

**Міністерство освіти і науки України
Дніпропетровський національний університет
імені Олеся Гончара**

Г.О. Ушакова, О.О. Дьомшина

**ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ ДО НАВЧАЛЬНОЇ
ДИСЦИПЛІНИ «БІОХІМІЯ»**

**Дніпропетровськ
Видавництво Арбуз
2015**

ББК 616
У 93

Рецензент: д-р біол. наук, проф. О.В. Севериновська
д-р біол. наук, проф. А.І. Шевцова

У 93 Ушакова, Г.О. Лабораторний практикум до навчальної дисципліни «Біохімія» [Текст]: / Г.О. Ушакова, О.О. Дьомшина – Д.: Арбуз, 2015. – 56 с.

Наведено основні методичні положення щодо проведення лабораторних робіт за навчальної дисципліни «Біохімія», також у стислій формі надані теоретичні дані, контрольні запитання, тестові завдання для засвоєння головних тем з біологічної хімії.

Опанування даного матеріалу сприяє формуванню практичного уміння в студентів проводити біохімічні аналізи, а також закріпленню базових теоретичних знань за курсом «Біохімія».

Для студентів ДНУ імені Олеся Гончара факультету біології, екології та медицини. Може бути корисним для студентів природничих та медичних факультетів.

Навчальне видання

Галина Олександрівна Ушакова
Ольга Олександрівна Дьомшина

Лабораторний практикум до навчальної дисципліни «Біохімія»

Редактор Г.О. Ушакова
Техредактор О.О. Дьомшина

Надруковано за рішенням Вченої ради факультету біології, екології та медицини ДНУ імені Олеся Гончара від 26.06.15

Підписано до друку 30.09.15 Формат 60x84 1/16. Папір офсетний

Ум. друк.арк.3.5. Ум. фарбовідб. 3.5 Обл.-вид. арк.

Тираж 150 пр. Зам. №

Віддруковано на базі поліграфічно-видавничого центру «Арбуз»

49018, м. Дніпропетровськ – 18, а/я № 1212

тел.066-55-312-55, 798-04-00 Е-mail: 7984722@gmail.com

www.arbuz.in.ua ; www.vk.com/tipografija ; www.facebook.com/arbuz.print

I. Навчальна програма до навчальної дисципліни «Біохімія»

Актуальність: Біохімія – це наука, яка вивчає хімічний склад живих організмів, будову, властивості, локалізацію та роль наявних у них сполук, шляхи їх виникнення і перетворення, а також притаманні живій клітині хімічні процеси, які в сукупності забезпечують обмін речовин й перетворення енергії.

Через біохімію лежить шлях до розв'язання основних питань природознавства і медицини, зокрема, проблеми синтезу білків, біоенергетики та ін. У біохімічних дослідженнях використовуються сучасні фізико-хімічні, фізичні та математичні методи. Біохімічні показники використовуються для діагностики, лікування та профілактики захворювань.

Для покращення засвоєння навчального матеріалу студентам рекомендується використовувати сучасні підручники та посібники, що підготовлені провідними фахівцями України та світу.

Мета та задачі дисципліни

Метою та задачами навчальної дисципліни «Біохімія» є формування у майбутнього фахівця з біології фундаментальних знань з хімічних основ життя, молекулярних основ фізіологічних функцій органів і систем організму людини, зрозуміння біохімічних процесів у всіх живих організмах (людини, тварин, рослин, мікроорганізмів).

Досягти цієї мети можна шляхом оптимального поєднання теоретичного курсу з лабораторними заняттями, на яких теоретичні відомості про метаболічні основи функцій органів і тканин реалізуються в процесі лабораторних робіт, набувається здатність мислити категоріями біохімічної логіки.

Завдання вивчення дисципліни

Протягом курсу «Біохімія» студенти повинні засвоїти:

- основи біохімії, сучасні методи визначення хімічних параметрів біологічних матеріалів для оцінки функціонального стану тканин та систем організму; лабораторних показників для діагностики захворювань;

- механізми біохімічних перетворень, що відбуваються від моменту надходження харчових сполук до організму до утворення кінцевих продуктів і виведення їх із організму; принципи встановлення взаємозв'язку структури й функції клітин і тканини;

- практичні навички з лабораторної діагностики, лабораторні критерії патологічних, компенсаторних, адаптаційних реакцій і процесів, спрямованих на відновлення вихідного стану організму.

Кінцеві цілі при вивченні навчальної дисципліни „Біохімія” пов'язані з тим, що студент в своїй майбутній професійній діяльності повинен вміти:

- аналізувати відповідність структури біоорганічних сполук фізіологічним функціям, які вони виконують в організмі людини;

- давати обґрунтування особливості фізіологічного стану організму та розвитку патологічних процесів на основі лабораторних досліджень.

– аналізувати реакційну здатність вуглеводів, ліпідів, амінокислот, протеїнів, що забезпечує їх функціональні властивості та метаболічні перетворення в організмі.

Зміст лекцій

Тема 1. Вступ до біохімії

Предмет і завдання біохімії, її місце серед інших медико-біологічних дисциплін. Основні галузі та напрямки сучасної біохімії (біохімія статична та динамічна, функціональна біохімія, молекулярна біологія, клінічна біохімія). Основні досягнення й перспективи розвитку біохімії, біотехнології, генної і клітинної інженерії, з якими пов'язують вирішення проблем діагностики і лікування багатьох хвороб. Розвиток біохімічної діагностики в Україні. Загальні уявлення про взаємозв'язок біохімічних систем в організмі людини.

Тема 2. Загальні поняття про метаболізм. Основи біоенергетичних процесів

Поняття про катаболізм та анаболізм, співвідношення цих процесів. АТФ – енергетична валюта клітини. Високоенергетичні фосфорилізовані сполуки. АТФ-цикл. Хімічні властивості АТФ, гідроліз і величина вільної стандартної енергії гідролізу. НАД і НАДФ як носії енергії у вигляді відновних еквівалентів. Субклітинна організація метаболізму. Анаеробний та аеробний шляхи біологічного окиснення. Принципи двох основних біоенергетичних шляхів фосфорилування – субстратний та окислювальний. Сучасні уявлення про механізм тканинного дихання. Типи дихальних ланцюгів (повний, вкорочений, короткий). Інгібітори переносу електронів у дихальному ланцюгу. Роз'єднання окиснення й фосфорилування при патологічних станах.

Тема 3. Обмін вуглеводів

Перетворення вуглеводів у шлунково-кишковому тракті в нормі та при патології. Транспорт глюкози через мембрану клітин. Анаеробний розклад вуглеводів (гліколіз, молочно-кисле та спиртове бродіння, розклад глікогену). Пентозофосфатний цикл. Перетворення глюкози у глюкуронову та аскорбінову кислоти. Залучення інших вуглеводів у гліколітичний розклад. Аеробний розклад вуглеводів (перетворення пірувата до ацетил-КоА, цикл трикарбонових кислот). Енергетика окиснення вуглеводів. Біосинтез вуглеводів (глюконеогенез, синтез глікогену). Мобілізація глікогену у тканинах, роль аденілатциклазної системи. Регуляція метаболізму вуглеводів (рівні регуляції, реципрокність).

Тема 4. Фотосинтез

Значення процесу фотосинтезу як джерела біологічної енергії на планеті. Історія відкриття. Фотосинтезуючі організми, світлова й темнова фази, субклітинна організація фотосинтезу. Загальне рівняння фотосинтезу.

Світлова фаза фотосинтезу. Фотосинтетичні пігменти (хлорофіли, каротиноїди, фікобіліни), їх спектри поглинання. Склад фотосистем 1 і 2, механізм роботи.

Темнова фаза фотосинтезу. Цикл Кальвіна. Синтез рослинних полісахаридів. Метаболізм органічних кислот за типом толстянкових.

Регуляція темнових реакцій. С4-шлях фотосинтезу. Фотодихання. Використання фотосинтезуючих організмів. Штучний фотосинтез.

