокислот по биологической роли и строению радикала. Изучение основных функциональных групп аминокислот, их роли.
- 2) Приобретение практических навыков по проведению качественного анализа биологических жидкостей и растворов на присутствие аминокислот и белков, основанных на знании принципов цветных реакций (биуретовой, ксантопротеиновой, нингидриновой, реакции Фоля)
- 3) Создание представления о значении определения аминокислот для анализа состава белков и диагностики нарушений азотистого обмена.

Студент должен знать:

- 1) Понятия «аминокислота», «пептид», «белок».
- 2) Элементарный состав и функции белков в организме.
- 3) Основные физико-химические свойства аминокислот. Роль функциональных групп.
- 4) Классификации аминокислот по биологической роли и строению радикала (формулы 20 важнейших аминокислот)
- 5) Реакцию образования пептидной связи, лежащей в основе построения пептидов и первичной структуры белковой молекулы. Уметь построить и назвать пептид.

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Дать определение белка. Охарактеризовать его элементарный состав.
- 2) Какова роль белков в организме?
- 3) Какие принципы лежат в основе разделения белков на классы? Привести примеры классификации аминокислот.
- 4) Какие аминокислоты участвуют в построении белка организма человека?
- 5) Встречаются ли аминокислоты в организме в свободном виде?
- 6) Перечислить основные физико-химические свойства аминокислот. Какова роль функциональных групп аминокислот?
- 7) Что называют радикалом аминокислот? Привести примеры. Назвать их роль.
- 8) Какие аминокислоты называют незаменимыми? Перечислить, привести примеры химического строения.
- 9) Какие аминокислоты характеризуются наибольшей гидрофобностью? Привести примеры их химического строения.
- 10) Какие аминокислоты являются наиболее гидрофильными? Привести примеры их химического строения.
- 11) Назвать аминокислоты, имеющие при pH 7,0 дополнительный отрицательный заряд, написать их формулы в ионизированной форме.
- 12) Назвать аминокислоты, имеющие при pH 7,0 дополнительный положительный заряд, написать их формулы в ионизированной форме.
- 13) Как влияет изменение pH среды на ионизацию аминокислот.
- 14) Написать формулы серосодержащих аминокислот.
- 15) Написать формулы циклических аминокислот.
- 16) Написать формулы иминокислот.
- 17) Написать примеры химического строения аминокислот, обладающих нейтральными, кислыми и основными свойствами.
- 18) Какая связь называется пептидной? Написать реакцию образования пептидной связи.
- 19) Построить трипептид и дать ему название. Указать его растворимость и заряд при pH 7,0. В какой области pH лежит его изоэлектрическая точка?

Лабораторная работа 1. Цветные реакции на белки и аминокислоты.

Реактивы.

1) 1% раствор яичного белка, 2) 0,5% раствор нингидрина, 3) 30% NaOH, 4) 10% NaOH, 5) 5% раствор $Pb(CH_3COO)_2$, 6) 5% раствор нитропруссиды Na, 7) конц. H_2SO_4 .

Материалы исследования.

При изучении цветных реакций в учебной лаборатории в качестве объекта исследования используют 1% водный раствор яичного белка, содержащего полный набор аминокислот. В пронумерованные пробирки наливают по 5 капель раствора белка.

Руководствуясь указаниями, проводят цветные реакции, наблюдают результаты и записывают выводы.

БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ.

Универсальная реакция на обнаружение пептидной связи в белках и пептидах. Биуретовую реакцию дают вещества, содержащие не менее двух пептидных группировок.

Принцип реакции

Пептидная группа образует в щелочной среде с ионами Cu^{2+} комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству пептидных групп.

Проведение анализа.

В пробирку с раствором белка вносят 3 капли 10% NaOH и 1 каплю $CuSO_4$.

НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ

Это универсальная реакция для обнаружения любых α -аминогрупп, содержащихся в аминокислотах, пептидах, белках.

Принцип

α -Аминогруппа аминокислот, взаимодействуя с нингидрином, образует комплекс синего или сине-фиолетового цвета. При нагревании аминокислот с нингидрином происходит окислительное дезаминирование α -аминогрупп и восстановление нингидрина. Восстановленный нингидрин реагирует с аммиаком и другой молекулой окисленного нингидрина с образованием окрашенного продукта. Пролин и окипролин дают продукт желтого цвета.

Проведение анализа.

Раствор белка смешивают с 5 каплями раствора нингидрина. Пробирки нагревают и кипятят 1 минуту. Отмечают появление сине-фиолетового окрашивания.

КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ.

Это реакция на ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин, триптофан).

Принцип метода.

Ароматическое кольцо при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образует динитросоединение желтого цвета.

Проведение анализа.

К раствору белка добавляют 2 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. Наблюдают за появлением желтого окрашивания переходящее при добавлении 30% NaOH в оранжевое.

РЕАКЦИЯ МИЛЛОНА

Эта реакция позволяет выявить фенольное кольцо тирозина.

Принцип метода.

При нагревании с реактивом Миллона образуется ртутная соль нитротирозина пурпурно-красного цвета.

Проведение анализа.

В раствор белка добавляют 3 капли реактива Миллона (раствор нитратов ртути (I) и (II) в HNO₃ с примесью HNO₂). Осторожно нагревают. Белый осадок белка при нагревании окрашивается в кроваво-красный цвет.

РЕАКЦИЯ НА СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ.

Это реакция на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу (цистин, цистеин).

Принцип метода.

Сульфгидрильные группы в белке, полипептиде подвергаются щелочному гидролизу, в результате чего происходит отщепление серы в виде сульфида натрия, который вступает в дальнейшие реакции.

Проведение анализа

Раствор белка и 5 капель 30% NaOH кипятить 1-2 минуты. Разделить содержимое на 2 части для реакций «а» и «б».

а) *Реакция Фоля:* образовавшийся Na₂S с плюмбитом свинца Pb(CH₃COO)₂ дает черный или бурый осадок сульфида свинца.

К 5 каплям гидролизата добавляют 1 каплю раствора уксуснокислого свинца и нагревают до кипения. Отмечают появление бурого или черного осадка.

б) *Реакция с нитропруссидом*: образовавшийся Na_2S дает с натрия нитропруссидом окрашенное соединение.

К 5 каплям гидролизата добавляют 2-3 капли раствора натрия нитропрussa. Отмечают появление красно-коричневого окрашивания.

Практическое значение цветных реакций.

Цветные реакции, являясь качественными универсальными (биуретовая, нингидриновая и др.) и специфическими (реакция Фоля, Миллона и др.) методами определения, позволяют обнаружить белок и его структурные компоненты аминокислоты, не только для изучения состава и установления белковой природы вещества, но также могут использоваться и в основе методов их количественного определения.

Оформление работы

Результаты оформляют в виде таблицы. Интенсивность окраски помечают следующим образом: – отсутствие окраски; + слабая окраска; ++ сильная окраска; +++ очень сильная окраска. В выводах указывается, какое вещество содержится в каждой пробе.

N пробы	Реакции						Что содержится
	Нингидриновая	Ксантопротеиновая	Фоля	Миллона	Сакагучи	Биуретовая	
1							
2							
3							
4							

Лабораторная работа 2.

Исследование наличия белка и свободных аминокислот в биологическом материале.

Химический состав биологических жидкостей (кровь, моча, желудочный сок, слюна и т.п.) характеризуется постоянством и отражает состояние биохимических процессов, происходящих в тканях, органах. Отклонение от нормы в качественном и количественном составе биологических жидкостей может быть показателями патологического процесса (т.е. болезни). Свойство биологических жидкостей изменять свой состав при патологии нашло применение в

медицинской практике для диагностики заболеваний и контроля лечения.

При выполнении работы необходимо ответить на следующие вопросы: Для чего практическому врачу необходимы знания о химическом составе биологических жидкостей в норме? Имеются ли у здорового человека свободные аминокислоты в моче? В сыворотке?

Материалы исследования: сыворотка крови, слюна, моча.

Реактивы.

1) 0,5% раствор нингидрина, 2) 1% NaOH, 3) 3% уксусная кислота, 4) 1%. CuSO₄.

Проведение анализа

С 5 каплями сыворотки, слюны, мочи проводят биуретовую реакцию, определяя наличие или отсутствие белка в пробах. В другой порции исследуемых жидкостей (там, где это необходимо) белок осаждают нагреванием в присутствии уксусной кислоты (10 капель исследуемого материала и 2 капли кислоты). Отделяют белок фильтрованием, предварительно смочив фильтр водой. В безбелковом фильтрате с помощью нингидриновой реакции определяют наличие α-аминокислот — если жидкость не содержит белок, нингидриновую реакцию проводят с 10 каплями исследуемого материала.

Оформление работы.

Результаты анализа вносят в таблицу. Знаками «+» и «-» отметить результаты наблюдения.

МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	ЧТО ОТКРЫВАЕМ	
	БЕЛОК	СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ
Сыворотка Слюна Моча		

Практическое значение:

Цветные реакции на белок используют в клинико-биохимических лабораториях и биохимических исследованиях для обнаружения присутствия белка и аминокислот в биологических средах, качественного анализа белковых лекарственных средств в фармацевтической практике.

ЗАНЯТИЕ 2. КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ. ФУНКЦИИ БЕЛКОВ В ОРГАНИЗМЕ. СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ.

Актуальность: Белки выполняют разнообразные специфические функции в организме: транспорт кислорода и других соединений, хранение и передача наследственной информации и т.д. Особенности строения этих макромолекул и их изменения лежат в основе развития ряда патологических процессов. Изучение их структуры необходимо для понимания роли в организме и характера нарушений при некоторых заболеваниях (серповидноклеточная анемия, наследственные нарушения биосинтеза белков и др.) Реакция открытия белковой и простетической групп позволяют понять состав и строение сложных белков, а также использовать эти данные для количественного определения.

Цель:

- 1) Изучить структуру и свойства сложных белков — фосфопротеины, нуклеопротеины, гликопротеины.
- 2) Научиться выделять сложные белки из различных объектов и проводить качественные реакции на компоненты сложных белков.

Студент должен знать:

- 1) Классификацию белков по химическому строению и функциям.
- 2) Основные группы простых белков.
- 3) Строение и функции сложных белков, особенно нуклеопротеинов, хромопротеинов, гликопротеинов.

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Основные группы белков по функциональным признакам.
- 2) Классификация белков по строению.
- 3) Характеристика и особенности строения простых белков: протамины, гистоны, альбумины, глобулины и т.д.
- 4) Характеристика и особенности строения сложных белков.
- 5) Нуклеопротеины, их функции и структурные элементы.
- 6) Структура и свойства нуклеиновых кислот. Отличия ДНК и РНК.
- 7) Фосфопротеины. Их строение и функции.
- 8) Хромопротеины, химическая структура и основные функции. Гемопроотеины, строение гема, гемоглобина, способность к транспорту кислорода.

- 9) Гликопротеины, структура, функции в организме. Представление о строении простетической группы — гиалуроновая кислота и другие гликозиламиногликаны.
- 10) Липопротеины. Представления о строении, основные транспортные формы липидов плазмы — хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины высокой плотности (ЛПВП).

Лабораторная работа 1.
Выделение и анализ химического состава
сложных белков.

Качественные реакции на небелковые компоненты используют для обнаружения сложных белков в различных объектах.

НУКЛЕОПРОТЕИНЫ.

В составе нуклеопротеинов выделяют белковую часть, пуриновые или пиримидиновые основания, углеводы рибозу и дезоксирибозу, фосфорную кислоту. В работе изучаются все перечисленные компоненты.

Материал исследования.

Гидролизат пекарских дрожжей (готовят лаборанты): 1 г дрожжей кипятят в течении 1 часа в колбе с обратным холодильником в присутствии 20 мл 1% H_2SO_4 и 20 мл дистиллированной воды. Фильтруют.

Реактивы.

- 1) 1% раствор тимола в этиловом спирте, 2) 10% раствор NaOH,
- 3) конц. раствор аммиака, 4) молибденовый реактив, 5) конц. H_2SO_4 ,
- 6) 1% раствор $CuSO_4$, 7) 1% аммиачный раствор серебра нитрата,
- 8) 10% уксусная кислота, 9) конц. уксусная кислота.

Биуретовая реакция на полипептиды.

Принцип.

Пептидная группа образует в щелочной среде с ионами Cu^{2+} комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству пептидных групп.

Проведение анализа.

К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10% NaOH и 1 каплю 1% $CuSO_4$. Развивается розово-фиолетовое окрашивание.

Серебряная проба на пуриновые основания.

Принцип.

Пуриновые основания (аденин и гуанин). при взаимодействии с нитратом серебра образуют бурый осадок серебряных солей.

Проведение анализа.

10 капель гидролизата нейтрализуют 10 каплями концентрированного аммиака, добавляют 10 капель аммиачного раствора серебра. Через 5-10 мин образуется светлокоричневый рыхлый осадок.

Реакция Молиша на углеводные группы (β -D-рибоза).

Принцип.

При конденсации тимола с гидроксиметилфурфуролом, продуктом дегидратации пентоз серной кислотой, развивается красное окрашивание.

Проведение анализа.

К 10 каплям гидролизата добавляют 2 капли раствора тимола, перемешивают и осторожно по стенке добавляют концентрированную H_2SO_4 до появления розового кольца в пробирке..

Молибденовая проба на фосфорную кислоту.

Принцип.

При реакции фосфорной кислоты с раствором молибденовокислого аммония в азотной кислоте образуется окрашенное комплексное соединение аммония фосфомолибдата.

Проведение анализа

К 10 каплям гидролизата добавляют 20 капель молибденового реактива, кипятят. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. Пробирку охлаждают в струе воды, на дне появляется лимонно-желтый осадок аммония фосфомолибдата.

ФОСФОПРОТЕИНЫ.

Материал исследования: молоко

Принцип.

При подкислении молоко свертывается, благодаря выпадению в осадок белка казеиногена ($pI=4,7$).

Проведение анализа.

К 2,0 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды, перемешивают. Добавляют 2 капли уксусной кислоты. Хлопьевидный осадок отфильтровывают.

Половину осадка снимают палочкой с фильтра в пробирку. Для выявления фосфора добавляют 20 капель молибденового реактива, кипятят. Наблюдают выпадение желтого осадка.

На фильтре проделывают биуретовую реакцию на белковую часть.

ГЛИКОПРОТЕИНЫ

Материал исследования.

Слюна, собранная после ополаскивания рта водой.

Проведение анализа.

В двух пробирках собирают по 1 мл слюны, по каплям приливают концентрированную уксусную кислоту до появления сгустка муцина.

В одной пробирке проводят биуретовую реакцию, предварительно добавив 10 капель 10% NaOH для нейтрализации кислоты.

Во второй пробирке проводят реакцию Молиша на углеводный компонент муцина. Для этого жидкость сливают и к сгустку добавляют 2-3 капли раствора тимола. Перемешивают. По стенке осторожно добавляют концентрированную H_2SO_4 до появления розового окрашивания.

Оформление работы

Результаты работы заносятся в таблицу: Делается вывод о составе сложных белков.

Сложные белки	Объект исследования	Компонент	Реакции открытия	
			Используемые реактивы	Окрашивание
Нуклео-протеины	Дрожжи	Белок		
		Пуриновые основания		
		Пентозы		
		Фосфорная кислота		
Глико-протеины	Слюна	Белок		
		Углеводы		
Фосфо-протеины	Молоко	Белок		
		Фосфорная кислота		

ЗАНЯТИЕ 3.

СТРОЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Актуальность: Пути выделения белков из раствора при различных способах осаждения, в том числе высаливание, денатурация широко используются в медицине для диагностических целей, получения и очистки белковых лекарственных препаратов, в экспериментальных исследованиях.

Цель:

- 1) Изучить физико-химические свойства белков (молекулярная масса, размеры, форма, ионизация, гидратация, растворимость) и основные типы структур белковых молекул.
- 2) Научиться осаждать белки из раствора, разными методами и использовать способность к осаждению белков в клинике (осадочные реакции).

Студент должен знать:

- 1) Основные физико-химические свойства белковых молекул.
- 2) Пути выделения белковых веществ из растворов.
- 3) Основные типы структур белковых молекул.

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Молекулярная масса белковых молекул. Способы ее определения (ультрацентрифугирование, гель-фильтрация).
- 2) Ионизация молекул белка (заряд), гидратация и растворимость. Свойства белковых растворов.
- 3) Изоэлектрическая точка. Свойства белковых молекул в изоэлектрической точке (изоэлектрическое состояние).
- 4) Денатурация белков. Свойства денатурированного белка.
- 5) Ренативация. Изменения структуры при денатурации.
- 6) Факторы, вызывающие денатурацию белков (физические, химические, биологические).
- 7) Типы структур белковых молекул (первичная, вторичная, третичная, четвертичная).
- 8) Функциональные группы аминокислот, образующие связи, стабилизирующие различные структуры белковой молекулы.
- 9) Глобулярные и фибриллярные белки.
- 10) Четвертичная структура белков. Комплементарность протомеров. Кооперативные изменения конформации протомеров.