Тема 5. Обмін ліпідів

Окиснення жирних кислот в тканинах тварин. Триацилгліцероли – найважливіше джерело енергії організму. Розклад ліпідів у шлунково-кишковому тракті. Активація жирних кислот, три етапи активації, потрапляння жирних кислот у мітохондрію. Роль карнітину. Бета-окиснення жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю. Реакції та ферменти першої стадії окиснення. Реакції дегідрування, гідратації, другого дегідрування, тіолітичного розщеплення. Розрахунки кількості АТФ і ацетил-КоА, які утворюються на першій стадії. Друга стадія окиснення жирних кислот через цикл лимонної кислоти. Розрахунки кількості АТФ, яка утворюється з однієї молекули жирної кислоти. Окиснення жирних кислот з подвійними зв'язками. Необхідність додаткових ферментів. Окиснення жирних кислот з непарною кількістю атомів вуглецю. Синтез кетонових тіл в печінці. Регуляція процесу розкладу жирних кислот і утворення кетонових тіл.

Біосинтез ліпідів як активний процес, який відбувається в тканинах тварин і рослин: біосинтез запасних ліпідів і постійне поновлення мембранних ліпідів. Субклітинна локалізація процесу. Відмінність процесу синтезу жирних кислот від їх розкладу. Утворення малоніл-КоА, човноковий механізм переносу ацетильних груп з мітохондрії в цитозоль. Синтазна система для жирних кислот, її структура та механізм дії: конденсація, кетовідновлення, дегідратація, насичування. Процеси елонгації пальмітоїл-КоА, десатурація жирних кислот в тваринних та рослинних організмах. Незамінні жирні кислоти. Регуляція біосинтезу жирних кислот. Біосинтез триацилгліцеролів, фосфоліпідів. Загальні попередники та запасний шлях. Генетичні дефекти ліпідного обміну, лізосомні хвороби. Біосинтез холестеролу та стероїдів.

Тема 6. Обмін білків та амінокислот

Перетворення білків у шлунково-кишковому тракті. Транспортні системи для амінокислот. Розклад амінокислот. Реакції декарбоксілювання, утворення нейромедіаторів (біогенних амінів). Реакції окиснювального дезамінування. Особливості глутаматдегідрогенази. Транспорт аміаку. Реакції трансамінування, особливості ферментів. Обмін амінокислот між органами. Виведення амінного азоту із організму. Реакції циклу сечовини. Стикання процесу утворення сечовини з циклом трикарбонових кислот. Біоенергетика циклу сечовини. Регуляція процесу. Метаболічні порушення циклу сечовини. Механізми виведення аміаку з різних організмів. Катаболізм вуглецевого скелету амінокислот, поняття про глюкогенні та кетогенні амінокислоти (трансамінування, дезамінування, цикл сечовини, розклад вуглецевого скелету). Поняття про замінні та незамінні амінокислоти. Біосинтез замінних амінокислот. Особливості біосинтезу незамінних амінокислот. Регуляція біосинтезу амінокислот. Стикання регуляції катаболізму та анаболізму амінокислот. Біологічна роль амінокислот в

утворенні життєвоважливих сполук – нейромедіаторів, пігментів, нуклеїнових кислот, креатину.

Тема 7. Метаболізм азотистих основ та нуклеїнових кислот

Обмін нуклеїнових кислот. Перетворення нуклеїнових кислот у шлунково-кишковому тракту. Розклад пуринів та піримідинів. Утворення сечової кислоти, жовчних пігментів. Синтез пуринів, піримідинів, рибонуклеотидів і дезоксирибонуклеотидів. Реутилізація пуринових основ. Рівні регуляції синтезу та розкладу пуринів та піримідинів. Подагра. Регуляція обміну нуклеїнових кислот. Стикання регуляції розкладу та синтезу.

4. Перелік лабораторних робіт за курсом «Біохімія»

1. Кількісне визначення АТФ у тканинах.
2. Термолабільність та специфічність амілази слини.
3. Кількісне визначення глюкози у біологічних рідинах.
4. Вплив рН середовища на активність амілази слини.
5. Визначення активності амілази у біологічних рідинах. Уніфікований амілокластичний метод із стійким крохмальним субстратом (метод Каравея).
6. Специфічність дії сахарози дріжджів.
7. Визначення концентрації лактози у молоці.
8. Виявлення дії каталази та ксантинооксидази.
9. Виявлення дії уреазы й пероксидази.
10. Визначення ліпопротеїдів у плазмі крові. Електрофорез ліпопротеїдів у драглях агарози.
11. Визначення холестерину за методом Ілька.
12. Визначення амінного нітрогену.
13. Дослідження властивостей нуклеопроетидів та нуклеотидів.
14. Кількісне визначення сечової кислоти у біологічних рідинах за Бенедіктом.
15. Дослідження властивостей вітамінів (В₁, РР, С, А).

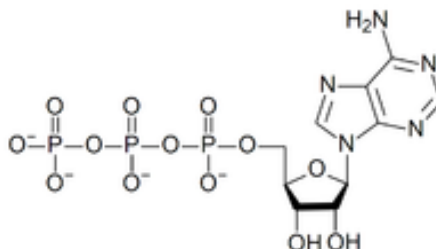
ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

1. Став до роботи у біохімічній лабораторії, студенти повинні ознайомитись з розміщенням засобів пожежогасіння і першої медичної допомоги. Приступати до роботи можна тільки за присутності викладача та лаборанта.
2. Уважно вивчити завдання по виконанню дослідів, звернувши увагу на правила, які створюють умови для безпечного виконання роботи, а також ознайомитись зі властивостями речовин, які використовуються в лабораторії (вогнева небезпечність, токсичність тощо).
3. При роботі в біохімічній лабораторії необхідно підтримувати чистоту, акуратність, бути уважним, виключити потрапляння речовин на шкіру та одяг, не торкатись руками обличчя і очей, мити руки із милом.

4. У біохімічній лабораторії не дозволяється вживати їжу, пити воду з лабораторного посуду, куштувати на смак речовини. Нюхати речовини можна обережно, рухами рук направляти до себе пари чи газ.
5. Категорично забороняється працювати у біохімічній лабораторії наодинці.
6. Не можна проводити досліди у брудному посуді.
7. Органічні сполуки у вигляді пару чи газу можуть вибухати у суміші з повітрям. Не допускайте утворення таких сумішей.
8. При проведенні робіт по застосуванню лугів, металічного натрію, концентрованих кислот завжди слід користуватись захисними окулярами, гумовими рукавичками.
9. Роботу з більшістю органічних речовин слід проводити тільки у витяжних шафах.
10. Залишки реактивів слід зливати до спеціальних ємностей для відходів.
11. При роботі з бромом слід пам'ятати, що це дуже отруйна речовина, яка небезпечна для слизової оболонки і утворює на шкірі опіки, які важко загоюються. Всі роботи слід проводити у витяжній шафі. У випадку опіку бромом, обпечене місце обробляють спиртом, потім направляють до медичного закладу.
12. При потраплянні кислот на шкіру необхідно швидко промити уражене місце водою, а потім 3% розчином соди. При опіках лугами потрібно промити уражене місце водою, а потім 3% розчином оцтової кислоти. При попаданні кислоти або лугу до очей необхідно промити великою кількістю води, а потім обробити тампоном, який змочений у розчині соди або борної кислоти і знову промити водою.
13. Концентровані кислоти, луги, отруйні та з сильним запахом речовини зберігають обов'язково в добре вентиляційній шафі.
14. Легкозаймісті та вибухонебезпечні речовини повинні зберігатись у металевих шафах у кількостях, які не перевищують щоденну потребу.
15. У випадку загорання одягу необхідно відразу накинути на постраждалого халат, простирadlo тощо. Ні в якому випадку не давати йому можливості бігти, оскільки це підсилить полум'я. При виникненні пожежі необхідно відразу вимкнути вентиляцію чи електроенергію і прийняти заходи до ліквідації пожежі. При необхідності викликати пожежну команду. При загоранні бензолу, ефіру не можна застосовувати для гасіння воду. У цих випадках полум'я гасять піском чи азбестовим простирadлом.
16. При роботі зі склом і хімічним посудом необхідно бути обережним.
17. Забороняється змішувати органічні речовини і проводити досліди, які не пов'язані з програмою.
18. Після виконання лабораторної роботи здати реактиви, посуд і обладнання лаборанту чи викладачеві.

Лабораторна робота №1 «Кількісне визначення АТФ у тканинах»

Усім клітинам для виконання їхньої роботи необхідна енергія і для всіх клітин будь-якого організму джерелом цієї енергії є АТФ. Тому АТФ називають «універсальним носієм енергії» або «енергетичною валютою» клітин.



АТФ постачає енергію для виконання таких видів роботи: механічної – м'язове скорочення, передача нервових імпульсів, осмотичної – активний транспорт речовин, хімічної – біосинтез, передачі генетичної інформації. АТФ легко доставляє енергію в будь-яку частину клітини, що потребує її для біохімічних процесів. АТФ швидко вивільнює енергію, для чого потрібно протікання лише однієї реакції – гідролізу. АТФ синтезується під час клітинного дихання за рахунок хімічної енергії, що вивільняється при окисненні таких органічних речовин, як глюкоза, і під час фотосинтезу – за рахунок сонячної енергії. Синтез АТФ з АДФ і неорганічного фосфату називають реакцією окисного фосфорилування (клітинне дихання), якщо ж для фосфорилування використовується світлова енергія, то процес називають фотофосфорилуванням (фотосинтез). Швидкість відтворення АТФ з АДФ і неорганічного фосфату (швидкість процесу дихання) легко регулюється відповідно до потреб клітини. Для синтезу АТФ з АДФ і неорганічного фосфату потрібно 306 кДж енергії на 1 моль АТФ.

Мета роботи: визначити кількість АТФ у м'язовій тканині щура (або жаби).

Принцип методу: базується на гідролізі АТФ, за результатом чого звільняється залишок фосфорної кислоти.

Реактиви:

- 2,5 % розчин молібденовокислого амонію у 5 н розчині сульфатної кислоти;
- стандартний розчин фосфору (1 мл розчину містить 0,025 мг фосфору);
- 5 % розчин трихлороцтової кислоти (ТХО);
- 2 н розчин гідроксиду натрію;
- 0,15 % спиртовий розчин фенолфталеїну;
- 0,2 % розчин аскорбінової кислоти (20 мг на 10 мл води);
- 2 н розчин хлоридної кислоти (НСІ).

Посуд та обладнання: фотоелектроколориметр (ФЕК), водяна лазня, терези настільні, воронки, колби, піпетки, пробірки, фільтрувальний папір, кристалізатор, ножиці, штатив, скляні палички.

ХІД РОБОТИ

1. 2 г охолодженої та подрібненої свіжої тканини вносять у колбу з 20 мл ТХО. Перемішують та залишають на 30 хв, після чого фільтрують у суху колбу.
2. У дві пробірки на 10 мл з міткою додають по 1 мл безбілкового фільтрату. Одну пробірку залишають у штативі, у другу додають 1 мл 2 н хлоридної кислоти і залишають у киплячій водяній лазні на 7 хв. для гідролізу. Потім пробірку виймають, охолоджують, додають 1–2 краплі 0,1 % розчину фенолфталеїну та нейтралізують 2 н розчином гідроксиду натрію до слабо-рожевого забарвлення. В обидві пробірки додають по 1–2 мл 2,5 % розчину молібденовокислого амонію та 1 мл 0,2 % розчину аскорбінової кислоти, та доводять до мітки 10 мл дистильованою водою.
3. Одночасно готують стандартний розчин. Для цього у чисту пробірку на 10 мл додають 1 мл стандартного розчину фосфату, який містить 0,025 мг фосфору, після чого додають ті ж реактиви, що й у дослідну пробірку (молібденовий амоній, аскорбінова кислота) і доводять до 10 мл.
4. У всіх пробірках з'являється синє забарвлення. Інтенсивність забарвлення залежить від кількості фосфору. За різницею між вмістом фосфору до і після гідролізу розраховують вміст фосфору, який входив до складу АТФ. Отримані дані виражають у мг на 1000 г м'язів.
5. Вказівки до складання звіту

Розрахунок:

$$C_x = \frac{D_x \times C_{cm} \times 20 \times 100}{D_{cm} \times 2 \times 1}$$

$$D_x = D_y - D;$$

де C_x – дослідна концентрація АТФ;

D_x – дослідна оптична густина;

D_y – оптична густина після гідролізу;

D – оптична густина до гідролізу;

$D_{ст}$ – оптична густина стандарту.

Зробити висновок.

Контрольні питання:

1. На яких властивостях базується принцип методу визначення АТФ?
2. Як приготувати 5 % розчин ТХО та 2 н розчин гідроксиду натрію?
3. Напишіть реакцію гідролізу АТФ.
4. Дайте визначення біологічної ролі АТФ.

Лабораторна робота №2 «Термолабільність та специфічність амілази слини»

Ферменти – високоспецифічні білкові каталізатори, які присутні у всіх живих клітинах і сприяють перетворенню одних речовин (субстратів) в інші (продукти). Вони виступають в ролі каталізаторів практично у всіх біохімічних реакціях, що протікають в живих організмах – ними каталізується близько 4000 біореакцій; вони грають найважливішу роль у всіх процесах життєдіяльності, направляють і регулюють обмін речовин організму. Подібно до всіх каталізаторів, ферменти прискорюють як пряму, так і зворотну реакцію, знижуючи енергію активації процесу. Хімічна рівновага при цьому не зміщується ні в прямий, ні у зворотній бік. Ферменти мають свої характерні властивості, такі як: термолабільність, специфічність, залежність їх активності та дії від значення рН середовища, вплив на них активаторів та інгібіторів та ін.

Термолабільність – висока чутливість до змін температури. Ферменти є протеїнами, тому для більшості з них температура понад 70 °С призводить до денатурації і втрати активності. При збільшенні температури на 10 °С реакція прискорюється в 2-3 рази, а при температурах близьких до 0 °С швидкість ферментативних реакцій сповільнюється до мінімуму. Термолабільність ферментів пояснюється тим, що температура, з одного боку, впливає на білкову частину ферменту та призводить, при дуже високих значеннях, до денатурації і зниження каталітичної функції, а з іншого боку, впливає на швидкість реакції утворення фермент-субстратного комплексу і на всі подальші етапи перетворення субстрату, що веде до посилення каталізу.

При температурі вище 50 °С денатурація ферменту різко посилюється і, хоча швидкість реакцій перетворення субстрату продовжує зростати, активність ферменту, що виражається кількістю перетвореного субстрату, падає.

Температура, при якій каталітична активність ферменту максимальна, називається його температурним оптимумом. Температурний оптимум для різних ферментів неоднаковий. Загалом для ферментів тваринного походження він лежить між 40-50 °С, а рослинного – між 50-60 °С. Проте є ферменти з вищим температурним оптимумом, наприклад, у папаїна (фермент рослинного походження, який прискорює гідроліз білків) оптимум знаходиться при 80 °С. У той же час у каталази (фермент, який прискорює розпад H_2O_2 до H_2O і O_2) оптимальна температура дії знаходиться між 0 °С і 10 °С, а при вищих температурах відбувається енергійне окиснення ферменту і його інактивація.

Мета роботи: дослідити термолабільність і специфічність β -амілази слини.

Реактиви:

- 1 % розчин крохмалю;
- 10 % розчин гідроксиду натрію (NaOH);

- 1 % розчин сульфату купруму (CuSO_4);
- розчин йоду в йодистому калії;
- слина, що розведена у 5 разів фізіологічним розчином.

Обладнання: мірні циліндри на 10 мл або 25 мл; піпетки на 1 мл; термостат або водяна лазня (температура 38°C); штатив для пробірок, сухий спирт, спиртівки.