Лабораторная работа 1.

Высаливание белков.

Высаливание — процесс осаждения белка солями щелочных, щелочно-земельных металлов и нейтральными солями. Процесс обратим, так как сохраняет нативные свойства белков.

Реактивы.

1) насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2) кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3) 10% NaOH, 4) 1% CuSO_4 .

Материалы исследования: сыворотка крови, яичный белок.

Принцип.

Под действием нейтральных солей, солей щелочных и щелочно-земельных металлов происходит нейтрализация заряда белковых частиц и их дегидратация. Используя разные концентрации солей, можно разделить белки на фракции. При растворении осажденного белка в воде происходит восстановление его исходных физико-химических и биологических свойств.

Проведение анализа.

К 20 каплям яичного белка добавляют равный объем сульфата аммония (получается полунасыщенный раствор), в котором выпадает осадок яичного глобулина. Через 5 мин осадок отделяют фильтрованием. Наличие белка на фильтре доказывают биуретовой реакцией. К фильтрату добавляют порошок сульфата аммония до полного насыщения, при этом выпадает осадок альбуминов. Обратимость осаждения проверяют, добавляя к осадку дистиллированную воду. Аналогично проводится фракционирование белков сыворотки крови

Практическое значение

Метод высаливания используют в клинических лабораториях для разделения альбуминов и глобулинов, определения их соотношения в сыворотке крови. В норме отношение альбумин/глобулин в сыворотке крови человека колеблется в пределах 1,5-2,3 и меняется при патологии, например, при воспалительных заболеваниях увеличивается содержание глобулинов.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о возможности очистки белка данным методом.

Лабораторная работа 2

Исследование денатурации белков.

Денатурация белков — это изменение структурной организации белковой молекулы (третичной, четвертичной и даже вторичной)

структуры). приводящее к изменению физико-химических и биологических свойств белка. Денатурирующие факторы делятся на химические (кислоты, тяжелые металлы), физические (ультразвук, высокая и низкая температура), биологические (протеолитические ферменты — трипсин).

Реактивы.

1) 1% и 10% CH_3COOH , 2) ацетон, 3) 10% ТХУ, 4) конц. HNO_3 , 5) 1% CuSO_4 , 6) конц. H_2SO_4 , 7) 5% $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 8) танин, 9) сульфосалициловая кислота, 10) 10% NaOH , 11) насыщенный раствор NaCl .

Материалы исследования: сыворотка крови, яичный белок.

Принцип.

Денатурация снижает гидрофильность белков и устойчивость их в растворе.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ

Проведение анализа.

В ряд пронумерованных пробирок вносят по 5 капель 1% раствора яичного белка и добавляют реактивы, пользуясь указаниями таблицы (см ниже). Необратимость осаждения белка устанавливают добавлением к осадку 10-20 капель дистиллированной воды.

Практическое значение

Реакции химической денатурации используют для осаждения белка в биологическом материале с целью дальнейшего определения в фильтрате низкомолекулярных веществ; для выявления присутствия белка в различных физиологических жидкостях и количественного анализа; для связывания солей тяжелых металлов при лечении отравлений и для профилактики их на производстве; для обезвреживания отходов в санитарной практике; для дезинфекции кожи, слизистых покровов.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа в таблице и делают вывод. Указывают интенсивность денатурации по образованию осадка.

Денатурирующие агенты	№ проб	Используемые реактивы	Число капель	Механизм и особенности реакции	Осадок
Соли тяжелых металлов	1 2	Меди сульфат Свинца ацетат	2 2	Ионы металлов связываются с функциональными группами аминокислот, в результате чего разрушается пространственная структура белка	

Концентрированные минеральные кислоты				
а) небольшие количества	3 4	Азотная Серная	2 2	Кислоты вызывают дегидратацию частиц, нейтрализацию комплексных соединений с белками. Обратите внимание на поведение белка в избытке кислот
б) избыток	5 6	Азотная Серная	10 10	
Органические кислоты				
	7	Трихлоруксусная	2	Осаждает только белки Кроме белков осаждает полипептиды. Кислоты нейтрализуют заряд, образуют комплексы с белком.
	8	Сульфосалициловая	2	
Алкалоиды	9	Танин	2	Образуются нерастворимые солеобразные соединения с основными азотистыми группами белка
Органические растворители	10	Ацетон	5	Нарушаются гидрофобные взаимодействия внутри белковой молекулы.

*ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ
ПРИ НАГРЕВАНИИ В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ*

Проведение анализа.

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

1 пробу нагревают и наблюдают помутнение раствора.

во 2 пробу добавляют 2 капли 1% CH_3COOH (слабокислая среда).

Нагревают, наблюдают сначала помутнение, а при дальнейшем нагревании — белый хлопьевидный осадок. Белок теряет заряд, приближается к изоэлектрическому состоянию.

в 3 пробу добавляют 2 капли 10% CH_3COOH (сильнокислая среда).

Нагревают. Осадок при этом не образуется, так как частицы белка перезаряжаются и приобретают положительный заряд.

в 4 пробу добавляют 2 капли 10% CH_3COOH и 1 каплю насыщенного раствора NaCl (сильнокислая среда + электролит). Нагревают.

Выпадает осадок белка, так как происходит нейтрализация заряда на частицах белка.

в 5 пробу добавляют 2 капли 10% раствора NaOH (щелочная среда).

Нагревают. Осадок не образуется, так как положительный заряд на частицах белка усиливается.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, делают вывод. Результаты работы оформляют в виде таблицы:

№ пробы	Количество белка, капли	Реактивы	pH	Результаты	Механизм осаждения
1					
2					
3					
4					
5					

Лабораторная работа 3.**Определение изоэлектрической точки белка казеина.**Принцип.

Метод основан на способности растворенного белка в изоэлектрической точке переходить в неустойчивое состояние и выпадать в осадок, что проявляется в выраженном помутнении раствора.

Реактивы.

0,2 М CH_3COOH .

Материалы исследования:

0,4% раствор казеина в 0,2 М растворе ацетата натрия.

Проведение анализа.

№ пробы	Уксусная кислота, мл	Дистилл. вода	Раствор казеина, мл	pH	Степень помутнения
1	1,6	0,4	0,2	3,8	
2	1,2	0,8	0,2	4,7	
3	0,03	1,97	0,2	5,6	

Практическое значение.

Нахождение ИЭТ для индивидуальных белков позволяет подобрать условия для выделения отдельных белков из биологических жидкостей, для очистки препаратов в фармации.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

Лабораторная работа 4.**Проведение проб на коллоидоустойчивость белков сыворотки крови.**

Нарушение коллоидной устойчивости белков под влиянием различных агентов проявляется сначала склеиванием (коагуляцией) белковых молекул, а затем выпадением их в осадок. В норме

устойчивость сывороточных белков зависит от соотношения количества альбуминов и глобулинов.

ОСАДОЧНАЯ ПРОБА ВЕЛЬТМАНА В МОДИФИКАЦИИ ТАЙФЛЯ

Принцип.

При добавлении к сыворотке крови раствора CaCl_2 и нагревании снижается коллоидная устойчивость белков вследствие уменьшения электрического заряда частиц при действии электролита. Белки при этом выпадают в осадок.

Реактивы.

0,5% CaCl_2 .

Проведение анализа.

В химическую пробирку добавляют 0,1 мл сыворотки, 4,9 мл дистиллированной воды и 0,1 мл хлорида кальция. Встряхивают, нагревают на спиртовке или электроплитке до однократного закипания и охлаждают. Если хлопья в пробирке не обнаруживаются, то в нее добавляют еще 0,1 мл хлорида кальция и раствор вновь нагревают до кипения. Процедуру повторяют до выпадения хлопьевидного осадка. Учитывают количество CaCl_2 пошедшее на образование хлопьевидного осадка сывороточных белков и определяют состояние по коагуляционной ленте Вельтмана по схеме:

№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CaCl_2 , мл	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
	<u>Сдвиг влево.</u> Обусловлен увеличением содержания сывороточных α - и β -глобулинов.					Норма		<u>Сдвиг вправо.</u> Обусловлен повышением содержания иммуноглобулинов в крови		
	Ревматизм, активный туберкулез, перитонит, нефроз, острые инфекции, опухоли, сахарный диабет.					Фиброзы, гемолиз, повреждения печени (гепатит, цирроз, дистрофия), пневмония, плеврит, туберкулез, остеомиелит.				

ТИМОЛОВАЯ ПРОБА

Принцип.

Сывороточные β -, γ -глобулины и липопротеины осаждаются при pH 7,55 тимоловым реактивом вследствие образования глобулин-тимол-липидного комплекса.

Реактивы.

Тимоловый буфер, pH 7,55-7,6.

Проведение анализа.

	Проба 1, мл	Проба 2, мл
Сыворотка 1	0,05	—
Сыворотка 2	—	0,05
Тимоловый буфер	3,0	3,0
	Перемешивают и оставляют стоять 15 мин при комнатной температуре. Снова перемешивают и сравнивают со шкалой. Выражают в единицах помутнения S-H (по авторам: Shank-Haagland)	

Калибровочная шкала

№ пробы	Единицы помутнения, S-H
1	5
2	10
3	15

Нормальные величины: 0-4 ед.S-H

Практическое значение.

Как и все коагуляционные тесты, тимоловая проба является неспецифической реакцией. Вместе с тем, она гораздо более специфична для функционального исследования печени, чем другие коллоидные пробы. В 90-100% случаев тимоловая проба положительна при болезни Боткина (уже в преджелтушной стадии или при безжелтушной форме) и при токсическом гепатите. При механической желтухе тимоловая проба отрицательна.

Оформление работы.

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

ЗАНЯТИЕ 4-5.

СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ.

Актуальность: Витамины — низкомолекулярные органические вещества различной химической природы, регуляторы обменных процессов и жизнедеятельности организма. В организме не синтезируются и являются незаменимыми пищевыми факторами. Биологическая роль витаминов связана с регуляцией обменных процессов в организме, поскольку многие из них входят в состав коферментов (простетических групп) ферментов. При недостаточном поступлении витаминов в организм развиваются тяжелые заболевания — авитаминозы. Теоретические сведения о витаминах, а также практические навыки качественного и количественного определения этих веществ в различных биологических объектах нужны врачу для профилактики, диагностики и лечения гипо- и авитаминозов.

Цель:

- 1) Изучить свойства, химическую структуру, классификацию, биологическую роль витаминов, клиническую картину авитаминозов.
- 2) Научиться проводить качественные реакции со стандартными растворами витаминов.
- 3) Использовать полученные навыки для обнаружения водо- и жирорастворимых витаминов в биологических объектах.
- 4) Научиться количественному определению витамина С в различных растительных объектах и моче.

Студент должен знать:

- 1) Химическую структуру жирорастворимых витаминов А, D₃.
- 2) Иметь представление о химической структуре витаминов К, Е, F.
- 3) Химическую структуру водорастворимых витаминов (В₁, В₂, В₆, РР, С, Н) и их биологически активных (коферментных) форм (ТДФ, ФМН и ФАД, НАД и НАДФ, ПФ).
- 4) Иметь представление о химической структуре витаминов В₁₂, В_С, (фолиевая кислота), В₃ (пантотеновая кислота).
- 5) Классификацию и номенклатуру витаминов.
- 6) Характеристику отдельных жиро- и водорастворимых витаминов, отмечая особо их биологическую роль и клиническую картину авитаминозов.

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Какие вещества относят к витаминам?
- 2) Каким образом витамины регулируют обменные процессы?
- 3) Классификация и номенклатура витаминов.
- 4) Свойства витаминов.
- 5) Какие вещества относят к провитаминам? Привести примеры превращения провитаминов в витамины.
- 6) Какие вещества относят к антивитаминам? Примеры использования антивитаминов в качестве лекарственных средств.
- 7) Гипо-, и авитаминозы (экзогенные, эндогенные). Гипервитаминозы.

ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

1. Характеристика отдельных жирорастворимых витаминов. Их строение и биологическая роль.
2. Составьте таблицу по жирорастворимым витаминам

Название витамина (буквенное, химическое, физиологическое)	Химическая формула	Суточная доза	Биологическая роль	Признаки гипер-, гипо- и авитаминоза	Пищевые источники	Лекарственные формы

Лабораторная работа 1.**Качественные реакции на жирорастворимые витамины.***КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА РЕТИНОЛ*Принцип.

Метод основан на способности концентрированной серной кислоты отнимать воду от ретинола с образованием окрашенных продуктов.

Реактивы.

- 1) Серная кислота (конц), 2) хлороформ.

Материал для исследования.

Витамин А (0,05% масляной раствор).

Проведение анализа.

В пробирку вносят 2 капли раствора витамина А, 5 капель хлороформа и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется

синее окрашивание, переходящее в фиолетовое, затем в красно-бурое.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КАЛЬЦИФЕРОЛ

Принцип.

Витамины группы D и их провитамины в присутствии серной кислоты и уксусного ангидрида теряют молекулу воды, превращаются в продукт холестерилена сине-фиолетового и зеленого цвета.

Реактивы.

1) Серная кислота (конц), 2) хлороформ. 3) уксусный ангидрид.

Материал для исследования.

Витамин D (масляной раствор).

Проведение анализа.

В пробирку вносят 3 капли раствора витамина D, 5 капель хлороформа, добавляют 3 капли уксусного ангидрида и 3 капли концентрированной серной кислоты. Развивается красное окрашивание, быстро переходящее в фиолетовое, синее и далее в зеленое. Если объекты имеют примеси холестерина, то зеленая окраска переходит в красную.

ОБНАРУЖЕНИЕ ТОКОФЕРОЛА (ВИТАМИН E)

Принцип.

При взаимодействии токоферола с концентрированной азотной кислотой образуется соединение хиноидной структуры красного или желтовато-красного цвета.

Реактивы.

1) Азотная кислота (конц)

Материал для исследования.

Витамин E (0,1% спиртовой раствор).

Проведение анализа.

В сухую пробирку вносят 2 капли раствора витамина E и добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты. Пробирку встряхивают и наблюдают появление красного окрашивания. Для ускорения реакции пробирку можно поместить на 3 мин в кипящую водяную баню.

РЕАКЦИЯ НА ВИКАСОЛ (СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ ВИТАМИНА K₁)

Принцип.

Викасол в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Реактивы.

1) 0,025% раствор цистеина. 2) 10% раствор натрия гидроксида

Материал для исследования.

Викасол (0,05% раствор).

Проведение анализа.

К 5 каплям викасола добавляют 5 капель раствора цистеина и 1 каплю NaOH. Развивается лимонно-желтое окрашивание.

Практическое значение.

Качественные реакции на витамины позволяют установить подлинность (достоверность) витаминных лекарственных препаратов, а также использовать их для обнаружения и количественного определения витаминов в пищевых объектах и лекарственных растениях.

Оформление работы.

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа в таблице и делают вывод о наличии витаминов с исследуемым материалом.

Название исследуемого витамина	Химическая формула	Реакция обнаружения	Наблюдаемое окрашивание

Лабораторная работа 2.**Обнаружение жирорастворимых витаминов в биологическом материале**Цель работы

Сравнительная оценка пищевых источников по содержанию в них жирорастворимых витаминов.

В работе используются те же методы, которые применялись в работе «Качественные реакции на витамины».

Оформление работы.

Результаты работы представляются в виде таблицы. Делается вывод о лучших источниках жирорастворимых витаминов.

Исследуемые витамины	Материал исследования	Реакция обнаружения	Окраска и вывод о наличии витамина
Витамин А (ретинол)	1. Рыбий жир 2. Растительное масло 3. Молоко 4. Плоды шиповника 5. Плоды облепихи		

Витамин D (кальциферол) и его провитамины	1.Рыбий жир 2.Растительное масло 3. Молоко 4. Сухие дрожжи		
Витамин E (токоферол)	1.Рыбий жир 2.Растительное масло 3. Молоко		

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Характеристика отдельных водорастворимых витаминов. Их строение и биологическая роль.
- 2) Составьте таблицу по водорастворимым витаминам

Название витамина (буквенное, химическое, физиологическое)	Химическая формула	Суточная доза	Биологическая роль	Биологически активная форма (кофермент)	Признаки гиповитаминоза	Пищевые источники	Лекарственные формы

Лабораторная работа 3.

Качественные реакции на водорастворимые витамины.

Реактивы:

1) 10% раствор NaOH, 2) конц. HCl, 3) 1% раствор FeCl₃, 4) 10 % раствор тиомочевины, 5) 10% CH₃COOH, 6) 5% раствор Cu(CH₃COO)₂, 7) изобутиловый спирт, 8) цинк металлический. 9) 5% раствор калия гексацианоферрата K₃Fe(CN)₆, 10) порошок гидросульфита натрия, 11) 2,6-дихлорфенолиндофенол (краска Тильманса, 0,1%), 12) 10% HCl, 13) 10% раствор Na₂CO₃, 14) 0,01% раствор метиленового синего, 15) 2% HCl.

Оборудование.

Электроплитка, беззольные фильтры, ртутно-кварцевая лампа.

Исследуемый материал

6% р-р тиамин бромид, 5% раствор пиридоксин гидрохлорида, никотиновая кислота, таблетки рибофлавина, витамин B₁₂,

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ТИАМИН.

Принцип

В щелочной среде тиамин окисляется железосинеродистым калием в тиохром, который обладает интенсивной синей флуоресценцией в ультрафиолетовом свете.

Исследуемый материал

5% раствор тиамина.

Проведение анализа.

К 1-2 каплям раствора тиамина или 1-2 мг порошка прибавляют 5-10 капель раствора NaOH и 2 капли раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, перемешивают. Нагревают и наблюдают флуоресценцию в лучах ртутно-кварцевой лампы.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА РИБОФЛАВИН.

Реакция флуоресценции

Рибофлавин обладает окислительно-восстановительными свойствами. Это связано с наличием двойных связей в структуре изоаллоксазинового кольца, по месту разрыва которых могут присоединяться к азоту два протона и два электрона окисляемого субстрата.

Принцип

Метод основан на способности окисленных форм рибофлавина и флавиновых коферментов давать в ультрафиолетовом свете желто-зеленую флуоресценцию, интенсивность которой зависит от их концентрации. Восстановленные формы флавинов не флуоресцируют.

Материал исследования.

1) 0,025% раствор рибофлавина, перед употреблением разводят в 5 раз, 2) 0,1% раствор рибофлавиннуклеотида в ампулах, из которого готовят 0,002% раствор, 3) флавинат в ампулах, содержащий 0,002% раствор ФАД.

Проведение анализа

В три пробирки вносят: В 1 пробирку — 10 капель рибофлавина, во 2 пробирку — 10 капель рибофлавинмононуклеотида, в 3 пробирку — 10 капель флавината. Приливают в каждую по 5 мл дистиллированной воды. Перемешивают. Прибавляют в каждую пробирку на кончике скальпеля порошок натрия гидросульфита (восстановитель) и наблюдают за гашением флуоресценции.

Реакция восстановления

Принцип.

Метод основан на восстановлении рибофлавина водородом, выделяющимся при добавлении металлического цинка к концентрированной HCl. В начале образуется промежуточный продукт родофлавин розового цвета, а затем бесцветная лейкоформа.

Материал исследования.

0,025% раствор рибофлавина, перед употреблением разводят в 5 раз,

Проведение анализа.

К 10 каплям раствора витамина B₂ добавляют 5 капель концентрированной HCl и гранулу металлического цинка. Жидкость окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. Сравнить обе формы витамина B₂ по степени флуоресценции.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ.

Принцип

При нагревании витамина PP с раствором уксуснокислой меди образует плохо растворимый синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Материал исследования.

Порошок никотиномаида.

Проведение анализа.

5-10 мг (щепотка) никотиновой кислоты помещают в пробирку с 10 каплями раствора уксусной кислоты и растворяют при нагревании. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем раствора уксуснокислой меди. Жидкость становится мутной. При стоянии и постепенном охлаждении раствора выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ПИРИДОКСИН.

Принцип

Витамин B₆ с FeCl₃ образует комплексную соль красного цвета типа фенолята железа.

Материал исследования.

1% раствор витамина B₆.

Проведение анализа.

К 5 каплям раствора витамина B₆ прибавляют равное количество раствора FeCl₃. Развивается красное окрашивание.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЦИАНКОБАЛАМИН.

Принцип

При взаимодействии ионов кобальта, содержащихся в витамине, с тиомочевинной при нагревании образуется роданид кобальта зеленого цвета.

Материал исследования.

Минерализат витамина В₁₂.

Проведение анализа.

На беззольный фильтр наносят 2-3 капли тиомочевины, высушивают над плиткой. Параллельно в пробирку вносят 5 капель раствора витамина В₁₂, 5 капель концентрированной серной кислоты и сжигают (минерализуют) при нагревании под тягой. Затем пробирку охлаждают под током воды и добавляют 1 мл воды. На фильтр наносят 1-2 капли минерализата и вновь высушивают. На фильтре по краям пятна появляется зеленое окрашивание, свидетельствующее о наличии кобальта.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АСКОРБИНОВУЮ КИСЛОТУ.

Принцип

Аскорбиновая кислота обладает восстанавливающими свойствами и способна восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, метиленовый синий и калия гексацианоферрат $K_3Fe(CN)_6$, окисляясь при этом до дегидроаскорбиновой кислоты. 2,6-Дихлорфенолиндофенол и метиленовый синий восстанавливаются до бесцветных лейкосоединений, $K_3Fe(CN)_6$ до $K_4Fe(CN)_6$, который с ионами трехвалентного железа дает соль $Fe_4[Fe(CN)_6]$ синего цвета..

Материал исследования.

1% раствор аскорбиновой кислоты.

Проведение анализа.

1 реакция.

В пробирку вносят 10 капель раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, 1-2 капли 10% раствора HCl и каплями раствор аскорбиновой кислоты до обесцвечивания 2,6-дихлорфенолиндофенола.

2 реакция.

В две пробирки вносят по капле метиленового синего. В первую прибавляют 5 капель аскорбиновой кислоты, во вторую 5 капель дистиллированной воды и ставят в водяную баню (+40°C). Через некоторое время в пробирке с витамином жидкость обесцвечивается.

3 реакция.

К 10 каплям аскорбиновой кислоты прибавляют 10 капель калия гексацианоферрата $K_3Fe(CN)_6$ и 5 капель $FeCl_3$. Наблюдают образование сине-зеленого окрашивания (берлинская лазурь).

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о наличии витаминов в образцах.

Лабораторная работа 4.**Количественное определение содержания витамина С
в различных биологических объектах**Принцип.

Аскорбиновая кислота, содержащаяся в вытяжке из растительного сырья, восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенол. По количеству красителя, затраченному на титрование, определяют количество витамина С. Как только весь витамин С окислится, титруемый раствор приобретает розовую окраску за счет образования в кислой среде недиссоциированных молекул 2,6-дихлорфенолиндофенола.

*КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ
ВИТАМИНА С В МОЧЕ*

Материал для исследования: моча.

Проведение анализа.

В колбу отмеривают 5 мл мочи и 5 мл дистиллированной воды, перемешивают, прибавляют 2,5 мл раствора HCl . Титруют краской Тильманса до розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 секунд. Записывают объем. Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты в мг в суточном объеме мочи по формуле:

$$\text{Содержание аскорбиновой кислоты, мг / сут} = \frac{0,088 \cdot A \cdot B}{B}$$

где 0,088 — количество витамина С, соответствующее 1 мл 0,088 моль/л раствора краски Тильманса; А — количество краски, затраченной на титрование (мл); Б — средний суточный объем мочи (1000-1500 мл); В — объем мочи, взятый для титрования (мл).

Нормальные величины.

Моча 20-30 мг/сут

Практическое значение.

Метод используется в клинике для диагностики недостаточности витамина С в организме. Уровень витамина в моче снижается при цинге, острых и хронических инфекционных заболеваниях.

*КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ
ВИТАМИНА С В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ*

Материал для исследования:

Картофель, лук репчатый, свежая и квашеная капуста, плоды шиповника, морковь.

Проведение анализа.

При выполнении работы использовать данные таблицы.

Исследуемый продукт	Навеска, г	Количество H ₂ O для экстракции	Вид фильтра	Общее количество экстракта, V ₁	Количество экстракта для анализа, V ₂
Картофель	5	20	вата		10
Капуста свежая	5	20	вата		10
Капуста квашеная	10	20	вата		10
Морковь	5	15	вата		1мл экстракта и 5 мл H ₂ O
Лук репчатый	5	20	вата		10
Плоды шиповника	1	20	бумага		1мл экстракта и 5 мл H ₂ O

- 1) Выбрать по желанию 2 объекта исследования.
- 2) Приготовление экстракта витамина С. На аптечных весах взвешивают навеску исследуемого материала, помещают его в ступку, измельчают при необходимости ножницами, скальпелем, затем растирают в ступке с 5 мл 2% соляной кислоты, постепенно вливая дистиллированную воду согласно таблице. Оставляют на 5 минут.
- 3) Вытяжку фильтруют (тип фильтра определяют по таблице) в мерный цилиндр вместимостью 25 мл. Записывают общее количество экстракта (V₁).
- 4) Для исследования берут часть экстракта (V₂). Объем (согласно таблице) отмеривают мерной пробиркой и переносят в колбу для титрования.
- 5) Титруют краской Тильманса до розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 секунд. Записывают объем краски, затраченной на титрование.

6) Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты в мг в 100 г продукта или 100 мл экстракта по формуле:

$$\text{Содержание аскорбиновой кислоты, мг} = \frac{0,088 \cdot A \cdot V_1 \cdot 100}{V_2 \cdot B}$$

где 0,088 — количество витамина С, соответствующее 1 мл

0,088 моль/л раствора краски Тильманса;

A — количество краски, затраченной на титрование (мл);

B — количество продукта, взятого для анализа.;

V_1 — общее количество экстракта, мл;

V_2 — объем экстракта, взятый для титрования;

100 — пересчет на 100 г (или мл) продукта.

7) Рассчитать для двух объектов количество продуктов, необходимое для удовлетворения суточной потребности в витамине С.

Оформление работы.

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа. В выводах указать лучшие источники аскорбиновой кислоты.

ЗАНЯТИЕ 6-7. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ.

Актуальность: Ферменты — белковые молекулы, выполняющие в живой клетке функции биокатализаторов. Знания о строении и функционировании ферментов необходимы для изучения обмена веществ и его регуляции, для понимания патогенеза заболеваний, связанных с нарушением функционирования ферментов и основ лекарственной терапии.

Цель:

- 1) Знакомство со строением, свойствами, классификацией ферментов, особенностями ферментативного катализа.
- 2) Изучение основных механизмов регуляции действия ферментов.
- 3) Знакомство с методами обнаружения ферментов в тканях и биологических жидкостях, освоение способов измерения активности ферментов.

Студент должен знать:

- 1) Природу ферментов. Структурно-функциональную организацию ферментов. Механизм действия и свойства ферментов.
- 2) Регуляцию действия ферментов. Практическое использование ферментов и их ингибиторов в медицине.
- 3) Современную номенклатуру и классификацию ферментов.
- 4) Принципы количественного определения активности ферментов. Единицы измерения активности ферментов.

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Структурно-функциональная организация ферментов: простые и сложные белки-ферменты; полиферментные комплексы. Понятие об апоферменте, холоферменте, кофакторе.
- 2) Изоферменты.
- 3) Сходство и различие в действии ферментов и неорганических катализаторов.
- 4) Основные свойства ферментов: специфичность, термолабильность, зависимость активности от pH среды.
- 5) Механизмы катализа: принципы теории Фишера «ключ-замок», Кошленда и индуцированного соответствия.
- 6) Регуляция ферментативной активности: влияние активаторов и ингибиторов, аллостерические механизмы, ковалентная модифи-

кация, ограниченный протеолиз, изменение количества фермента и концентрации субстрата в клетке.

- 7) Принципы современной номенклатуры и классификации ферментов.
- 8) Классы ферментов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы (синтетазы). Общая характеристика каждого класса, основные подклассы, биохимическая роль.
- 9) принципы количественного определения активности ферментов. Единицы активности ферментов.
- 10) Практическое использование ферментов в медицине: энзимопатология, энзимодиагностика, энзимотерапия.
- 11) Применение ингибиторов ферментов в качестве лекарственных средств.

Лабораторная работа 1. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.

Реактивы.

- 1) 1% раствор крахмала, 2) раствор Люголя.

Материалы исследования.

Слюна, разведенная 1:10 (источник α -амилазы).

Принцип.

Гидролиз крахмала под действием амилазы проходит через стадии образования декстринов до дисахарида мальтозы. Нерасщепленный крахмал с йодом дает синее окрашивание. Декстрины в зависимости от размера молекул дают с йодом окрашивание: амилодекстрины — фиолетовое, эритродекстрины — красно-бурое, ахродекстрины и мальтоза — цветная реакция отсутствует, желтый цвет соответствует цвету водного раствора йода.

Проведение реакции.

1. Приготовление разведенной слюны 1:10: собирают 1 мл слюны в центрифужную пробирку и доводят дистиллированной водой до метки 10 мл, хорошо перемешивают.
2. В четыре пробирки (1, 2, 3, 4) вносят по 10 капель крахмала. В следующие 4 пробирки (5, 6, 7, 8) вносят по 10 капель разведенной слюны (раствор α -амилазы). Пробирки делят по парам — 1-5, 2-6, 3-7, 4-8.
3. Первую пару пробирок помещают в баню со льдом (0°C). Вторую пару оставляют при комнатной температуре (20°C). Третью пару

помещают в водяную баню при $t=38-40^{\circ}\text{C}$. Четвертую — в кипящую водяную баню (100°C).

4. Через 10 мин содержимое каждой пары пробирок объединяют, перемешивают и инкубируют еще 10 мин в тех же условиях.
5. Из третьей пробирки отбирают на предметное стекло 3 капли смеси и добавляют 1 каплю реактива Люголя. Если появится красное или желтое окрашивание (эритродекстрин, мальтоза), то это указывает на завершение гидролиза крахмала амилазой.
6. В каждую пробирку добавляют 2 капли реактива Люголя и наблюдают за появлением окраски в пробирках.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты и оформляют в виде таблицы:

N проб	Температура инкубации	Окраска с йодом	Скорость реакции
1	0°C		
2	20°C		
3	$38-40^{\circ}\text{C}$		
4	100°C		

Лабораторная работа 2.

Специфичность действия ферментов.

Реактивы:

1) 1% раствор мочевины, 2) 1% раствор тиомочевины, 3) 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина, 4) лакмусовая бумага, 5) препарат фермента уреазы, 6) 1% раствор крахмала, 7) 1,0% раствор сахаразы, 8) реактив Фелинга: 10 капель реактива Фелинг I и 10 капель реактива Фелинг II, готовят ex tempore.

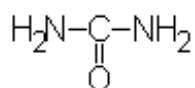
Материал исследования.

Препарат уреазы; слюна, разведение 1:10 (источник α -амилазы).

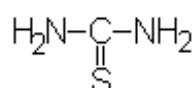
ОБНАРУЖЕНИЕ АБСОЛЮТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА УРЕАЗЫ.

Принцип.

Метод основан на сравнении возможности гидролиза уреазой субстратов, сходных по строению мочевины и тиомочевины.

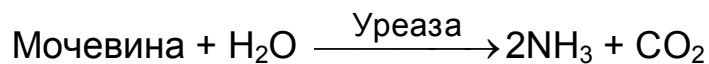


Мочевина



Тиомочевина

Действие фермента обнаруживается по изменению окраски индикаторов: фенолфталеина или лакмусовой бумажки в присутствии аммиака, который образуется при гидролизе мочевины ферментом уреазой.



Проведение реакции.

1. Приготовление препарата уреазы (выполняет дежурный для всей группы). Очистить 3-4 семечка арбуза, зерна растереть в ступке в 1 мл дистиллированной воды, затем довести объем до 10 мл. Полученную эмульсию фильтруют через двойной слой марли и используют как препарат фермента уреазы.
2. Берут две пробирки. В одну добавляют 10 капель раствора мочевины, в другую — 10 капель раствора тиомочевины.
3. Добавляют в каждую пробирку по 10 капель препарата уреазы и по 1-2 капли фенолфталеина. Перемешивают.
4. Через несколько минут наблюдают за появлением розовой окраски в одной из пробирок.

ОБНАРУЖЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ.

Принцип.

Метод основан на сравнительном изучении способности фермента амилазы гидролизовать разные углеводные субстраты: полисахарид крахмал и дисахарид сахарозу. Действие фермента на субстрат выявляют при помощи качественной реакции на свободную альдегидную группу углеводов (реакция Фелинга). Крахмал и сахароза не имеют свободной альдегидной группы, поэтому не дают положительной реакции с реактивом Фелинга. Реакция может быть положительной (красно-оранжевая окраска) только в случае расщепления этих субстратов на мономеры (мальтоза и глюкоза), которые имеют свободную альдегидную группу и обладают восстанавливающими свойствами.

Проведение реакции.

1. Приготовление разведенной слюны 1:10: собирают 1 мл слюны в центрифужную пробирку и доводят дистиллированной водой до метки 10 мл, хорошо перемешивают.
2. Берут две пробирки. В одну добавляют 10 капель крахмала, в другую — 10 капель раствора сахарозы.
3. Добавляют в каждую пробирку по 5 капель разбавленной слюны, перемешивают и ставят в водяную баню (37°C) на 10 минут.