ХІД РОБОТИ

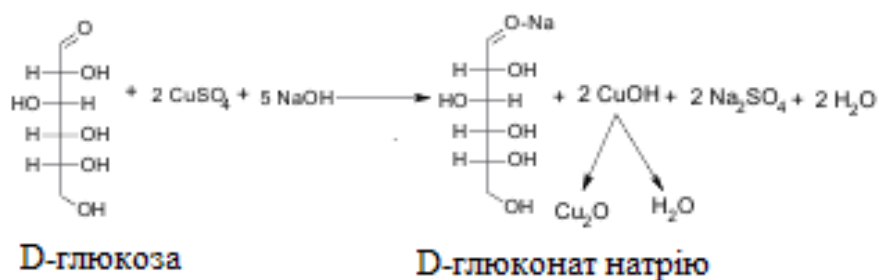
Термолабільність

Слину розводять у мірному циліндрі у 5 разів. До чистої пробірки відливають невелику кількість розведеної слини (2 або 3 мл) і кип'ячать протягом 5-8 хв, після чого охолоджують.

До трьох пробірок вносять по 10 крапель 1 % розчину крохмалю. До першої пробірки додають 10 крапель розведеної слини, до другої – 10 крапель прокип'яченої слини, до третьої – 10 крапель води (у якості контролю). Всі пробірки переносять до термостату або водяної лазні при температурі 38°C та інкубують протягом 10 хв. Потім проводять якісні реакції на крохмаль і редукуючи (відновлюючи) речовини, для чого вміст кожної пробірки ділять на два об'єми.

Реакція на крохмаль: до 5 крапель досліджуваного розчину приливають 1 краплю розчину йоду в йодистому калії. У присутності крохмалю розвивається синє забарвлення.

Реакція Тромера (реакція на редукуючи речовини): до 5 крапель досліджуваного розчину додають 5 крапель 10 % розчину NaOH і 5 крапель 1 % розчину CuSO_4 . Розчин забарвлюється у синій колір. Пробірку обережно (на малому вогні спиртівки) нагрівають до кипіння. Спочатку випадає жовтий осад гідроксиду міді CuOH , який потім переходить до червоного осаду Cu_2O .



Речовини, що відновлюють (цукри) мають незаміщену напівацетальну гідроксильну групу за атомом Карбону у 1 положенні.

Глюкоза (продукт ферментативного гідролізу крохмалю) у лужному середовищі відновлює гідроксид міді до оксиду, а сама окиснюється до глюконової (цукрової) кислоти. При більш глибокому окисненні глюкози утворюються солі глюконової кислоти (глюконати) та низка інших сполук. Реакція Тромера для крохмалю та олігосахаридів не відбувається. Необхідно запобігати додаванню надлишку сульфату купруму, оскільки гідрат окису

купруму – $\text{Cu}(\text{OH})_2$ – має блакитний колір, а при нагріванні утворюється оксид купруму (II) – осад чорного кольору, що може маскувати появу червоного осаду Cu_2O .

Одержані результати рекомендовано занести до таблиці:

Таблиця

Субстрат	Фермент	Реакція на крохмаль з йодом	Реакція Тромера	Висновки

Специфічність

Відмітною особливістю ферментів у порівнянні з небілковими каталізаторами є їх висока специфічність – константа взаємодії деяких субстратів з білком може досягати 10^{-10} моль/л і менш. Специфічність – одна з найбільш визначних якостей ферментів. Ця властивість була відкрита ще у минулому сторіччі, коли було зроблене спостереження, що дуже близькі за структурою речовини – просторові ізомери, розщеплюються по ефірному зв'язку двома абсолютно різними ферментами.

Специфічність ґрунтується на суворій відповідності стеричної структури субстрату та активного центру ферменту. Структура активного центру ферменту відповідає структурі його субстрату, внаслідок чого даний фермент із багатьох речовин, що знаходяться у клітині, приєднує тільки свій субстрат. Таким чином, ферменти можуть розрізняти хімічні сполуки, що відрізняються один від одного дуже незначними елементами будови, такими, наприклад, як просторове розташування метоксильного радикалу й атому Гідрогену при 1-му Карбоні молекули метилглюкозида.

За ознакою специфічності ферменти ділять на дві групи: з абсолютною та відносною специфічністю. Ферменти, які каталізують перетворення тільки одного субстрату з певною структурою, виявляють **абсолютну специфічність**. Будь-які модифікації (зміни) у структурі субстрату роблять його недоступним для дії ферменту. Прикладом може бути уреаза, яка розщеплює лише сечовину, але не діє на модифікаційну форму – тіосечовину. Сахараза гідролізує лише сахарозу, а на інші дисахариди не діє.

До абсолютної специфічності належить також і стереохімічна особливість, яку мають ферменти, здатні діяти тільки на певні стереоізомери, наприклад, D- або L-ізомери, цис- або транс-ізомери тощо, тобто фермент, який розщеплює або синтезує D-ізомер, діяти на L-ізомер не буде.

Ферменти з відносною (груповою) специфічністю – діють на декілька (групу) речовин, які мають один і той самий певний тип зв'язку або схожу структуру. До таких ферментів, зокрема, належать естерази, які каталізують гідроліз складних ефірів, травні ферменти (протеази, ліпази), гексокіназа.

Реактиви:

- 1 % розчин сахарози;
- 1 % розчин крохмалю;
- 10 % розчин гідроксиду натрію (NaOH);
- 1 % розчин сульфату купруму (CuSO₄);
- слина, що розведена 1:10.

Обладнання: термостат (або водяна лазня); штатив з пробірками, сухий спирт, спиртівки.

ХІД РОБОТИ

До двох пробірок приливають по 5 крапель розведеної у 10 разів слини. До першої пробірки вносять 10 крапель 1 % розчину крохмалю, до другої – 10 крапель 1 % розчину сахарози. Обидві пробірки переносять до термостату або водяної лазні при температурі 38 °С, після чого з реакційною сумішшю проводять реакцію Тромера на редуруючі вуглеводи.

Одержані результати заповнюють до таблиці:

Таблиця

Субстрат	Фермент	Реакція Тромера	Висновки

Контрольні питання:

1. Дайте визначення терміну термолабільність ферментів.
2. Що таке температурний оптимум ферменту?
3. Чим пояснюється термолабільність ферментів?
4. Опишіть якісні реакції на крохмаль і вуглеводи.
5. Які речовини відносять до редукуючих?
6. Дайте визначення терміну специфічність ферментів. Типи специфічності.
7. На чому базується явище специфічності ферментів?
8. Яка специфічність характерна для амілази слини?

Лабораторна робота №3 “Кількісне визначення глюкози у біологічних рідинах”

Глюкоза є головним паливом для багатьох тканин, однак вона (а також її метаболіти) приймають участь й в інших процесах. Глюкоза перетворюється в полімер глікоген, який запасається в деяких тканинах, особливо в скелетних м'язах і печінці. Глюкоза є субстратом пентозомонофосфатного циклу. Цей шлях є джерелом відновних еквівалентів, що використовуються в процесах біосинтезу, наприклад, біосинтезу жирних кислот; окрім того, є джерелом рибози, що потрібна для синтезу нуклеотидів і нуклеїнових кислот. Тріозофосфат, що утворюється в ході однієї зі стадій гліколізу, є джерелом

гліцеролу для синтезу триацилгліцеролів (жирів). Піруват й ряд проміжних сполук циклу лимонної кислоти – це джерела карбонових скелетів, що використовуються в синтезі амінокислот, а ацетил-КоА є основним будівним блоком у синтезі довголанцюгових жирних кислот й холестеролу – попередників усіх стероїдів, що синтезуються в організмі.

Мета роботи: вивчити характерні реакції вуглеводів, ознайомитися з методами кількісного визначення глюкози у сироватці, плазмі крові, сечі.