4. Прodelывают с содержимым проб реакцию Фелинга: к 5 каплям исследуемого раствора добавляют 3 капли реактива Фелинга, приготовленного самостоятельно (см выше). Пробирки нагревают до кипения и кипятят 1 минуту. Сравнивают окраску в пробирках.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о специфичности действия уреазы и α -амилазы.

Лабораторная работа 3. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы.

Принцип.

Метод основан на сравнении скорости гидролиза крахмала под действием амилазы слюны до и после добавления ионов Cl^- и Cu^{2+} . Действие фермента на субстрат выявляется при помощи реакции с йодом.

Реактивы:

1) 1% раствор CuSO_4 , 2) Раствор Люголя, 3) 0,9% раствор NaCl .

Материал исследования.

Слюна, разведенная 1:10 (источник α -амилазы).

Проведение реакции.

1. Приготовление разведенной слюны 1:10: собирают 1 мл слюны в центрифужную пробирку и доводят дистиллированной водой до метки 10 мл, хорошо перемешивают.
2. Берут три пробирки. В первую добавляют 10 капель дистиллированной воды, во вторую — 10 капель раствора NaCl , в третью — 10 капель раствора CuSO_4 .
3. Добавляют в каждую пробирку по 10 капель разбавленной слюны, перемешивают.
4. Добавляют по 10 капель раствора крахмала.
5. Ставят в водяную баню (37°C) на 5 минут.
6. Готовят три пробирки с водой по 1 мл в каждой, добавляют 1-2 капли реактива Люголя и прибавляют по 5 капель содержимого опытных пробирок. Сравнивают окраску в пробирках. Если существенной разницы в окраске нет, то инкубацию опытных проб увеличивают до 10-15 минут.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о влиянии ионов хлора и меди на активность α -амилазы.

Класс насчитывает около 200 ферментов, подразделяется на 8 подклассов в зависимости от строения переносимых ими групп.
Подклассы.

2.1. Ферменты, переносящие одноуглеродные остатки: метила ($-\text{CH}_3$), формила ($-\text{COH}$), метилена ($=\text{CH}_2$). и др.

Пример:

Реакция



Активная форма метионина

Фермент: Метилтрансфераза.

Кофермент: Тетрагидрофолиевая кислота.

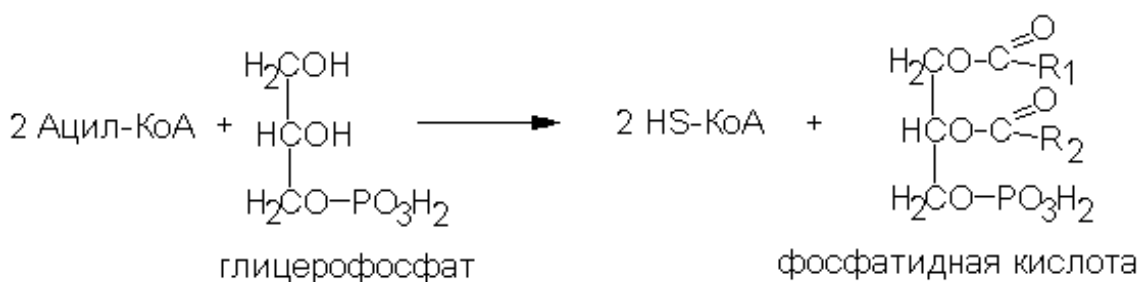
Витамин: Фолиевая кислота.

Биохимическая функция: Синтез медиаторов нервной ткани: ацетилхолина, катехоламинов, а также других веществ: креатина, фосфатидилхолина.

2.2. Ацилтрансферазы: переносят ацильный остаток на другое вещество.

Пример:

Реакция:



Фермент: Ацилтрансфераза.

Кофермент: Кофермент А

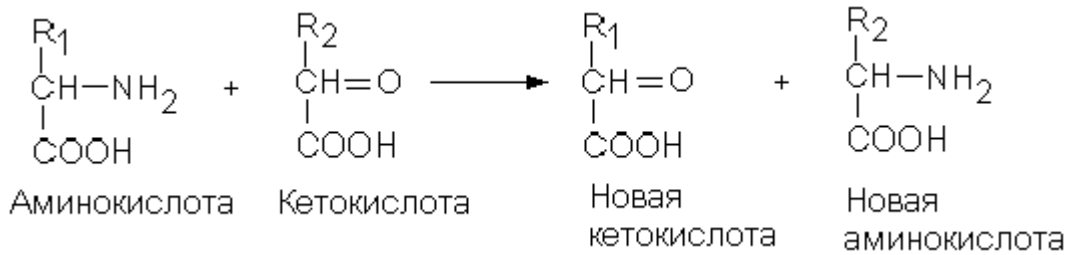
Витамин: Пантотеновая кислота.

Биохимическая функция: Синтез нейтрального жира, превращение свободных жирных кислот и т.д.

2.3. Аминотрансферазы: катализируют реакции трансаминирования — переноса аминогрупп с α -аминокислоты на α -кетокислоту.

Пример:

Реакция



Фермент: Аминотрансфераза

Кофермент: Пиридоксальфосфат.

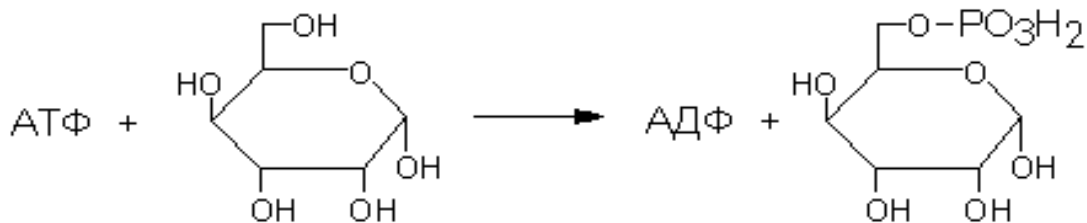
Витамин: Пиридоксин.

Биохимическая функция: Важнейшие ферменты метаболизма свободных аминокислот. Определяются в клинике для диагностических целей. Так, активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) определяется для диагностики вирусного гепатита, активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ) при инфаркте миокарда.

2.4. Фосфотрансферазы (киназы). Перенос остатка фосфорной кислоты АТФ на другие вещества.

Пример:

Реакция



Фермент: Гексокиназа

Кофермент: Кофактор Mg^{2+}

Биохимическая функция: В результате действия киназ в организме синтезируются многочисленные фосфорилированные соединения.

III класс. Гидролазы.

Гидролазы — ферменты, осуществляющие разрыв внутримолекулярных связей в субстрате (за исключением С-С связей) путем присоединения элементов H_2O . Класс насчитывает около 460 ферментов, подразделяется на 11 подклассов.

Гидролазы сосредоточены в основном в желудочно-кишечном тракте и в лизосомах клеток тканей. Осуществляют распад макромолекул, образуя легко адсорбируемые мономеры.

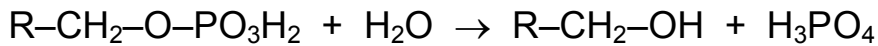
Подклассы.

3.1. Эстеразы — ферменты, гидролизующие сложноэфирные связи.

а) Фосфоэстеразы или фосфатазы — гидролизуют сложноэфирные связи, образованные спиртами и фосфорной кислотой. К ним относятся кислые и щелочные фосфатазы (малоспецифичны), 1,6-фруктозобифосфатаза (высокоспецифична).

Пример:

Реакция

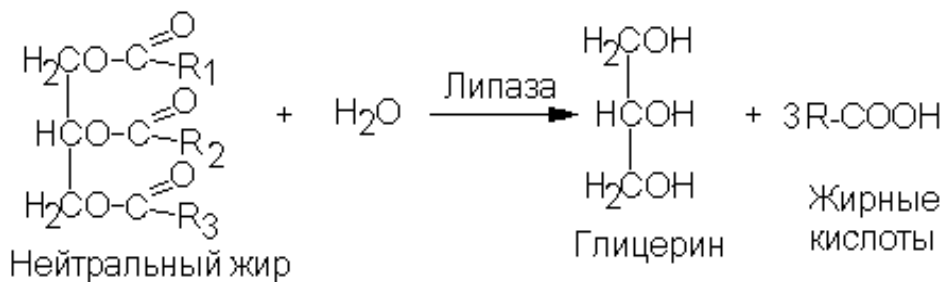


Применение в медицине: Активность фосфатаз определяется для диагностических целей. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) увеличивается в сыворотке крови при ряде заболеваний костной ткани (рахит, остеосаркома, метастазы опухоли в кости), активность кислой фосфатазы (КФ) увеличивается в сыворотке крови при раке предстательной железы.

б) Карбоксиэстеразы осуществляют гидролиз сложных эфиров, образованных спиртами и органическими кислотами.

Пример:

Реакция:



Биохимическая функция: Активность липазы, фосфолипазы резко повышается в крови при поражениях поджелудочной железы.

3.2. Гликозидазы — ферменты, расщепляющие связи в углеводах. К гликозидазам относят α -амилазу (слюнную и поджелудочную), осуществляющую гидролиз α -1,4-гликозидной связи в крахмале, гликогене и т.д.

Применение в медицине: Диагностика нарушения функции поджелудочной железы. При воспалении поджелудочной железы активность α -амилазы увеличивается в крови и моче.

3.3. Пептидгидролазы — ферменты, гидролизующие пептидные связи.

а) Эндопептидазы гидролизуют внутренние пептидные связи в белковой молекуле.

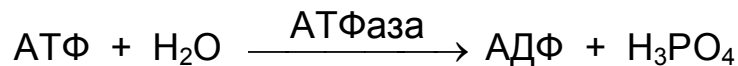
К эндопептидазам относят пепсин — фермент желудочного сока; катепсин I — фермент, аналогичный пепсину, находится в лизосомах клетки; трипсин — фермент панкреатического сока; катепсин II — лизосомальный аналог трипсина; химотрипсин — фермент панкреатического сока.

б) Экзопептидазы гидролизуют внешние пептидные связи в белковой молекуле (отщепляют концевые аминокислоты в пептидной цепи).

К экзопептидазам относят: аминопептидазы — разрывают пептидную связь с N-конца пептида, карбоксипептидазы — отщепляют аминокислоту с C-конца пептида.

3.4. Полифосфатазы — ферменты, гидролизующие фосфорно-ангидридные связи.

Примером полифосфатаз является фермент аденозинтрифосфатаза (АТФ-аза):



IV класс. Лиазы.

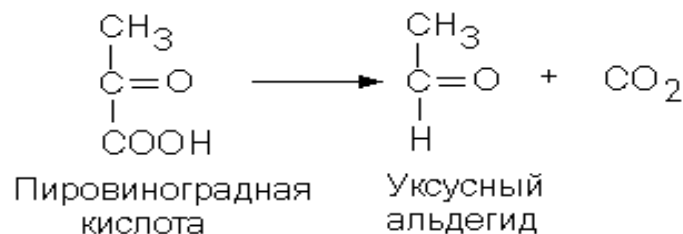
Лиазы — ферменты, катализирующие разрыв C–O, C–C, C–N и других связей, а также обратимые реакции отщепления различных групп субстратов не гидролитическим путем. Эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту двойной связи. Класс насчитывает около 230 ферментов. Лиазы — сложные ферменты.

Подклассы.

4.1. Лиазы, разрывающие связь C–C.

Пример:

Реакция



Фермент: Пируватдекарбоксилаза

Кофермент: Тиаминдифосфат (ТДФ)

Витамин: Тиамин

Биохимическая функция: Ферменты участвуют в синтезе и распаде промежуточных продуктов обмена с образованием конечных продуктов: CO_2 , H_2O , NH_3 .

4.2. Лиазы, разрывающие связь С–О.

Пример:

Реакция:



Фермент: Карбоангидраза

Кофермент: Содержит Zn.

V класс. Изомеразы

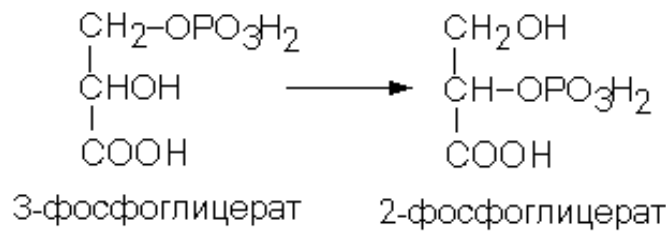
Изомеразы — ферменты, катализирующие изомерные превращения в пределах одной молекулы. Класс насчитывает более 80 ферментов. Изомеразы — сложные ферменты. К их коферментам относятся пиридоксальные, кобамидные, пептидные (глутатион), фосфаты моносахаридов (глюкозо-1,6-дифосфат) и др.

Подклассы.

5.1. Мутазы — внутримолекулярные трансферазы.

Пример:

Реакция



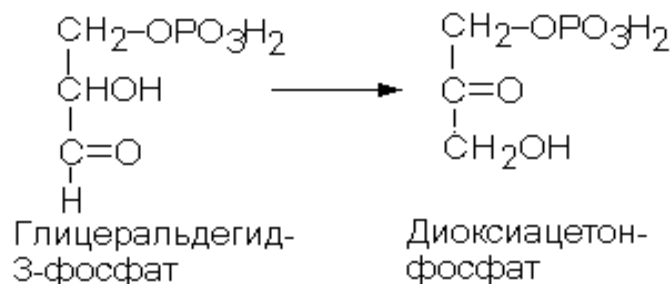
Фермент: Фосфоглицеромутаза

Биохимическая функция: Изменение биологической активности молекул, переключение использования метаболитов на различных путях обмена веществ.

5.2. Внутримолекулярные оксидоредуктазы

Пример:

Реакция



Фермент: Триозофосфатизомераза

VI класс. Лигазы

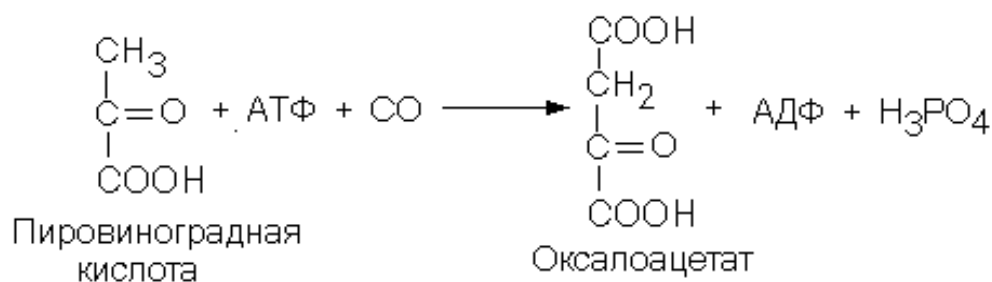
Лигазы (синтетазы) — ферменты, катализирующие присоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии высокоэнергетических связей АТФ (или других макроэргов). Лигазы — сложные ферменты. Они содержат нуклеотидные, биотиновые (витамин Н), фолиевые коферменты.

Подклассы.

6.1. Ферменты, синтезирующие С–С связи.

Пример:

Реакция



Фермент: Пируваткарбоксилаза

Биохимическая функция: синтез веществ в клетке: нуклеотидов, мочевины, гема и др.

Лабораторная работа 4.

Качественные реакции обнаружения ферментов в биологических объектах.

ВЫЯВЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ КАТАЛАЗЫ.

Реактивы.

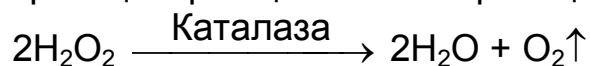
3% раствор H_2O_2 . Готовить ex tempore.

Материалы исследования.

Свежая кровь — источник фермента каталазы.

Принцип.

Каталаза ускоряет реакцию расщепления пероксида водорода:



В этой реакции одна молекула пероксида водорода окисляется и служит донором электронов, а другая восстанавливается и является акцептором электронов. Фермент выявляется по появлению пузырьков кислорода.

Проведение анализа.

В две пробирки вносят по 10 капель пероксида водорода. В одну из пробирок добавляют 1 каплю крови, в другую — не добавляют. Сравнивают полученные результаты и объясняют их.

*ОБНАРУЖЕНИЕ АНАЭРОБНЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ДРОЖЖАХ*Реактивы.

1) 10% раствор глюкозы. 2) метиленовый синий.

Материалы исследования.

Кипяченые и не кипяченые пекарские дрожжи.

Принцип.

Анаэробные дегидрогеназы дрожжей — сложные ферменты, их коферментами являются ФАД и НАД. Они катализируют реакции переноса атомов водорода от альдегидов, альдегидоспиртов на промежуточный субстрат (акцептор). Обнаружение дегидрогеназ проводится по изменению окраски (обесцвечиванию) добавленного к суспензии дрожжей метиленового синего (акцептора), который при восстановлении обесцвечивается.

Проведение анализа.

Берут две пробирки. В первую наливают 10 капель суспензии кипяченых дрожжей, во вторую — 10 капель не кипяченых дрожжей. В обе пробирки добавляют по 10 капель 10% раствора глюкозы и 1-2 капли метиленового синего. Пробирки закрывают пробками и помещают в водяную баню при 30°C. Наблюдаем изменение окраски в одной пробирке.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, результаты вносят в таблицу.

Исследуемый материал	Фермент, его класс	Катализируемая реакция	Субстрат реакции	Как обнаруживается фермент

Лабораторная работа 5.**Количественное определение активности ферментов.**Единицы измерения активности ферментов

Активность ферментов определяют, используя методы спектрофотометрии, полярографии, фотометрии обычно по убыли субстрата или по образованию конечного продукта реакции за определенный промежуток времени. Активность ферментов принято выражать в условных единицах, так как ничтожно малая концентра-

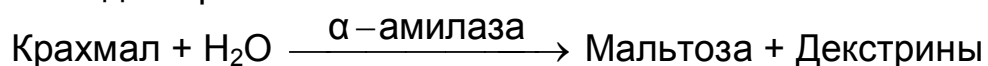
ция их, сложность выделения и идентификация затрудняют измерение их абсолютных величин.

За международную единицу активности фермента (Е) принимают такое его количество, которое способно превратить 1 мкмоль субстрата за 1 минуту при 30°C и других оптимальных условиях. Концентрацию фермента в растворе выражают в международных единицах в расчете на 1 мл или 1 л (Е/мл, Е/л). Например, Если при инкубации 0,5 мл экстракта печени с раствором аргинина за 15 мин разложилось 120 мкмоль аргинина, это означает, что в 0,5 мл экстракта содержится $120/15=8\text{Е}$ фермента аргиназы. Если в 0,5 мл экстракта содержится 8Е аргиназы, то ее активность равна $8/0,5=16\text{ Е/мл}$ или 1600 Е/л.

Часто бывает необходимость выражать активность ферментов не в расчете на объем раствора, а в расчете на содержание белка. Так получают удельную активность фермента, которая выражается в единицах активности на 1 мг белка (Е/мг). Например, если в 0,5 мл экстракта, содержащего 8 Е аргиназы, обнаружено 20 мг белка, то удельная активность равна $8/20=0,4\text{Е/мг}$.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ α-АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ

α-Амилаза (диастаза, 1,4-α-D-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.1.) катализирует гидролиз α-1,4-глюкозидных связей крахмала и гликогена до мальтозы и декстринов.



У здорового человека в крови в небольшом количестве содержится амилаза двух изоферментных типов: панкреатический — Р-тип (около 30%) и слюнной — S-тип (около 70%), которые попадают в кровь в результате естественного старения и отмирания клеток слюнных желез и поджелудочной железы. Фермент имеет относительно низкую молекулярную массу (около 48000 Д), фильтруется в почечных клубочках и присутствует в моче. Соотношение изоферментов в моче иное, чем в крови: Р-тип — 70%, S-тип — до 30 %.

Реактивы.

1) Фосфатный буфер, рН 7,0, 2) крахмальным субстрат, 3) 9 ммоль/л раствор NaCl, 4) осаждающий раствор: 1,85 ммоль/л MgSO₄, сульфосалициловая кислота (2 ммоль/л).

Материалы исследования.

Сыворотка крови

Принцип.

α -Амилаза катализирует гидролиз нерастворимого цветного крахмального субстрата с образованием синего, растворимого в воде красителя. Количество освобожденного красителя пропорционально каталитической активности фермента.

Проведение анализа.

	ОПЫТ 1, мл	ОПЫТ 2, мл
Суспензия субстрата	1,0	1,0
Инкубируют при 37°C в течение 5 мин		
Сыворотка	0,10	—
Моча	—	0,05
Инкубируют точно 15 мин при 37°C .		
Осаждающий раствор	2,0	2,0
Через 15 мин центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин (или фильтруют через вату). Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости против воды при длине волны 590 нм (зеленый светофильтр).		

Расчет.

Активность фермента в сыворотке крови находят по приложенной калибровочной таблице, исходя из полученной оптической плотности.

Оптическая плотность	Активность фермента (Е/л)	Оптическая плотность	Активность фермента (Е/л)
0,046.....	40	0,402.....	400
0,068.....	60	0,449.....	450
0,089.....	80	0,495.....	500
0,110.....	100	0,501.....	550
0,120.....	110	0,587.....	600
0,130.....	120	0,679.....	700
0,150.....	140	0,769.....	800
0,170.....	160	0,859.....	900
0,190.....	180	0,948.....	1000
0,210.....	200	1,037.....	1100
0,229.....	220	1,125.....	1200
0,259.....	250	1,212.....	1300
0,288.....	280	1,473.....	1600
0,307.....	300	1,645.....	1800
0,354.....	350	1,816.....	2000

При определении активности фермента в моче полученную по таблице каталитическую активность необходимо умножить на 2.

Если проба имеет высокую активность, ее разбавляют физиологическим раствором, определение проводят снова, а результат умножают на разведение.

Нормальные величины.

Сыворотка	140-350 Е/л
Моча	1000-2000 Е/л

Практическое значение

Повышение активности фермента происходит главным образом при заболеваниях поджелудочной железы. При остром панкреатите активность в крови и моче возрастает в 10-30 раз. Возрастание активности фермента выявляется при беременности, почечной недостаточности, кишечной непроходимости, заболеваниях желчных путей, диабетическом кетоацидозе, некоторых опухолях легких и яичников, поражении слюнных желез.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о возможной патологии.

ЗАНЯТИЕ 8. КОНТРОЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ ПО РАЗДЕЛУ «БЕЛКИ, ФЕРМЕНТЫ, ВИТАМИНЫ».

Белки

1. Какие вещества называются белками? Биологическая роль белков.
2. Аминокислотный состав белков. Строение 20 природных аминокислот, их классификация по строению радикала. Функциональные группы аминокислот, их роль. Заменяемые и незаменимые аминокислоты.
3. Физико-химические свойства белков.
4. Уровни структурной организации белковой молекулы. Типы связей, стабилизирующих структуру белковой молекулы.
5. Виды осаждения белков. Высаливание, механизм высаливания, использование в биохимии. Необратимое осаждение белков, механизм, использование в биохимии и медицине.
6. Составить пептид, назвать его, определить суммарный заряд, растворимость, зону рН, в которой находится его изоэлектрическая точка.
7. Белки простые и сложные. Представление о структуре и биологической роли фосфо-, глико-, липо- и нуклеопротеинов. Структура мононуклеотидов. Строение АМФ, АДФ, АТФ, 3,5-цАМФ.
8. Классификация белков по функциям (примеры).

Практическая часть

1. Цветные реакции на белок и аминокислоты.
2. Реакции осаждения белков. Механизм и прикладное значение.
3. Определение компонентов фосфо-, глико-, и нуклеопротеинов.
4. Тимоловая проба и проба Вельтмана. Клинико-диагностическое значение.

Витамины

1. Какие вещества относятся к витаминам? Ученые — основоположники витаминологии. Классификация и номенклатура витаминов. Гиповитаминоз, авитаминоз (экзогенный, эндогенный). Гипервитаминоз.
2. Провитамины и антивитамины (примеры).
3. Строение витаминов А, D₃, В₁, В₂, В₆, РР, С и их биологически активных форм — коферментов (ТДФ, ФМН и ФАД, НАД и НАДФ, ПФ).

4. Характеристика витаминов А, D₃, Е, К, F, С, В₁, В₂, В₆, РР, В₁₂, В_С, (фолиевая кислота), В₃ (пантотеновая кислота), Н (биотин) по следующему плану: 1- химическая структура и биологически активная форма витамина; 2 - признаки недостаточности витамина; 3- биологическая роль; 4 - источники витамина, образование из провитамина; 5 - суточная потребность.
5. Витамины — лекарственные препараты.

Практическая часть

1. Количественное определение витамина С в моче и картофеле. Принцип, ход анализа, расчет.

Ферменты

1. Какие вещества называют ферментами? Химическая природа. Проферменты, изоферменты.
2. Сходство и различия между ферментами и неферментными катализаторами.
3. Структурно-функциональная организация ферментов (уровень структуры, простые и сложные белки-ферменты, апофермент, кофактор, кофермент, активный и аллостерический центры). Роль апофермента и кофермента в катализе.
4. Классификация ферментов. Химическое строение НАД, ФАД, НАДФ, ФМН, ТДФ, ПФ. Витамины, входящие в состав данных коферментов.
5. Какие методы осаждения белков используются для получения ферментов?
6. Изоферменты. Значение определения изоферментов в клинической практике.
7. Механизм действия ферментов.
8. Основные свойства ферментов: специфичность, влияние температуры, рН Среды, активирование и ингибирование ферментов.
9. Регуляция активности ферментов. Аллостерический механизм, фосфорилирование и дефосфорилирование, частичный протеолиз.
10. Принцип количественного определения активности ферментов в биологических объектах. Единицы активности ферментов.
11. Использование ферментов в медицине: энзимодиагностика, энзимотерапия, энзимонатология.
12. Принцип современной номенклатуры и классификация ферментов.

13. Характеристика ферментов по схеме: класс, основные подклассы, строение, коферменты, катализируемая реакция, биологическая роль.

Практическая часть

1. Количественное определение активности амилазы в моче. Принцип, ход анализа, практическое значение.
2. Исследование основных свойств ферментов на примере амилазы слюны.
3. Определение оксидоредуктаз в биологических объектах.

ЗАНЯТИЕ 9. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ.

Актуальность:

Биологическое окисление протекает во всех живых клетках организма в виде совокупных окислительных реакций. Основной функцией этого процесса является обеспечение организма энергией для процессов жизнедеятельности. Основной формой запасания энергии, доступной для использования, является аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). Синонимом биологического окисления является тканевое дыхание. Процесс биологического окисления протекает многостадийно с участием промежуточных ферментативных реакций. Происходит многократная передача протонов и электронов или только электронов от донора к акцептору. Конечным акцептором электронов и протонов служит $\frac{1}{2}\text{O}_2$. Конечными продуктами тканевого дыхания являются вода окисления и диоксид углерода (H_2O и CO_2). Процесс фосфорилирования, сопряженный с тканевым дыханием, называется окислительным фосфорилированием. Чрезвычайно важной функцией цепи дыхательных ферментов митохондрий наряду с передачей электронов является аккумуляция части освобождающейся энергии в фосфатных связях макроэргических соединений.

Цель:

- 1) Ознакомиться с процессами биологического окисления и конечными продуктами тканевого дыхания.
- 2) Изучить механизмы окислительных реакций в клетке и строение основных коферментов тканевого дыхания.
- 3) Изучить механизмы процессов окислительного фосфорилирования.
- 4) Изучить пути образования макроэргов с определением количества образующейся АТФ в процессе тканевого дыхания, сопряженного с окислительным фосфорилированием.
- 5) *Студент должен:*
- 6) Иметь понятие об обмене веществ
- 7) Знать пластическую и энергетическую функции метаболизма.
- 8) Знать стадии катаболических превращений питательных веществ в организме, связанные с высвобождением свободной энергии.
- 9) Знать формы трансформации свободной энергии — образование восстановленных эквивалентов (НАДФН·Н) и синтез "макроэргиче-

- ских" соединений (АТФ, 1,3-дифосфоглицерат, креатинфосфат, ацил-S-КоА и др).
- 10) Знать взаимосвязь катаболизма и анаболизма.
 - 11) Знать циклы АТФ – АДФ и НАДФН·Н – НАДФ. (АТФ — универсальный источник и переносчик химической энергии в клетке, химическое строение и свойства молекулы АТФ).
 - 12) Иметь понятие о тканевом дыхании (биологическом окислении) и локализации ферментов тканевого дыхания в клетке.
 - 13) Знать строение митохондрий.
 - 14) Знать основные процессы тканевого дыхания.
 - 15) Знать механизм окислительного декарбоксилирования пирувата.
 - 16) Знать строение мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса; роль коферментов.
 - 17) Иметь представление о витаминах как лекарственных препаратах.
 - 18) Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса) — универсальный механизм окисления.
 - 19) Знать схему взаимосвязей ЦТК с катаболизмом углеводов, липидов, белков (ацетил-КоА — ключевая фигура метаболизма).
 - 20) Знать химические реакции цикла трикарбоновых кислот.
 - 21) Знать дегидрогеназы цикла Кребса и их коферменты.
 - 22) Знать биологическую роль цикла трикарбоновых кислот.
 - 23) Знать роль кислорода — конечного акцептора протонов и электронов восстановленных субстратов биологического окисления.
 - 24) Знать строение цепи переноса электронов внутренней мембраны митохондрий.
 - 25) Знать молекулярную организацию ферментных ансамблей, роль коферментов (ФМН, FeS-белки, коэнзим Q, гемовые группы цитохромов).
 - 26) Знать изменение свободной энергии в процессе переноса электронов и образование АТФ.
 - 27) Знать трансмембранный перенос протонов и механизм окислительного фосфорилирования.
 - 28) Иметь представление о протонной АТФ-синтетазе.
 - 29) Знать метод вычисления коэффициента P/O.
 - 30) Знать причины разобщения дыхания и фосфорилирования.
 - 31) Иметь представление о регуляции сопряжения окисления и фосфорилирования, физиологическое значение.
 - 32) Иметь представление о применении нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ, ФМН) в качестве лекарственных препаратов.

ЗАНЯТИЕ 10. ВНЕШНИЙ ОБМЕН БЕЛКОВ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ В ЖЕЛУДОЧНО- КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ.

Актуальность: Пищевые продукты животного и растительного происхождения являются главными источниками белков для человека. В желудочно-кишечном тракте идет последовательное расщепление белков до аминокислот. Протеолитические ферменты (класс гидролаз) обладают относительно широкой специфичностью. Пепсин желудочного сока устойчив в сильно-кислой среде, условия для активации и действия пепсина создаются в желудке за счет соляной кислоты, рН чистого желудочного сока — 1,0-2,0. Поэтому методы анализа состава желудочного сока имеют большое значение для оценки переваривающей способности желудочного сока в норме и при патологии.

Цель:

Освоение методов качественного и количественного анализа желудочного сока для исследования секреторной функции желудка здорового организма и возможных отклонений при патологии.

Студент должен знать:

- 1) Состав желудочного сока и роль отдельных компонентов — соляной кислоты и ферментов.
- 2) Пути активации протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта.
- 3) Метаболизм аминокислот под действием ферментов бактерий толстого кишечника с образованием токсичных продуктов обмена. Пути их нейтрализации в печени.

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Роль белков в организме.
- 2) Понятие «азотистый баланс» и возможные его изменения (равновесие, положительный и отрицательный азотистый баланс).
- 3) Нормы белка в питании. Биологическая ценность белков.
- 4) Переваривание белков. Протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта.
- 5) Механизмы активации основных ферментов (пепсин, трипсин, химотрипсин).
- 6) Переваривание белков в желудке. Роль соляной кислоты.

- 7) Превращения аминокислот под действием микрофлоры кишечника.
- 8) Пути образования крезола, фенола, скатола и индола.
- 9) Обезвреживание токсичных продуктов в печени.

**Лабораторная работа 1.
Определение свободной соляной кислоты
в желудочном соке.**

Отклонения в составе пищеварительных соков или появление в них компонентов, не содержащихся в физиологических условиях, дает важную информацию о патологии пищеварения. В клинической практике используют методы анализа желудочного сока для диагностики и лечения заболеваний.

При анализе желудочного сока определяют его общее количество, цвет, запах, наличие слизи, общую кислотность, количество свободной и связанной соляной кислоты, присутствие молочной кислоты, крови и желчных пигментов.

ПРИ ПОМОЩИ ИНДИКАТОРА «КОНГО КРАСНЫЙ»

Принцип.

В присутствии свободной соляной кислоты в желудочном соке индикатор «конго красный» меняет окраску на синюю, оставаясь в нейтральной и щелочной среде красным (зона перехода рН 3,0-5,2).

Реактивы. индикаторная бумага «конго красный»

Материал исследования.

Нормальный и патологический желудочный сок.

Проведение анализа.

На две разные полоски индикаторной бумаги наносят стеклянной палочкой по 1 капле нормального и патологического желудочного сока.

ПРИ ПОМОЩИ ИНДИКАТОРА ДИМЕТИЛАМИНОАЗОБЕНЗОЛА.

Принцип.

Индикатор, *п*-диметиламиноазобензол, в присутствии свободной соляной кислоты имеет красную окраску, в щелочной среде — желтую (зона перехода рН 2,3-4,2).

Реактивы. индикатор *п*-диметиламиноазобензол.

Материал исследования.

Нормальный и патологический желудочный сок.

Проведение анализа.

В две пробирки вносят по 10 капель исследуемого желудочного сока, добавляют по 2 капли *п*-диметиламиноазобензола.