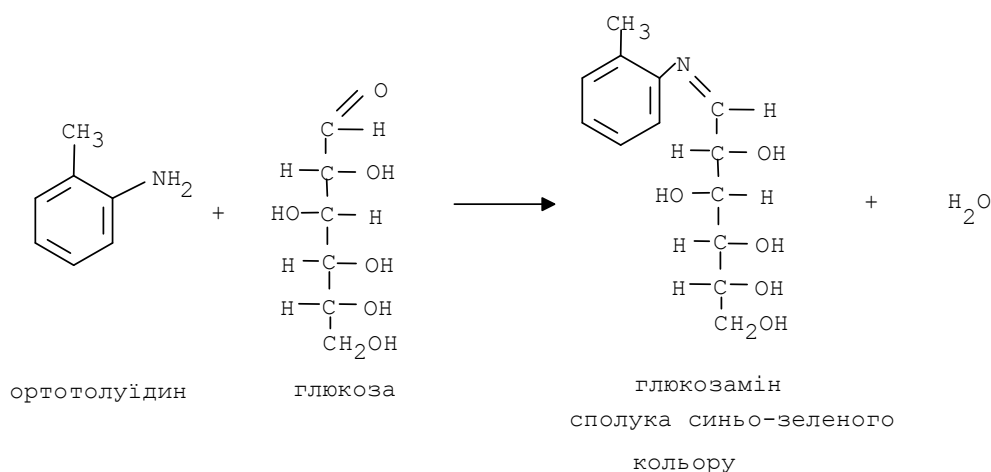
Визначення глюкози за глюкозооксидазним методом

Принцип методу: глюкоза у присутності ферменту глюкозооксидази окиснюється з утворенням перекису гідрогену, який окиснює орто-толідін, в результаті чого утворюється забарвлена речовина (інтенсивність забарвлення пропорційна вмісту глюкози).

Реактиви:

- 1 % розчин орто-толідину в абсолютному спирті (зберігається у темному склі протягом кількох місяців);
- 0,25 М ацетатний буфер, рН 4,8;
- 0,9 % розчин NaCl;
- 5 % розчин ZnSO₄ у дистильованій воді;
- 0,3 М розчин NaOH.

Підготовка робочого реактиву: у 80 мл ацетатного буфера розчиняють 2 мг глюкооксидази (α -D-глюкоза:O₂-оксиредуктаза; КФ 1.1.3.4.) із активністю 3000 од/мг і 1 мг пероксидази хрому, додають 1 мл 1 % розчину орто-толідину, перемішують та доводять об'єм до 100 мл. Робочий розчин повинен бути прозорим, незабарвленим або мати слабо-зелений відтінок; зберігати його слід при температурі +4 °С.



Приготування калібрувальних розчинів глюкози: глюкозу висушують при 37 °С і готують основний розчин з концентрацією 50 мМ у насиченому (біля 0,3 %) розчині бензойної кислоти. З основного розчину готують робочі калібрувальні розчини з концентраціями 3; 6; 9; 12; 15; 18; і 21 мМ розчину бензойної кислоти.

ХІД РОБОТИ

У центрифужні пробірки вносять 1,1 мл розчину 0,9 % NaCl, 0,4 мл розчину 5 % ZnSO₄ і 0,4 мл 0,3 М NaOH, перемішують; при цьому утворюється тонкий гель гідрату окису цинку, до нього додають 0,1 мл біологічної рідини або калібрувального розчину, знову перемішують та через 10 хв центрифугують при 3000 об/хв протягом 10 хв.

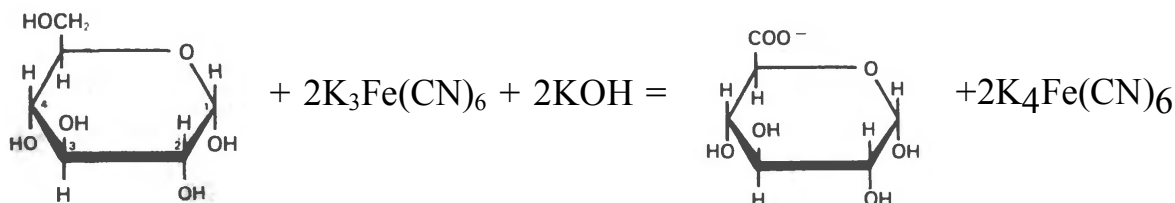
До 1 мл надосадової рідини додають 3 мл робочого реактиву та обережно перемішують. Поступово розвивається забарвлення, яке при кімнатній температурі досягає максимуму через 13-15 хв, а потім поступово зменшується. Фотометрують у 1 см кюветах при червоному світлофільтрі (620 нм) проти холостого зразку (замість біологічної рідини додають фізіологічний розчин 0,9 % NaCl), який ставлять разом із дослідним. Фотометрувати проби потрібно через один і той же час після внесення робочого розчину!

Розрахунок проводять за правилом пропорцій або за калібрувальним графіком, для побудови якого на одній вісі (X) відкладають значення концентрацій глюкози (мМ), а на другій (Y) – величину екстинкції.

Визначення глюкози за методом Хагедорна–Йенсена

Принцип метода: ґрунтується на властивості глюкози приймати участь в окиснювально-відновних реакціях.

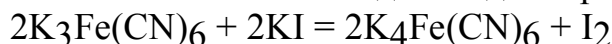
Глюкоза при окисненні відновлює у лужному середовищі червону кров'яну сіль (гексаціаноферат(III) калію), перетворюючи її на жовту кров'яну сіль (гексаціаноферат(II) калію):



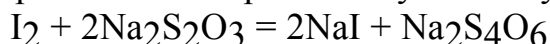
Глюкоза

Глюконова кислота

Гексаціаноферат(III) калію (заліzosинеродистий калій) у ході реакції додається надмірно. Залишена після взаємодії з глюкозою кількість гексаціаноферат(III) калію визначається методом йодометрії:



Для зв'язування утвореного гексаціаноферат(III) калію додається сульфат цинку, що входить до складу потрійного розчину. Вільний йод титрують розчином гіпосульфіту при наявності крохмалю у кислому середовищі:



Метод Хагедорна–Йенсена має високу чутливість.

Реактиви та матеріали:

- 0,45 % розчин сульфату цинка;
- 0,1 н розчин гідроксиду натрію;
- 0,005 н розчин гексаціаноферат(III) калію;
- потрібний хлор-цинк-йодистий розчин;
- 3 % розчин ацетатної (оцтової) кислоти;
- 1 % розчин крохмалю у насиченому розчині хлориду натрію;
- 0,0005 н розчин гіпосульфїту,
- сироватка крові.

Обладнання: водяна лазня зі штативом для стаканів; пробірки; мікропіпетки; піпетки на 1, 2, 5 мл; бюретки на 2 мл; фільтри або вата.

ХІД РОБОТИ

Для проведення аналізу готують 2 пробірки із гідратом окису цинку. Для цього у кожену пробірку приливають 5 мл 0,45 % розчину сульфату цинка та 1 мл 0,1 н розчину гідроксиду натрію. Потім мікропіпеткою додають 0,1 мл дослідної рідини в одну з пробірок з гідратом окису цинку.

Потім дві пробірки: першу з дослідною речовиною і другу – контрольну (тільки з розчином гідрату окису цинку) ставлять у киплячу водяну лазню рівно на 3 хв для осадження білків. Після цього вміст пробірок фільтрують крізь фільтр, наперед змочений дистильованою водою. Пробірки промивають двічі по 2 мл гарячої дистильованої води та фільтрують крізь той самий фільтр. Потім у ці дві пробірки додають по 2 мл титрованого розчину гексаціаноферат(III) калію 0,005 н, після чого переносять їх у киплячу водяну лазню на 15 хв. Потрібно дотримуватися точного часу. Після інкубації до всіх пробірок додають по 3 мл потрібного розчину, що містить йодистий калій, та по 2 мл 3 % розчину ацетатної кислоти. Розчин починає жовтіти від вільного йоду. У кожену пробірку додають по 50 мкл розчину крохмалю та титрують гіпосульфїтом до зникнення синього кольору.