Оформление работы.

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты в таблице.

Образец желудочного сока	Изменение окраски индикатора		Величина рН
	Конго красный	<i>п</i> -Диметиламино- азобензол	
Нормальный			
Патологический			

Практическое значение.

Свободная соляная кислота способствует превращению пепсиногена в пепсин, денатурации пищевых белков, оказывает бактерицидное действие, создает оптимальную рН среды для воздействия пепсина, стимулирует выработку секретина, ускоряет всасывание ионов железа. При воспалительных процессах в желудке имеет место нарушение секреции соляной кислоты и, соответственно, переваривания белков.

Лабораторная работа 2.**Определение общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты в одной порции желудочного сока.**

В работе последовательно исследуются образцы нормального и трех типов патологического желудочного сока. Сначала необходимо провести качественные реакции на свободную HCl (лабораторная работа 1) — если бумага «конго» приобретает синюю, а диметиламиноазобензол оранжево-красную окраску, то в одной порции желудочного сока определяют все виды кислотности, как описано ниже. Если бумага «конго» остается красной, а диметиламиноазобензол окрашивает содержимое колбы в желтый цвет, то в этом образце можно определить только общую кислотность в присутствии фенолфталеина.

Принцип.

Метод основан на определении кислотных веществ желудочного сока путем титрования их раствором NaOH в присутствии двух индикаторов — диметиламиноазобензола (интервал перехода рН 2,3-4,2) и фенолфталеина (зона перехода рН 8,2-10,0). По изменению окраски от красной к оранжевой индикатора диметиламиноазобензола определяется свободная кислота, а по переходу окраски

фенолфталеина (от бесцветной к розовой) — общая кислотность желудочного сока.

Реактивы.

1) 0,1н NaOH, 2) 1% спиртовой раствор фенолфталеина, 3) 0,5% спиртовой раствор *л*-диметиламиноазобензола.

Материал исследования.

Нормальный желудочный сок, образцы желудочного сока N 1, 2, 3.

Проведение анализа.

В коническую колбу помещают 5 мл исследуемого желудочного сока, добавляют по 2 капли диметиламиноазобензола и фенолфталеина. В присутствии свободной HCl наблюдается красное окрашивание, в отсутствие кислоты — желтое.

Титруют 0,1н раствором NaOH до появления оранжево-красной окраски и отмечают объем щелочи (мл), пошедшей на титрование свободной HCl — 1 пункт титрования.

Продолжают титрование до появления лимонно-желтой окраски и снова отмечают объем щелочи, израсходованной с начала титрования — 2 пункт титрования.

Затем титрование продолжают до появления розовой окраски и отмечают количество щелочи, пошедшее на все титрование — 3 пункт титрования.

Расчет.

За единицу кислотности желудочного сока принимается: объем 0,1н NaOH (мл), необходимого для нейтрализации кислых эквивалентов в 100 мл желудочного сока (титрационные единицы, ТЕ) или количество миллимолей соляной кислоты в 1 л желудочного секрета. Численно эти величины совпадают (например, 40 ТЕ = 40 ммоль/л).

Пример расчета.

На титрование 5 мл желудочного сока до первой отметки израсходовано 2,0 мл NaOH, до второй — 2,22 мл, до третьей — 3,18 мл (все отсчеты делаются от нулевой отметки). Тогда

а) содержание свободной HCl будет равно:

$$(2 \times 100) : 5 = 40 \text{ ммоль/л};$$

б) содержание общей HCl рассчитывается как среднее арифметическое между вторым и третьим пунктом титрования:

$$(2,22 + 3,18) : 2 \times (100 : 5) = 40 \text{ ммоль/л};$$

в) содержание связанной HCl составит

$$54 - 40 = 14 \text{ ммоль/л}$$

г) общая кислотность будет равной

$$(3,18 \times 100) : 5 = 63,6 \text{ ммоль/л};$$

Нормальные величины.

Свободная HCl — 20-40 ммоль/л; связанная HCl — 10-20 ммоль/л; общая кислотность 40-60 ммоль/л.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о наличии кислоты в исследуемом материале.

Образец желудочного сока	Количество 0,1н NaOH, израсходованное на титрование, мл			Соляная кислота, моль/л			Общая кислот- ность
	1 пункт	2 пункт	3 пункт	своб.	общая	связ.	
Нормальный							
1							
2							
3							

Практическое значение

Определение кислотности желудочного сока имеет важное значение для диагностики некоторых заболеваний желудка. При патологии кислотность может быть нулевой, повышенной или пониженной.

Увеличение содержания свободной HCl и общей кислотности (гиперхлоргидрия) имеет место при гиперацидном гастрите и часто сопровождается язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. Пониженная кислотность (гипохлоргидрия) встречается при гипоацидном гастрите, иногда при язвенной болезни желудка. Ахлоргидрия (полное отсутствие соляной кислоты) и значительное снижение общей кислотности отмечается при хроническом гастрите и раке желудка. Отсутствие соляной кислоты и пепсина (ахилия) связаны со злокачественными новообразованиями желудка, злокачественным малокровием. Ахлоргидрия сопровождается появлением в желудке продуктов брожения — молочной, масляной, уксусной кислот, так как под влиянием микроорганизмов в желудке развиваются процессы брожения.

Лабораторная работа 3.**Обнаружение молочной кислоты в желудочном соке (реакция Уффельмана).**Принцип.

Молочная кислота превращает фенолят железа (III) фиолетового цвета в малодиссоциирующую соль лактата железа желто-зеленого цвета.

Реактивы.

1) 1% раствор фенола, 2) 1% раствор FeCl₃, 3) 40% молочная кислота.

Материал исследования.

Нормальный и патологический желудочный сок.

Проведение анализа.

Готовят раствор фенолята железа (III), смешивая 2,0 мл раствора фенола с 3 каплями раствора FeCl₃.

Разливают смесь в 3 пробирки:

- в первую по каплям вносят раствор молочной кислоты,
- во вторую — нормальный желудочный сок,
- в третью — патологический желудочный сок.

При наличии молочной кислоты фиолетовая окраска заменяется желто-зеленой, при ее отсутствии жидкость обесцвечивается.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод

ОБРАЗЕЦ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА	НАЛИЧИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ
Нормальный	
Патологический	

Практическое значение.

Появление в желудке продуктов брожения — молочной, масляной, уксусной кислот — свидетельствует о появлении микроорганизмов в желудке и развитии процессов брожения.

**Лабораторная работа 4.
Обнаружение кровяных пигментов
в желудочном соке.**

*РЕАКЦИЯ НА КРОВЬ С БЕНЗИДИНОМ.*Принцип.

Реакция основана на окислении бензидина атомарным кислородом, образующимся при разложении пероксида водорода под действием гемоглобина крови.

Реактивы.

- 1) 1% перекись водорода, 2) 0,2% спиртовой раствор бензидина.

Материал исследования.

Нормальный и патологический желудочный сок.

Проведение анализа.

К 20 каплям нормального и патологического желудочного сока добавляют по 5 капель раствора бензидина и по 5 капель H₂O₂. При наличии крови в желудочном соке при стоянии наблюдается синее окрашивание.

**ОБНАРУЖЕНИЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПОЛОСОК "ГЕМОФАН"**

Принцип.

Зона индикации диагностических полосок «Гемофан» содержит стабилизированную органическую гидроперекись, кислотный буфер и хромоген. Гемоглобин обладает ферментативной пероксидазной активностью и, поэтому, катализирует окисление хромогена гидроперекисью с образованием продуктов синего цвета. В присутствии свободного гемоглобина зона индикации окрашивается в синий цвет равномерно, интактные эритроциты образуют на белом фоне яркие синие точки.

Материал исследования.

Нормальный и патологический желудочный сок.

Проведение анализа.

В каждый образец исследуемого желудочного сока погружают индикаторную зону диагностической полоски, быстро вынимают и через 30 с сравнивают с цветной шкалой на этикетке. По шкале сравнения определяют концентрации гемоглобина и эритроцитов.

ОБОЗНАЧЕНИЯ НА ШКАЛЕ СРАВНЕНИЯ	КОНЦЕНТРАЦИЯ ГЕМОГЛОБИНА, г/л	КОЛИЧЕСТВО ЭРИТРОЦИТОВ, $\times 10^6$ /л
1	15 – 45	5 – 15
2	45 – 150	15 – 50
3	150 – 240	50 – 80
4	≥ 300	≥ 100

Оформление работы.

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа и делают вывод о наличии крови.

Практическое значение.

Кровь (кровяные пигменты) может попадать в сок при изъязвлении стенок желудка. Желчные пигменты забрасываются в желудок из двенадцатиперстной кишки вследствие антиперистальтики.

Лабораторная работа 5.

**Беззондовый метод определения кислотности
желудочного сока (ацидотест).**

Принцип.

Введенный в желудок рег ос краситель (2,4-диамино-4-этоксизобензол) освобождается из драже под действием свободной соляной кислоты ($\text{pH} < 3,0$). Через 1,5 часа краситель появляется в моче. При подкислении мочи кислотой (25% раствор HCl) образуется соляно-

кислая соль красителя красного цвета. Сопоставление окраски с приложенной шкалой служит показателем кислотности желудочного сока.

Реактивы.

1) 25% соляная кислота, 2) драже красителя 2,4-диамино-4-этоксиязобензола, 3) таблетки кофеинбензоата натрия.

Материал исследования.

«Контрольная» порция мочи и собранная через 1,5 часа после приема красителя.

Проведение анализа.

Подготовка пациента: после голодания в течение 8 часов и опорожнения мочевого пузыря пациент принимает кофеинбензоат натрия (в 100 мл воды), стимулирующего желудочную секрецию и диурез.

Через 1 час собирают «контрольную» мочу. Пациент, не разжевывая, проглатывает драже красителя и через 1,5 часа собирает мочу.

Анализ проводят одновременно с обеими порциями мочи: доводят водой до 200 мл, отбирают по 5 мл разбавленной мочи, добавляют по 5 мл 25% HCl и сравнивают со шкалой.

Метод удобен, надежен, щадит больного, рекомендуется при противопоказаниях к фракционному зондированию (гипертоническая болезнь, невропатии).

Оформление работы.

Отмечают принцип метода.

ЗАНЯТИЕ 11.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН БЕЛКОВ. ОСНОВНЫЕ ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА АМИНОКИСЛОТ.

Актуальность:

Обмен белков выполняет ряд уникальных функций, свойственных живой материи, поддерживая в значительной мере динамичное состояние между организмом и внешней средой. Свыше 20 природных аминокислот, часть из которых являются незаменимыми, включаются в различные реакции, имеющие общие и специфические пути превращения, что объясняет разнообразие и разветвленность метаболизма аминокислот. В медицине описаны многочисленные случаи нарушения различных этапов обменных реакций.

Цель:

- 1) Ознакомиться с главными путями превращений аминокислот и транспортной системой их проникновения через клеточные мембраны.
- 2) Изучить механизмы основных реакций внутриклеточного обмена аминокислот (дезаминирование, декарбоксилирование, трансаминирование).
- 3) Научиться определять активность аминотрансфераз в сыворотке крови.

Студент должен знать:

- 1) Транспорт аминокислот через клеточные мембраны.
- 2) Судьбу всосавшихся аминокислот.
- 3) Основные реакции внутриклеточного обмена аминокислот.

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Основные пути восполнения аминокислот в тканях.
- 2) Система транспорта аминокислот через клеточные мембраны.
- 3) Механизм реакций дезаминирования аминокислот. Окислительное дезаминирование. Оксидазы аминокислот. Анаэробная дегидрогеназа глутаминовой кислоты. Строение коферментов.
- 4) Механизм реакций трансаминирования. Строение аминотрансфераз. Значение реакций переаминирования. Основные аминотрансферазы, имеющие клиничко-диагностическое значение.
- 5) Реакции декарбоксилирования. Строение ферментов. Роль продуктов реакций. Дальнейшие пути превращения аминов.
- 6) Анаболические процессы, в которых принимают участие аминокислоты.

Лабораторная работа 1. Определение активности аминотрансфераз сыворотки крови.

Трансаминирование — обратимый перенос α -аминогруппы аминокислоты на кетокислоту без промежуточного отщепления аммиака. Процесс катализируется ферментами аминотрансферазами, коферментом которых служит пиридоксальфосфат. Процесс активно протекает в печени, сердечной и скелетной мышцах, почках. В сыворотке крови активность аминотрансфераз очень низка и резко возрастает при нарушении целостности мембран тканей и органов.

Материалы исследования: сыворотка крови.

Принцип.

В результате переаминирования, происходящего под действием АсАТ и АлАТ образуются оксалоацетат и пируват. Оксалоацетат, подвергаясь декарбоксилированию, превращается в пируват. При добавлении кислого 2,4-динитрофенилгидразина энзиматический процесс останавливается и получается гидразон пировиноградной кислоты. Последний в щелочной среде дает окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Реактивы.

1) 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4, 2) 0,04% раствор бромтимолового синего, 3) Раствор субстрата АсАТ: смесь 2-оксоглутаровой кислоты и аспарагиновой кислоты, 4) Раствор субстрата АлАТ: смесь 2-оксоглутаровой кислоты и аланина, 5) Раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 1 М НСl, 6) 0,4 М раствор NaOH, 7) 0,1 мкМ эталонный раствор пировиноградной кислоты.

Проведение анализа.

	1 проба, стандартная, мл	2 проба, опытная для АлАТ, мл	3 проба, опытная для АсАТ, мл
Субстратный р-р АлАТ	0,25	0,25	—
Субстратный р-р АсАТ	—	—	0,25
Эталонный раствор	0,05	—	—
Сыворотка	—	0,05	0,05
Инкубируют 60 мин на водяной бане при 37°С.			
2,4-ДНФГ	0,25	0,25	0,25

	Инкубируют при комнатной температуре в течение 20 мин		
NaOH	2,5	2,5	2,5
	Инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин. Колориметрируют опытную пробу против контроля при зеленом светофильтре (500-560 нм)		

Расчет:

$$\text{Активность АлАТ, ммоль/л}\cdot\text{час} = \frac{E_{\text{оп2}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

$$\text{Активность АсАТ, ммоль/л}\cdot\text{час} = \frac{E_{\text{оп3}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

где $E_{\text{ст}}$, $E_{\text{оп2}}$, $E_{\text{оп3}}$ — соответственно оптическая плотность стандартной и опытных проб для АлАТ и АсАТ, $C_{\text{ст}}$ — концентрация стандартного раствора.

Нормальные величины.

Сыворотка	АлАТ	0,1-0,68 ммоль/л·час
	АсАТ	0,1-0,45 ммоль/л·час
Коэффициент де Ритиса (АсАТ / АлАТ)		1,33±0,40

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

Клинико-диагностическое значение.

Определение активности АсАТ и АлАТ и их отношения используются в клинической практике для выявления патологических процессов различных органов. В миокарде более высокая активность АсАТ, чем АлАТ, в печени обратное соотношение. При инфаркте миокарда значительно увеличивается активность АсАТ в сыворотке крови с одновременным повышением коэффициента АсАТ/АлАТ. При поражении печени (цирроз, сывороточный гепатит) более выражено повышается активность АлАТ, снижается АсАТ/АлАТ.

ЗАНЯТИЕ 12. ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА В ОРГАНИЗМЕ.

Актуальность:

Аммиак является высокотоксичным веществом. При катаболизме аминокислот (70 г в сутки), окислении биогенных аминов образуется большое количество аммиака, но уровень его в крови не превышает 60 мкмоль/л (3 ммоль/л для кроликов — летальная доза). Аммиак связывается в тканях с образованием нетоксичных соединений, выделяемых с мочой — мочевины, соли аммония, креатинина. Транспортной связанной формой NH_3 служит глутамин. В клинической практике часто выявляются нарушения процессов нейтрализации аммиака.

Цель:

- 1) Изучить основные пути обезвреживания аммиака с образованием конечных продуктов белкового обмена.
- 2) Научиться определять количество мочевины в сыворотке крови и моче, креатинина в моче.

Студент должен знать:

- 1) Пути образования и связывания аммиака.
- 2) Механизм синтеза глутамина, мочевины, креатина, креатинина, солей аммония.
- 3) Органную локализацию образования конечных продуктов азотистого обмена, возможные причины нарушения процессов при различных патологических состояниях.

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Основные пути образования аммиака. Источники аммиака в тканях.
- 2) Пути связывания аммиака.
- 3) Механизм синтеза глутамина — транспортной формы аммиака.
- 4) Орнитинный цикл мочевинообразования.
- 5) Образование креатина и креатинина.
- 6) Аммонийогенез в почках.
- 7) Возможные механизмы нарушения образования конечных продуктов белкового обмена.
- 8) Клинико-диагностическое значение определения мочевины, креатинина в сыворотке крови и моче.

Лабораторная работа 1.
Определение содержания мочевины
в сыворотке крови и моче.