Вказівки до складання звіту. Кількість цукру в 0,1 мл крові вираховують за таблицею, складеною для 0,005 н розчину гіпосульфїту. За таблицею знаходять кількість цукру в міліграмах, еквівалентну об'єму гіпосульфїта, витраченого на титрування.

Приклад: на титрування досліджуваної проби витрачено 1,43 мл гіпосульфїту, знаходимо у таблиці в першому вертикальному стовпчику цифру 1,4 та у верхньому горизонтальному – 0,03. У місті перетину знайдемо цифру 0,101, що відповідає кількості цукру у 0,1 мл крові.

Припустимо, що на титрування контрольної проби витрачено 1,97 мл гіпосульфїту, що відповідає 0,005 мг цукру. Із кількості цукру, знайденого у крові (0,101), віднімають значення, що відповідає контрольній пробі (0,005). Отже, у 0,1 мл крові міститься 0,096 мг цукру (у 100 мл – 96 мг).

Нормальні величини концентрації глюкози у крові – 3,5-5,5 мМ/л, сироватці – 3,6-6,1 мМ/л, спинномозковій рідині – 2,78-3,89 мМ/л.

Вміст цукру в крові за методом Хагедорна–Йенсена

Гіпосуль- фіт, мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,286	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Контрольні питання:

1. Структура та функції вуглеводів.
2. Характеристика головних харчових вуглеводів.
3. Біохімічні механізми транспорту різних вуглеводів із кишковика до крові.
4. Регулювання кількості цукру в крові.
5. Біохімічні шляхи використання глюкози в тканинах.
6. Анаеробні шляхи окиснення глюкози.
7. Специфічність залучення різних вуглеводів до гліколітичного метаболізму.
8. Порушення обміну вуглеводів.
9. У чому різниця між методами визначення глюкози у біологічних рідинах?

Лабораторна робота №4 «Вплив рН середовища на активність амілази слини»

рН, Гідрогений показник – величина, що показує кількість іонів гідрогену (H^+) у розчині, тобто ступінь кислотності або основності цього розчину. Молекули води до певної міри здатні до дисоціації, що описується рівнянням:



рН обчислюється як від'ємний десятковий логарифм концентрації іонів H^+ (або, точніше, для водних розчинів – іонів гідроксонію [H_3O^+]) і є безрозмірною величиною:

$$pH = -\lg [H^+]$$

Отже для нейтральних розчинів значення рН дорівнює 7, для лужних – більше 7, для кислих – менше. За значенням рН можна розрахувати рОН.

$$pOH = 14 - pH$$

Активність ферментів залежить від реакції середовища, що пояснюється його білковою природою. Значення рН, при якому спостерігається максимальна активність ферменту, називається оптимумом рН. Зміни рН призводять до змін ступеня іонізації іоногенних груп в активному центрі. При різних значеннях рН в реакційному середовищі активний центр може бути слабкіше або сильніше іонізований, більше або менше екранований сусідніми з ним фрагментами поліпептидного ланцюга білкової частини ферменту і т.п. рН середовища впливає на ступінь іонізації субстрату, фермент-субстратного комплексу і продуктів реакції, сильно впливає на стан ферменту, визначаючи співвідношення в ньому катіонних і аніонних центрів, що позначається на третинній структурі білкової молекули. Остання обставина заслуговує особливої уваги, оскільки певна третинна структура білка-ферменту необхідна для утворення фермент-субстратного комплексу. Крім того, зміни іонізації білка (не лише в області активного центру) викликають конформаційні зміни молекули ферменту. Оптимум рН для більшості ферментів лежить у межах 6-8 (трипсин – 8,0-9,0; сахараза – 6,2; амілаза слини – 6,9-7,0; панкреатична ліпаза – 7,0-8,0; каталаза – 7,0- 7,6). Виключення – пепсин – 1,5-2,5. Кількісне визначення ферментів проводять за оптимальним для кожного ферменту рН.

Мета роботи: визначити оптимальне значення рН середовища на активність амілази слини.

Принцип методу: вплив рН середовища на активність амілази визначають на підставі інтенсивності розщеплення цим ферментом крохмалю.

Реактиви:

– 0,5 % розчин крохмалю;

- слина у розведенні 1:100 (у залежності від активності слини її можна розводити у 50 або 10 разів);
- 0,2 М розчин Na_2HPO_4 ;
- 0,1 М розчин цитратної кислоти;
- розчин йоду в йодистому калію;
- 1 % розчин NaCl .

Обладнання: водяна лазня або термостат з температурою 38 °С, штатив з пробірками, піпетки.

ХІД РОБОТИ

До пробірок вносять 0,2 М розчин Na_2HPO_4 і 0,1 М розчин цитратної кислоти у співвідношеннях, приведених у таблиці:

Таблиця

Приготування інкубаційної суміші з різними значеннями рН

Об'єм 0,2 М розчину Na_2HPO_4 , мл	Об'єм 0,1 М розчину цитратної кислоти, мл	рН суміші	Забарвлення йодом
0,58	0,42	5,6	
0,63	0,37	6,0	
0,69	0,31	6,4	
0,77	0,23	6,8	
0,87	0,13	7,2	
0,94	0,06	7,6	
0,97	0,03	8,0	

Отримують буферні розчини, рН яких від 5,6 до 8,0. До кожної пробірки додають по 10 крапель 1 % розчину NaCl і 0,5 % розчину крохмалю, а також по 1 мл слини, розведеної у 10 разів. Перемішують вміст пробірок і переносять їх до водяної лазні або термостату (38 °С) на 10 хв. Потім до усіх пробірок додають по 1 краплі розчину йоду в КІ, перемішують, спостерігають забарвлення і визначають рН, при якому амілаза діє найбільш активно.

Зробити висновок.

Контрольні питання:

1. Дайте визначення поняттю рН середовища.
2. Напишіть рівняння іонізації води та розрахунку рН.
3. Що таке оптимальне значення рН ферментів (наведіть приклади)?
4. Опишіть механізм впливу рН середовища на активність ферментів.

Лабораторна робота № 5. Визначення активності амілази у біологічних рідинах. Уніфікований амілокластичний метод із стійким крохмальним субстратом (метод Каравея).

α -Амілаза (α -1,4-глюкан-4-глюканогідролаза, КФ 3.2.1.1.) належить до ендоамілаз та каталізує гідролітичне розщеплення внутрішніх 1,4- α - глікозидних зв'язків у молекулах глікогену й крохмалю без будь-якого порядку, внаслідок чого спочатку утворюються олігосахариди, а при їхньому гідролізі утворюється дисахарид мальтоза у α -формі, звідки і походить назва ферменту. α -Амілаза утворюється, головним чином, екзокринно підшлунковою залозою та слинними залозами. Визначення активності даного ферменту проводиться для діагностики та контролю захворювань підшлункової залози, як гострого так і хронічного панкреатиту. Активність α -амілази також може характеризувати жовчні або шлунково-кишкові захворювання.

Мета роботи: ознайомитися з методом кількісного визначення активності амілази у сироватці, плазмі крові, сечі.

Принцип методу: α -амілаза гідролізує крохмаль з утворенням кінцевих продуктів, які не дають забарвлення з йодом. Зниження активності α -амілази визначають за зменшенням інтенсивності забарвлення.

Реактиви:

– Розчин субстрату, рН 7,0: 13,3 г Na_2HPO_4 і 2 г бензойної кислоти розчиняють у 250 мл 0,154 М NaCl та доводять до кипіння. Суспендують 0,2 г крохмалю (крохмаль за Лінтнер) у малому об'ємі дистильованої води та додають його у киплячий буферний розчин, кип'ятять протягом 1 хв. Після охолодження доводять об'єм до 500 мл дистильованою водою. Розчин стабільний при кімнатній температурі протягом 10-12 днів. Розчин повинен залишатися прозорим.

– Робочий розчин йоду: 0,036 г KIO_3 та 0,45 г KI розчиняють у 40 мл дистильованої води, при перемішуванні додають 0,09 мл концентрованої HCl . 5 г KF розчиняють у 50 мл води, фільтрують у мірну колбу, додають 40 мл розчину йоду та доливають водою до 100 мл. Зберігають розчин у темному склі протягом місяця.

– Матеріал для дослідження: свіжа сироватка крові або плазма крові, сеча.

Обладнання: водяна лазня або термостат з температурою 38°C , штатив з пробірками, піпетки.

ХІД РОБОТИ

Мікроеваріант. Дослідна проба: 0,5 мл субстратного розчину вносять до пробірки, нагрівають 5 хв при 37°C , додають 0,01 мл біологічної рідини. Інкубація здійснюється протягом 7 хв при 37°C . Час інкубації потрібно суворо вираховувати від моменту додання біологічної рідини до крохмального субстрату. Після інкубації додають 0,5 мл 0,01 н робочого розчину йоду та доводять об'єм дистильованою водою до 5 мл. Проби вимірюють на ФЕКі у 1 см кюветі при 630-690 нм (червоний світлофільтр) проти води.

Контроль або холосту пробу ставлять так само, як і дослідну, але біологічну рідину додають після інкубації з 0,01 н розчином йоду. Вимірюють при однакових умовах, як і дослідну проти води.

Макроваріант. Хід визначення дослідної та холостої проб такий самий, що і при мікроваріанті, але об'єм усіх реактивів і біологічної рідини збільшують у 5-10 разів.

Розрахунок. Активність α -амілази виражають у міліграмах або грамах крохмалю, котрий гідролізується 1 л біологічної рідини за 1 г інкубації при 37 °С. Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{Активність амілази, мг/(г * л)} = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot C * t * K,$$

де E_1 – екстинкція холостої проби;

E_2 – екстинкція дослідної проби;

C – кількість крохмалю, введеного у дослідну та холосту проби (0,2 мг при мікроваріанті);

t – коефіцієнт перерахування на 1 секунду інкубації;

K – коефіцієнт перерахування на 1 літр біологічної рідини з урахуванням розведення.

Нормальні величини. Сироватка крові: 3,3 – 8,9 мг / (с*л), або 12 – 32 мг / (г*мл). Сеча: до 44 мг / (с*л), або до 120 мг / (г*мл).

Зробити висновок.

Контрольні питання:

1. Дайте визначення α -амілази.
2. Яка специфічність α -амілази.
3. Назвіть оптимальні параметри активності α -амілази.
4. Опишіть послідовність маніпуляцій для визначення активності α -амілази.
5. Клінічне значення визначення активності амілази у біологічних рідинах людини.
6. Ізоферменти амілази: схожість та різниця.
7. Інші травні ферменти, що розщеплюють вуглеводи в ЖКТ людини, окрім α -амілази.
8. Які продукти утворюються за умов дії α -амілази на крохмаль та глікоген.
9. Чи може α -амілаза розщеплювати целюлозу?
10. Чи є видова специфічність α -амілази (різні мікроорганізми, різні тварини, людина)?

Лабораторна робота № 6 «Специфічність дії сахарози дріжджів»

Сахараза (β -Фруктофуранозидаза, інвертаза) – фермент класу гідролаз (КФ 3.2.1.26), специфічними субстратами для якого є β -Д-фруктофуранозиди, у тому числі сахароза, та каталізує гідролітичне розщеплення β -2 \rightarrow α -1-глікозидний зв'язок з утворенням вільних глюкози та фруктози. Також, субстратом для сахарози є трисахарид рафіноза, при розщепленні якої вивільнюється вільна тільки фруктоза.

Принцип методу: дію фермента можна виявити за специфічною реакцією на вільну глюкозу (реакція Тромера на вуглеводи, що відновлюють, „срібного дзеркала” з реактивом Фелінга). Сахароза не містить вільного напівацетального гідроксилу, тому в реакції Тромера та „срібного дзеркала” не вступає.

Мета роботи: виявити специфічність дії сахарози дріжджів.

Реактиви:

- пекарські дріжджі;
- 1 % розчин крохмалю;
- 1 % розчин сахарози;
- 1 % водний розчин сульфату купрума;
- 10 % водний розчин гідроксид натрію;
- дистильована вода.

Обладнання: терези, скляна воронка, паперовий фільтр, пробірки, термометр, затискач, ступка, водяна лазня, секундомір.

ХІД РОБОТИ

Для отримання сахарози наважку сухих пекарських дріжджів масою 0,5 г розтирають для руйнування клітин. Потім додають 5 мл дистильованої води і знову продовжують розтирати. Отриману суспензію фільтрують через складчастий паперовий фільтр. У фільтраті і міститься сахароза.

У дві пробірки вносять по 1 мл розчину сахарози. У 1 пробірку приливають – 1 мл 5 % розчину сахарози; у 2 – 1 мл 5 % розчину крохмалю. Пробірки ставлять на водяну лазню або термостат із температурою 36 – 38 °С і витримують протягом 15 хвилин.

З кожної пробірки відбирають проби об'ємом 0,5 мл; додають у пробу по 10 крапель 10 % розчину NaOH і по 3 краплі 1 % розчину CuSO₄. Потім проби перемішують і нагрівають до кипіння. Утворення червоного чи жовтого осаду свідчить про наявність у пробі глюкози.

Отримані результати занести у таблицю.

Таблиця

№ п/п	Фермент (сахараза), мл	Розчин сахарози, мл	Розчин крохмалю, мл	Наявність вільної глюкози
1				
2				

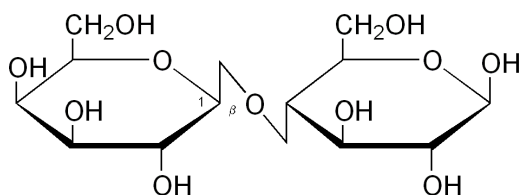
Зробити висновок.

Контрольні питання:

1. Дайте визначення сахарози.
2. Яка специфічність сахарози.
3. Назвіть оптимальні параметри активності сахарози.
4. Визначити причини негативної реакції Тромера при додаванні у реакційну суміш ферменту сахарози і розчину крохмалю.
5. Опишіть реакцію Тромера.

Лабораторна робота № 7 «Визначення концентрації лактози в молоці»

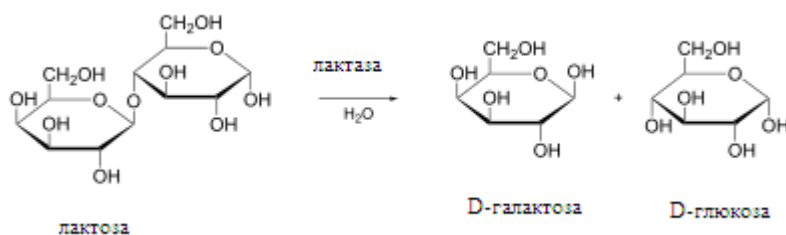
Лакто́за (β -D-галактопіранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-глюкопіраноза), молочний цукор, – вуглевод групи дисахаридів, міститься в молоці і молочних продуктах. Молекула лактози складається із залишків молекул глюкози і галактози, і виявляє відновні властивості.



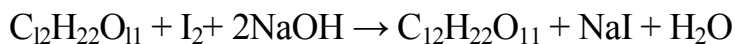
Молекула лактози

Під час травного процесу лактоза розщеплюється за допомогою лактази (ферменту, що виділяється в тонкому кишковикі, КФ 3.2.1.108) на прості моноцукри глюкозу й галактозу, які всмоктуються ентероцитами і потрапляють у кров.

«Неперенесення» лактози означає нездатність її перетравлювати, пов'язану з недостатністю ферменту лактази. Симптоми неперенесення лактози: після вживання молочних продуктів розвиваються діарея або метеоризм, судоми у кишечнику, ступінь тяжкості яких залежить від рівня недостатності ферменту. Причиною може бути надмірне зростання і посилення життєдіяльності мікрофлори кишечника, які використовують лактозу у якості поживної речовини, а також осмотичним ефектом неперетравленої лактози, яка зв'язує молекули води.