ДИАЦЕТИЛМОНООКСИМНЫЙ МЕТОД.

Принцип.

Мочевина образует с диацетимonoоксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа в кислой среде при нагревании комплекс красного (розово-красного) цвета. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию мочевины.

Реактивы.

1) 10% раствор трихлоруксусной кислоты; 2) Рабочий раствор: смесь FeCl_3 , диацетилмонооксима, тиосемикарбазида, ортофосфорной кислоты и конц. H_2SO_4 ; 3) стандартный раствор мочевины (16,65 ммоль/л).

Материал исследования.

Сыворотка крови, моча (разведение 1:50)

Проведение анализа.

	ОПЫТ 1, мл	ОПЫТ 2, мл	СТАНДАРТ, мл
Сыворотка	0,01	—	—
Моча	—	0,01	—
Стандарт мочевины	—	—	0,01
Рабочий реактив	2,0	2,0	2,0
	Перемешивают. Закрывают крышкой из фольги. Выдерживают 20 мин в кипящей водяной бане и охлаждают под проточной водой. Измеряют оптическую плотность пробирок против воды при 530-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете 1 см не позже, чем через 15 мин после охлаждения.		

Расчет.

$$[\text{Мочевина сыворотки, ммоль/л}] = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

$$[\text{Мочевина мочи, ммоль/л}] = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times 50$$

где $E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ — концентрация стандартного раствора, 50 — разведение мочи.

Нормальные величины.

Сыворотка	дети	1,8-6,4 ммоль/л
	взрослые	2,5-8,3 ммоль/л
Моча		330-580 ммоль/сут

*ЭКСПРЕСС МЕТОД С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНДИКАТОРНОЙ БУМАГИ
«УРЕАТЕСТ» ИЛИ «УРАНАЛ».*

Принцип.

Мочевина под действием фермента уреазы (класс гидролаз, оптимум рН 7,0-7,2) разлагается с образованием аммиака, который окрашивает желтую полоску реактивной хроматографической бумаги в голубовато-зеленоватый цвет. Высота окрашенной зоны пропорциональна концентрации мочевины.

Реактивы. Индикаторная бумага «Уреатест» или «Уранал».

Материал исследования. Сыворотка крови

Проведение анализа.

Конец хроматографической полоски, пропитанной ферментом, погружают в исследуемую сыворотку крови (не смачивая красной полоски — зона раздела). Бумажку быстро помещают в чистую сухую пробирку, закрывают пробкой, оставляют на 30 минут при температуре 37°C в водяной бане. Затем измеряют высоту индикаторной зоны, окрашенной в голубовато-зеленоватый цвет в мм, сравнивают ее со шкалой.

Высота окрашенной зоны	Содержание мочевины
до 1 мм	нормальное
2-3 мм	слегка повышенное
3-5 мм	повышенное
выше 5 мм	сильно повышенное

Практическое значение.

Уровень мочевины в сыворотке крови зависит от скорости ее синтеза в печени и выделения через почки, а также от величины белкового катаболизма. Повышение уровня мочевины может наблюдаться при заболеваниях почек (нарушении выделительной функции), нарушении почечной перфузии (застойная сердечная недостаточность), истощении запасов воды в организме (рвота, понос), повышенном катаболизме белка, при диете с высоким содержанием белка. Снижение отмечается при диете с низким содержанием белка, при повышенной утилизации белка в тканях (поздние сроки беременности), тяжелых заболеваниях печени, сопровождающихся нарушением синтеза мочевины (паренхиматозная желтуха, гепатиты, цирроз печени).

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод по возможным заболеваниям.

Лабораторная работа 2.**Определение содержания креатинина в моче.**Принцип.

Креатинин в щелочной среде образует с пикриновой кислотой пират креатинина оранжевого цвета; интенсивность окраски пропорциональна концентрации.

Реактивы.

1) 10% раствор NaOH; 2) Насыщенный раствор пикриновой кислоты; 3) Стандартный раствор креатинина (0,177 ммоль/л).

Материал для исследования. Моча (разведение 1:50)

Проведение анализа.

	ОПЫТ, мл	СТАНДАРТ, мл
Моча	0,5	—
Стандартный раствор креатинина	—	0,5
Дистилл. вода	0,5	0,5
NaOH	0,5	0,5
Раствор пикриновой кислоты	0,5	0,5
	Перемешивают, через 20 мин измеряют оптическую плотность пробы против воды, при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр).	

Расчет.

$$[\text{Креатинин, ммоль/л}] = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times 50$$

где $E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ — концентрация стандартного раствора, 50 — разведение мочи.

Нормальные величины.

Сыворотка	дети	27-62 мкмоль/л
	женщины	44-88 мкмоль/л
	мужчины	44-100 мкмоль/л
Суточная моча		4,4-17,7 ммоль/сут

Клинико-диагностическое значение.

Увеличение концентрации креатинина в моче наблюдают у лиц с повышенной физической активностью, с лихорадочными состоя-

ниями. Оно отмечается при выраженной недостаточности функции печени, при сахарном и несахарном диабете, при синдроме длительного раздавливания, острых инфекциях. Снижение обнаруживается при хроническом нефрите, мышечной атрофии, с дегенерацией и амилоидозом почек, лейкемией, при голодании. Уровень креатинина не является чувствительным показателем заболевания почек в ранней стадии.

Оформление работы

В отчете описывается принцип метода, фиксируются результаты и делается вывод по возможным заболеваниям.

ЗАНЯТИЕ 13. НУКЛЕОПРОТЕИНЫ И ИХ ОБМЕН.

Актуальность:

Существуют два типа нуклеопротеинов: дезоксирибонуклеопротеины (ДНП) и рибонуклеопротеины (РНП). Они играют важную роль в хранении и реализации наследственной информации. Белковые компоненты нуклеопротеинов подвергаются превращениям, свойственным всем белкам. Структурные компоненты нуклеиновых кислот — мононуклеотиды, помимо этой роли, выполняют также другие важные функции: 1) Цикл АДФ-АТФ участвует в трансформации энергии окисления веществ в энергию, используемую в эндогенных процессах организма. 2) Адениловая кислота входит в состав коферментов дегидрогеназ (НАД, НАДФ, ФАД) и кофермента ацилирования (КоА); УТФ, ГТФ и ЦТФ выполняют роль коферментов в реакциях переноса моносахаридных остатков; ЦТФ служит коферментом холинтрансферазы. 3) Циклические нуклеотиды 3'5'-цАМФ и 3'5'-цГМФ являются посредниками при передаче гормональных и других сигналов на внутриклеточные эффекторные системы.

Нуклеиновые кислоты не являются незаменимыми пищевыми факторами, и практически все клетки организма способны к синтезу нуклеотидов. Скоростью синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов определяется синтез нуклеиновых кислот. К заболеваниям, связанным с патологией обмена нуклеопротеинов, относятся подагра, мочекаменная болезнь, синдром Леша-Нихана, оротацидурия, мегалобластическая анемия и другие. Нуклеотиды — лекарственные препараты успешно применяются в клинике с лечебной целью.

Цель:

- 1) Знакомство с биосинтезом и катаболизмом пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, с процессами синтеза ДНК и РНК.
- 2) Освоение методов качественного и количественного определения мочевой кислоты.

Студент должен знать:

- 1) Превращение нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте.
- 2) Биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов и регуляцию этих процессов.
- 3) Распад пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

- 4) Биосинтез нуклеиновых кислот. Синтез ДНК — репликация и обратная транскрипция.

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Переваривание нуклеопротеинов и всасывание продуктов их распада в желудочно-кишечном тракте.
- 2) Реакция образования 5-фосфорибозиламина, источники атомов азота и углерода пуринового кольца при синтезе ИМФ.
- 3) Основные этапы синтеза АМФ и ГМФ из ИМФ, превращение нуклеозидмонофосфатов в трифосфаты.
- 4) Реакции синтеза УМФ и ЦМФ, превращение их в трифосфаты, нарушение метаболизма пиримидинов при оротацидурии.
- 5) Образование дезоксирибонуклеотидов, роль тиоредоксина и НАДФ в этом процессе.
- 6) Синтез дТМФ, ферменты, катализирующие процесс, роль метилен-ТГФК.
- 7) Регуляция синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов по типу обратной связи, ее особенности.
- 8) Нуклеотидные коферменты, представление об их образовании.
- 9) Реакции образования мочевой кислоты из АМФ и ГМФ, содержание мочевой кислоты в крови и моче.
- 10) Молекулярные механизмы развития мочекаменной болезни, синдрома Леша-Нихана, подагры. Диета при гиперурикемии, причины эффективности аллопуринола при лечении подагры.
- 11) Распад пиримидиновых нуклеотидов, конечные продукты процесса, их утилизация и судьба. Отличительные особенности распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.
- 12) Ингибиторы синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Нуклеотиды — лекарственные препараты.
- 13) Биосинтез ДНК: суммарное уравнение репликации, ДНК-синтезирующая система, основные этапы и особенности репликации ДНК, связь с фазами клеточного цикла, локализация в клетке.
- 14) Биосинтез РНК: реакция синтеза РНК, РНК-синтезирующая система, этапы и особенности транскрипции, различие биогенеза мРНК у прокариот и эукариот.

Лабораторная работа 1. Обнаружение мочевой кислоты при помощи мурексидной пробы.

Принцип.

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

Реактивы.

1) конц. HNO_3 , 2) конц. раствор NH_4OH , 3) 10% раствор KOH .

Материалы исследования.

Кристаллы мочевой кислоты.

Проведение анализа.

Кристаллы мочевой кислоты помещают на дно фарфоровой чашки, смачивают каплями азотной кислоты (осторожно!), выпаривают до суха (не выше 70°C). Появляется коричнево-красное пятно, которое после охлаждения и осторожном смачивании с одного края аммиаком окрашивается в пурпурно-красный цвет, при смачивании с другого края раствором KOH — в сине-фиолетовый.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

Практическое значение.

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

Лабораторная работа 2. Количественное определение мочевой кислоты в моче.

Принцип.

Мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамовый реактив, развивается синяя окраска, интенсивность которой пропорциональна количеству мочевой кислоты. Количество образовавшейся фосфорновольфрамовой сини определяют путем титрования калием гексацианоферратом (III) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, который окисляет фосфорновольфрамовую синь и окраска исчезает.

Реактивы.

1) 20% раствор Na_2CO_3 , 2) фосфорновольфрамовый реактив, 3) 3,992 моль/л раствор $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Материалы исследования. мочаПроведение анализа.

В колбу наливают 5 мл мочи, добавляют 2 мл фосфорновольфрамового реактива и 10 мл раствора Na_2CO_3 , перемешивают. Из бюретки (осторожно!) по каплям приливают раствор $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ до исчезновения синего окрашивания.

Расчет:

$$C_{\text{оп}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot V_A \cdot V_D}{V}$$

где $C_{\text{оп}}$ — концентрация мочевого кислоты в пробе, $C_{\text{ст}}$ — концентрация стандартного раствора мочевого кислоты, соответствующего 1 мл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ — 0,004 моль; V — объем мочи взятый для анализа, A — количество мл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, пошедшего на титрование, D — суточный диурез (1200-1500 мл).

Нормальные величины.

Сыворотка	дети	0,12-0,32 ммоль/л
	мужчины	0,24-0,50 ммоль/л
	женщины	0,16-0,44 ммоль/л
Моча		2,36-5,90 ммоль/сут

Практическое значение.

Уровень мочевого кислоты в крови (мононатриевая соль в комплексе с белком) определяется интенсивностью синтеза и выделением из организма. Повышение содержания мочевого кислоты наблюдается при уменьшении выделения ее почками, избыточном образовании (лейкозы). Повышение содержания мочевого кислоты в крови (гиперурикемия) является главным симптомом подагры. При подагре мочевая кислота откладывается в тканях, суставных сумках, хрящах, сухожилиях, суточное количество в моче снижается. Белки сыворотки стабилизируют ураты, но при снижении pH мочевая кислота кристаллизуется в тканях. Гиперурикемия наблюдается при всех заболеваниях, связанных с распадом нуклеопротеинов: лейкозы, лечение цитостатиками, облучение. У таких больных наблюдается образование мочевых камней.

Гипоурикемия отмечается при анемии, при приеме салицилатов, кортикотропина.

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

Оформление работы.

При оформлении работы записывают принцип метода, используемый реактив и результаты проведения анализа. Отмечают практическую значимость работы и делают вывод о наличии патологии.

ЗАНЯТИЕ 14. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ.

Актуальность.

Белки, как и другие компоненты клетки, находятся в состоянии динамического равновесия, то есть непрерывно обновляются. Знание механизмов матричных биосинтезов и принципов регуляции этих процессов необходимо для понимания молекулярных основ возникновения наследственных заболеваний, а также рационального использования химиотерапевтических средств.

Цель:

- 1) Изучить основные этапы биосинтеза белка и механизмы его регуляции.
- 2) Познакомиться с основными методами количественного определения белка в растворе.

Студент должен знать:

- 1) Этапы биосинтеза белка (транскрипция, рекогниция, трансляция).
- 2) Принципы регуляции биосинтеза белка.
- 3) Генно-инженерные пути синтеза белковых препаратов.

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Строение транскриптона ДНК, экзоны и интроны.
- 2) Этапы и ферменты транскрипции.
- 3) Процессинг матричной РНК.
- 4) Генетический код, его свойства.
- 5) Основные компоненты белоксинтезирующей системы.
- 6) Адапторная роль транспортной РНК. Синтез аминоксил-тРНК, специфичность аминоксил-тРНК-синтетазы.
- 7) Строение и функционирование рибосом. Последовательность реакций при синтезе полипептидной цепи.
- 8) Регуляция биосинтеза белка путем индукции и репрессии (схема Жакоба-Моно).
- 9) Посттрансляционная модификация белковых молекул.
- 10) Лекарственные препараты — активаторы и ингибиторы матричных биосинтезов.

**Лабораторная работа 1.
Количественное определение белка
микробиуретовым методом Ицаки-Гилла.**

Принцип.

Белки и пептиды в щелочной среде образуют с медью комплексное соединение (биуретовая реакция). Интенсивность развивающегося фиолетового окрашивания пропорциональна содержанию белка.

Реактивы.

1) Биуретовый реактив: смесь сульфата меди (II) и натрия гидроксида; 2) 0,9% раствор NaCl, 3) Эталонный раствор альбумина, 70 г/л.

Проведение анализа.

	ОПЫТ, мл	СТАНДАРТ, мл
Сыворотка	0,04	—
Раствор альбумина	—	0,04
Биуретовый реактив	3,0	3,0
	Выдерживают 10 мин. Измеряют оптическую плотность проб против воды на ФЭКе при длине волны 540-560 нм.	

Расчет.

Проводят по формуле:

$$[\text{общий белок, г / л}] = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot C_{\text{ст}}$$

где $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность опытной и стандартной пробы, $C_{\text{ст}}$ — концентрация белка в стандартной пробе.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод по возможным заболеваниям.

**Лабораторная работа 2.
Количественное определение белка
рефрактометрическим методом.**

Принцип.

При переходе из одной прозрачной среды (стекло) в другую (сыворотка крови) под наклоном к поверхности раздела двух фаз луч света преломляется. При этом отношение синуса угла падения к синусу угла преломления называется коэффициентом преломления (рефракции). В сыворотке крови величина рефракции зависит от количества и состава белков.

Материал исследования: сыворотка крови

Оборудование: Рефрактометр

Реактивы.

1. Проверяют нулевую точку прибора путем определения показателя преломления дистиллированной воды. Для этого на чистую поверхность измерительной призмы капают 2-3 капли воды и опускают осветительную призму. Наводят окуляр на резкость. Поворотом рефрактометра к свету добиваются наилучшей освещенности шкалы и штриха. Вращением маховичка "И" границу светотени вводят в поле зрения окуляра. Вращают маховичок компенсатора "К" до исчезновения окраски границы светотеней. Наблюдая в окуляр, маховичком "И" наводят границу светотени точно на линию штриха. Снимите отсчет по шкале. Показатель преломления дистиллированной воды равен 1,333.
2. Измерение показателя преломления сыворотки крови проводят аналогичным образом.
3. После проведения измерений поверхности призм очистить мягкой салфеткой.

Расчет.

Зная показатель преломления, расчет проводят по таблице:

Показатель преломления	Концентрация белка в сыворотке крови, г/л
1,34500	52,5
1,34557	54,7
1,34575	56,8
1,34612	59,0
1,34650	61,2
1,34687	63,4
1,34724	65,5
1,34761	67,7
1,34798	69,8
1,34836	72,0
1,34870	74,2
1,34910	76,3
1,34947	78,5
1,34984	80,6
1,35021	82,8

Нормальные величины.

Сыворотка крови

дети	новорожденные	52-91 г/л
	до 3 лет	54-85 г/л
взрослые		65-85 г/л

Моча

10-140 мг/л

Клинико-диагностическое значение.

Изменения концентрации общего белка могут иметь как абсолютный, так и относительный характер. Изменения абсолютного характера являются следствием колебаний содержания белка в крови, в свою очередь относительные изменения зависят от объема крови, то есть наблюдаются при обезвоживании или гипергидратации.

Сыворотка:

Истинная (абсолютная) гипопроотеинемия связана: а) с недостаточным потреблением белка с пищей — заболевания желудочно-кишечного тракта, сужение пищевода при опухолях, недоедание, голодание; б) со снижением синтеза белка — несбалансированный аминокислотный состав пищи, хронические паренхиматозные гепатиты, интоксикации, злокачественные новообразования, лечение кортикостероидами; в) с усиленным распадом — кахексия, тяжелые инфекции, длительные воспалительные процессы, лихорадочные состояния, тиреотоксикозы; г) с потерей белка — нарушения проницаемости капиллярных стенок, кровоизлияния, ожоги, острые и хронические кровотечения.

Относительная гипопроотеинемия связана с нарушением водного баланса — гипергидратация. Гипопроотеинемия чаще всего связана с уменьшением фракции альбуминов крови.

Истинная гиперпротеинемия встречается при острых инфекциях (увеличение синтеза белков острой фазы), при хронических (за счет γ -глобулинемии), при миеломной болезни, лимфогрануломатозе, саркоидозе.

Относительная гиперпротеинемия вызывается потерями внутрисосудистой жидкости в результате профузных поносов (например, холере), усиленном потоотделении, неукротимой рвоте, несахарном диабете, тяжелых и обширных ожогах, генерализованных перитонитах.

Моча:

Белок появляется при заболеваниях почек с нарушением почечного фильтра.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод по возможным заболеваниям.

ЗАНЯТИЕ 15.
ГРУППОВАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА НЕКОТОРЫХ
АМИНОКИСЛОТ. АМИНОАЦИДУРИИ.
НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА БЕЛКОВ»

Актуальность: Помимо превращений, свойственных всем аминокислотам, имеются еще последовательности реакций, характерные для каждой аминокислоты. Образовавшиеся продукты реакций могут играть важную, а иногда и решающую роль в процессах обмена веществ и определять физиологическое состояние организма. Известны более ста болезней, обусловленные наследственными дефектами обмена аминокислот. Аминокислоты и их производные широко применяются в клинической практике в качестве лекарственных препаратов.

Цель:

- 1) Изучить основные пути превращений отдельных аминокислот: глицина, серина, цистеина, метионина, фенилаланина, тирозина, триптофана и дикарбоновых аминокислот.
- 2) Изучить проявления патологий азотистого обмена.
- 3) Практическое знакомство с разделением аминокислот методом хроматографии
- 4) Знакомство с экспресс методом диагностики фенилкетонурии.

Студент должен знать:

- 1) Особенности обмена отдельных аминокислот: глицина, серина, цистеина, метионина, фенилаланина, тирозина, триптофана и дикарбоновых аминокислот.
- 2) Основные пути возникновения патологий азотистого обмена.

Вопросы для самоподготовки:

- 1) Пути использования глицина в организме.
- 2) Реакции синтеза глицина из серина и треонина. Ферменты, катализирующие реакции.
- 3) Реакции катаболизма глицина, образование производных тетрагидрофолиевой кислоты.
- 4) Вещества, синтезирующиеся при участии производных ТГФК, причина нарушения их синтеза при гиповитаминозе фолиевой кислоты. Взаимосвязь фолиевой кислоты с антибактериальной активностью сульфаниламидных препаратов.

- 5) Реакции синтеза серина. Роль серина в биосинтетических процессах.
- 6) Серосодержащие аминокислоты. Метаболические превращения цистеина и его серы.
- 7) Реакция образования аденозилметионина, его роль в процессах трансметилирования. Реакции синтеза креатина и креатинина, значение.
- 8) Основные метаболические превращения фенилаланина и тирозина. Ферменты, катализирующие реакции. Роль витамина С. Биохимические дефекты при фенилкетонурии, алкаптонурии и альбинизма, характерные особенности заболеваний.
- 9) Катаболизм триптофана, метаболиты процесса и их значение. Причины развития пеллагры при недостатке триптофана в пище. Нарушения обмена триптофана при болезни Хартнупа и болезни "моча с запахом кленового сиропа".
- 10) Особенности обмена дикарбоновых аминокислот и их амидов, связь обмена аминокислот с цитратным циклом и их участие в биосинтетических процессах.
- 11) Характерные нарушения при белковом голодании, болезни "квашкор".
- 12) Причины гипераминоацидурии, метаболические дефекты при цистинозе, цистинурии, гепатоцеребральной дистрофии.

Лабораторная работа 1.

Определение аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге

Хроматографические методы применяют для сорбционно-динамического разделения смеси аминокислот, белков, углеводов, липидов и их метаболитов.

Существуют несколько видов хроматографии. Довольно точным и доступным является метод распределительной хроматографии на бумаге (модификация адсорбционной хроматографии). В методе в качестве адсорбента используется специальная фильтровальная бумага. Хроматографию проводят в закрытой камере, чтобы избежать испарения растворителя.

Разделение смеси аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге используют для определения аминокислотного состава белков, для качественного и количественного определения аминокислот в биологических жидкостях и тканях. В научных лабораториях применяются автоматические анализаторы

аминокислот с высокой чувствительностью и скоростью проведения анализа.

Принцип.

Отдельные аминокислоты обладают различной растворимостью в двух частично смешивающихся жидкостях, одной из которых является вода, другой — водонасыщенный органический растворитель, например, бутанол. Из двух частично смешивающихся жидкостей один растворитель должен быть полярным (неподвижная фаза), а другой неполярным — подвижная фаза. Более гидрофобная аминокислота, лучше растворяющаяся в неполярном растворителе, движется с большей скоростью от линии старта, чем гидрофильная аминокислота. В результате этого отдельные аминокислоты по окончании хроматографического разделения оказываются на разном расстоянии от линии старта.

Радиальную хроматографию проводят на бумаге в чашке Петри. Растворитель перемещается от центра к периферии захватывает аминокислоты, которые распределяются концентрическими кругами и обнаруживаются после высушивания бумаги и проведения нингидриновой реакции.

Реактивы.

- 1) растворы аминокислот-свидетелей — глицин, аланин, лейцин (0,04 моль/л, 2) хроматографическая смесь (бутанол-уксусная кислота-вода, 1,5:1,5:1,0), 3) 0,2% спиртовой раствор нингидрина.
- 4) задача — смесь растворов аминокислот.

Оборудование.

Термостат 37°C, сушильный шкаф 100°C, пульверизатор, чашки Петри, хроматографическая бумага (d=12 см), стеклянные капилляры или микропипетка.

Проведение анализа

Диск бумаги следует держать за края, чтобы избежать появления отпечатков пальцев на хроматограмме.

1. Диск специальной хроматографической бумаги делят на 4 сектора и обозначают их согласно исходным растворам. В центре хроматограммы делают отверстие диаметром около 0,3 см и вставляют фитиль из скрученной полоски бумаги, высота фитиля равна высоте чашки Петри.
2. На расстоянии 1,0 см от центра карандашом отмечают линию старта, на которую в соответствующих секторах стеклянными капиллярами наносят раствор аминокислот-свидетелей и исследуемую смесь аминокислот.

3. Просушивают хроматограммы на воздухе до исчезновения влажных пятен.
4. Хроматограмму помещают в заранее подготовленную хроматографическую камеру (чашку Петри) на 1/3 заполненную хроматографической смесью. Разделение проводят при комнатной температуре под визуальным контролем (примерно в течение 30 мин).
5. Когда фронт растворителя достигнет границ бумажного диска разделение прекращают.
6. Хроматограмму высушивают в сушильном шкафу при температуре 90-100°C с целью устранения растворителей и фиксации аминокислот, предварительно пометив по всей окружности линию фронта растворителя.
7. Хроматограмму опрыскивают раствором нингидрина (либо смачивают раствором нингидрина, налитым в чашку Петри) и вновь помещают в сушильный шкаф при 100°C. На бумаге проявляются красноватые, пурпурно-красные, в большинстве случаев синеволетовые пятна, соответствующие расположению различных аминокислот.
8. Рассчитывают коэффициент распределения R_f для каждой аминокислоты:

$$R_f = a/b,$$

где a — расстояние, пройденное от линии старта аминокислотой (мм)

b — расстояние, пройденное фронтом растворителя (мм).



9. Идентифицируют аминокислоты, находящиеся в исследуемом растворе (сектор 4), путем сравнения их положения с положением соответствующих аминокислот, используемых в качестве "свидетелей" (сектора 1, 2, 3).

Нормальные значения.

Плазма крови

около 21,42 ммоль/л

Моча до 0,5 г /сут

Практическое значение

Определение свободных аминокислот важно для изучения обмена белков в организме. Изменения в содержании аминокислот в сыворотке крови и моче наблюдаются при недостаточной функции печени: усиленном распаде белков, нарушении распада аминокислот, а также при нарушении выделительной функции почек. Недостаток аминокислот сказывается в первую очередь на сердечной мышце, например, при нарушении переваривания белков в желудочно-кишечном тракте. При врожденных дефектах метаболизма аминокислот увеличивается концентрация в крови и усиливается экскреция с мочой одной или нескольких аминокислот.

Оформление работы

Записывают принцип хроматографического метода, цель его применения, подклеивают в тетрадь или зарисовывают полученную хроматограмму с указанными аминокислотами. Отмечают клинико-диагностическое значение определения аминокислот в сыворотке крови и моче.

Лабораторная работа 2. Реакция Феллинга на обнаружение фенилпирувата в моче

Принцип.

Фенилпируват при взаимодействии с $FeCl_3$ образует комплексное соединение оливково-зеленого цвета.

Реактивы.

1) 10,0% раствор $FeCl_3$.

Проведение анализа

В пробирку вносят 10 капель мочи, добавляют 5 капель $FeCl_3$. В случае присутствия в моче фенилпирувата, в пробирке через 2-3 мин появляется оливково-зеленое окрашивание.

Нормальные величины.

Плазма крови	до 1 месяца	75-100 мкмоль/л
	от 2 мес до 14 лет	25-75 мкмоль/л
Моча	до 1 месяца	6-24 мкмоль/сут
	до 1 года	6-24 мкмоль/сут
	до 14 лет	6-72 мкмоль/сут

Практическое значение:

Фенилкетонурия или фенилпировиноградная олигофрения (слабумие) связана с врожденным отсутствием у детей в печени фермен-

та фенилаланингидроксилазы, вследствие чего нарушается превращение фенилаланина в тирозин, в крови и моче появляется фенилпируват и фенилаланин. Положительную реакцию Феллинга моча дает обычно после года жизни. До года положительной тест выявляется эпизодически (на максимуме выведения фенилкетонов), поэтому его следует повторять неоднократно при подозрении на фенилкетонурию. В крови повышается концентрация фенилаланина в десятки раз (до 600-2400 мкмоль/л), в моче до 3-12 мкмоль/сут. Фенилпируват появляется в моче также при поражениях печени (вирусный гепатит, отравление ядами).

Оформление работы.

При оформлении работы записывают принцип метода, используемый реактив и результаты проведения анализа. Отмечают практическую значимость работы и делают вывод о наличии патологии.

Лабораторная работа 3. Флюоресценция аминокислот

Принцип.

Аминокислоты способны флюоресцировать при освещении их ультрафиолетовым цветом.

Оборудование.

Люминесцентный осветитель.

Реактивы.

1) 5,0% раствор глицина.

Проведение анализа

На лист фильтровальной бумаги наносят каплю раствора аминокислоты. После высушивания рассматривают бумагу, поместив ее перед люминесцентным осветителем в затемненном помещении. В месте нанесения аминокислоты видна коричневая флуоресценция.

Оформление работы.

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

ЗАНЯТИЕ 16.
КОНТРОЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ
ПО РАЗДЕЛУ «ОБМЕН БЕЛКОВ»

1. Баланс азота в организме. Понятие азотистого равновесия. Биологическая ценность белка. Заменяемые и незаменимые аминокислоты. Принципы составления рационов питания.
2. переваривание белков в желудочно-кишечном тракте. Основные ферменты. Активация проферментов, специфичность и механизм действия, локализация в желудочно-кишечном тракте. нарушения внешнего обмена белков.
3. Желудочный сок, его основные компоненты. Механизм синтеза соляной кислоты, ее биологическая роль. Понятие кислотности желудочного сока.
4. Гниение белков в кишечнике, биологическая роль процесса. Механизм обезвреживания продуктов гниения. строение и функции УДФГК и ФАФС.
5. Деаминарование, его виды. Строение ферментов. Глутаматдегидрогеназа, механизм функционирования, регуляция активности, биологическая роль.
6. Механизмы трансаминирования. Строение ферментов. Роль витамина В₆. Клинико-диагностическое значение теста определения активности аминотрансфераз в сыворотке крови.
7. Трансдеаминарование (непрямое деаминарование), этапы процесса, роль в метаболизме клетки. Глюко- и кетогенные аминокислоты. Ацетил-КоА и другие ключевые молекулы метаболических путей использования продуктов деаминарования аминокислот.
8. Пути превращения аминокислот в тканях до конечных продуктов — CO₂ и H₂O. Энергетический эффект окисления аланина, глутаминовой и аспарагиновой кислот.
9. Декарбоксилирование аминокислот. Строение ферментов. Роль витамина В₆. Биологическая роль аминов — гистамина, серотонина, γ-аминомасляная кислота. Ферментные системы инактивации биогенных аминов.
10. Пути образования и утилизации аммиака в тканях.
11. Синтез амидов. Транспортная роль глутамина.
12. Современные представления о механизме синтеза мочевины. Реакции орнитинового цикла, ферменты, внутриклеточная ком-

партментализация, энергетический эффект процесса. гипераммониемии.

13. Аммиогенез. Локализация и роль процесса.
14. Синтез креатина, креатинфосфата и креатинина. Биологическая роль креатинфосфата.
15. Метаболизм глицина и серина.
16. Метаболизм серосодержащих аминокислот.
17. Метаболизм аминокислот с отрицательно заряженным радикалом (глутаминовая и аспарагиновая кислоты).
18. Метаболизм фенилаланина и тирозина.
19. Расщепление нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте. Превращения пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в тканях.
20. Представление и синтезе и распаде пуриновых нуклеотидов (АМФ, ГМФ), ключевая стадия и механизм регуляции скорости синтеза.
21. Синтез и распад УМФ, ЦМФ и ТМФ. Ключевые стадии и механизмы регуляции скорости синтеза пиримидиновых нуклеотидов.
22. Синтез нуклеозидтрифосфатов. Образование дезоксирибонуклеотидов, роль НАДФН и тиоредоксина.
23. Нарушения обмена пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Молекулярные механизмы развития мочекаменной болезни, подагры, синдрома Леша-Нихана, оротацидурии.
24. Механизм синтеза ДНК. Ферменты репликации ДНК. Роль процесса репликации в передаче генетической информации.
25. Механизм синтеза ДНК (обратная транскрипция, фермент ревертаза). Генная инженерия. Биотехнология.
26. Механизм синтеза РНК. Ферменты транскрипции и процессинга рибонуклеиновых кислот.
27. Биосинтез белка. Отдельные этапы: активация аминокислот, рекогниция, трансляция и ее звенья — инициация, элонгация, терминация (молекулярные механизмы).
28. Представления о механизмах регуляции биосинтеза белка. Транскриптон, оперон: строение и функции. репрессия и индукция синтеза белка.
29. Использование ингибиторов и активаторов синтеза белка и нуклеотидов в медицине.
30. Аминокислоты и белки — лекарственные препараты.

Практические работы по теме.

1. Качественное обнаружение HCl в желудочном соке.
2. Реакции обнаружения молочной кислоты в крови и желудочном соке.
3. Количественное определение свободной, общей, связанной соляной кислоты.
4. Ацидотест.
5. Количественное определение активности аминотрансфераз сыворотки крови.
6. Количественное определение мочевины в сыворотке крови и моче.
7. Количественное определение креатинина в моче.
8. Количественное определение мочевой кислоты в моче.
9. Качественная реакция на мочевую кислоту.
10. Определение гемоглобина крови в желудочном соке ("Криптогем").
11. Хроматографическое разделение аминокислот.
12. Качественные реакции на компоненты нуклеопротеинов.
13. Количественное определение белка сыворотки крови биуретовым и рефрактометрическим методом.

ЗАНЯТИЕ 17.
**ОБЩЕЕ ИТОГОВОЕ ЗАЧЕТНОЕ ЗАНЯТИЕ
ЗА ОСЕННИЙ 3 СЕМЕСТР**

При подготовке к итоговому занятию III семестра по биохимии используются вопросы, представленные на занятиях NN 8, 9, 16.