Принцип методу: базується на здатності альдегідної групи лактози у лужному середовищі окиснюватися молекулярним йодом за наступною реакцією:



Надлишкову кількість йоду, яка не вступила в реакцію, визначають титруванням тіосульфатом натрію та у якості індикатору використовують крохмаль.

Реактиви та матеріали дослідження:

- 7 % розчин CuSO_4 ;
- 2 % розчин NaOH ;
- 5 % розчин NaF ;
- 0,04 М I_2 ;
- 5 % розчин HCl ;
- 0,05 М $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;
- 1 % розчин крохмалю;
- молоко.

Посуд та обладнання: пробірки, штативи, піпетки, скляні палички, колби мірні, бюретки, крапельниці, годинник.

ХІД РОБОТИ

У дві мірні колби внести по 5 мл розчину сульфату купруму, по 5 мл розчину натрію гідроксиду та по 2,5 мл розчину натрію фториду. В одну з них (проба) додати 5 мл молока, в іншу (контроль) – 5 мл дистильованої води, перемішати, додати дистильованої води до об'єму 50 мл і через 30 хвилин відфільтрувати. Потім у дві конічні колби перенести по 20 мл фільтрату: у першу – проби, у другу – контроль. У кожну колбу влити по 20 мл розчину йоду і, безперервно перемішувати, одночасно додати по 10 мл розчину гідроксиду натрію. Колби ретельно закрити і залишити при кімнатній температурі на 20 хв, потім до їх вмісту додати по 10 мл розчину соляної кислоти та по три краплі розчину крохмалю й титрувати розчином натрію тіосульфату до зникнення забарвлення, яке утворилося внаслідок додавання крохмалю.

Масову концентрацію лактози в молоці, мг/мл, розраховують за формулою:

$$C = (A - B) \times f \times Q \times V_0 \div V_1 \times V_2,$$

A і B – об'єм розчину натрію тіосульфату, витрачений на титрування проби та контролю;

f – коефіцієнт поправки на титр 0,05 моль/л розчину натрію тіосульфату (0,97);

Q – маса лактози (18,1 мг), еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину натрію тіосульфату;

V_0 – загальний об'єм проби;

V_1, V_2 – об'єми фільтрату та молока, що взяті для дослідження.

Зробити висновок.

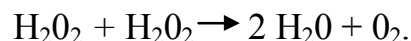
Контрольні питання:

1. Дайте визначення лактози, напишіть її структурну формулу.
2. Який фермент кишкового розщеплює лактозу.
3. Назвіть причини неперенесення лактази.
4. Назвіть симптоми і причини неперенесення лактази.
5. Яка якісна реакція лежить в основі кількісного визначення лактази? Напишіть її.
6. Напишіть реакцію розпаду лактози.

Лабораторна робота № 8 «Виявлення дії каталази і ксантинооксидази»

Каталаза (гідроген-пероксидаза: гідроген-пероксид- оксидоредуктаза; КФ 1.11.1.6) – фермент, який знаходиться у клітинах майже усіх аеробних організмів. Молекула типової каталази складається з чотирьох ідентичних субодиниць, кожна з яких містить у якості кофактору ферумпорфіриновий комплекс. Молекулярні маси каталаз складають звичайно 220-270 кДа. У клітинах еукаріот каталаза локалізована у пероксисомах. Пероксисоми – обмежені елементарною бішаровою мембраною органели. Каталаза відноситься до числа ферментів, які найбільш інтенсивно досліджуються на теперішній день. Вперше еритроцитний фермент був виділений та очищений у 1910 р., а кристалічний препарат каталази печінки бика був одержаний Самнером у 1937 р.

Каталаза є компонентом комплексного ферментативного антиоксидантного захисту організму від токсичних сполук, особливо Оксигену. Фермент відновлює перекис гідрогену до води згідно з нижче наведеним рівнянням:



Каталаза може також неспецифічно реагувати з ліпідними гідропероксидами. Поряд з розкладанням перекису гідрогену та, таким чином, захистом клітини від його токсичного впливу, фермент каталізує цілу низку метаболічно значимих реакцій, перелік яких постійно розширюється. Каталітична активність каталази не залежить від змін рН в області 5-10,5. Типові каталази стійкі до дії органічних розчинників та відносно термостабільні. Каталаза утворює зворотні комплекси з ціанідом, азидом та флуоридом, які діють як інгібітори каталазної активності.

Каталазу використовують у промисловому виробництві. У харчовій промисловості застосування глюкозооксидази в якості антиокиснювача та для видалення цукру при зберіганні продуктів, стабілізації вин, безалкогольних напоїв, соків, жирних та м'ясо-молочних продуктів має здійснюватися у комплексі з каталазою. Використання каталази при холодній стерилізації молока, сиру, яєць забезпечує одержання більш високоякісних продуктів. Препарати каталази також можуть бути корисними для цілої низки процесів

хімічного виробництва, пов'язаних з використанням перекису гідрогену: відбілювання матеріалів, органічного синтезу, полімеризації каучуку, одержання пористих матеріалів.

Описано патологічні процеси, пов'язані з недостатністю каталази в організмі. У 1946 р. вперше у японських пацієнтів була описана рідка аутосомна рецесивна недостатність каталази (1-3 % від норми), яка спостерігалася в усіх тканинах і проявлялася у рецидуючих некрозах, гангрені, грануломатозних пошкодженнях носоглоткової та гайморової порожнин, міндалін. Оральні виразки при цьому можуть призводити до втрати зубів у ранньому віці.

Мета роботи: визначити дію каталази у біологічних рідинах.

Принцип методу: виявлення каталази у біологічних рідинах базується на розщепленні перексиду гідрогену з виділенням молекулярного Оксигену у вигляді пухирців газу.

Обладнання та реактиви: пробірки; піпетки; біологічна рідина у розведенні 1:1000; 2 % розчин перексиду гідрогену.

ХІД РОБОТИ

У пробірку наливають 1-1,5 мл біологічної рідини, додають 5-6 крапель перексиду гідрогену. Спостерігають бурхливе виділення пухирців Оксигену.

Ксантиноксидаза (КФ 1.1.3.22)

Фермент, який відіграє важливу роль у процесі деградації пуринових азотистих основ, тому що каталізує перетворення гіпоксантину у ксантин, а ксантин – у сечову кислоту, а також здійснює окисну трансформацію птеридинів і деяких аліфатичних і ароматичних альдегідів. На кожній з цих стадій реакції у субстрат вводиться оксогрупа шляхом окиснення молекулярним Оксигеном. В якості іншого продукту реакції утворюється токсичний пероксид гідрогену (H_2O_2), який у клітинах знешкоджується пероксидазами.

Мета роботи: визначити активність ксантиноксидази у молоці.

Принцип методу: реакція обумовлена відновленням метиленової сині у лейкоформу за рахунок окиснення формальдегіду у мурашину кислоту завдяки каталітичній дії ферменту ксантиноксидази.

Обладнання та реактиви: пробірки; піпетки; водяна лазня; свіже молоко; метиленова синь.

ХІД РОБОТИ

У дві пробірки наливають по 1 мл свіжого молока, у третю – 1 мл прокип'яченого та охолодженого молока. У першу та третю пробірки наливають по 1 краплі суміші формальдегіду та метиленової сині, а до другої – 1 краплю водного розчину метиленової сині. Рідину в усіх трьох пробірках ретельно закорковують (або нашаровують вазелінову олію) для запобігання проникнення Оксигену та поміщають на водяну лазню при температурі $40^{\circ}C$. Через деякий час у першій пробірці рідина знебарвлюється, у другій та третій вона залишається забарвленою у синій колір.

Зробити висновок.

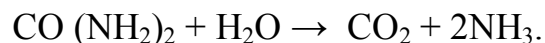
Контрольні питання:

1. Опишіть реакцію за участю каталази.
2. Біологічне значення і розповсюдження каталази.
3. У чому полягає принцип методу визначення активності каталази?
4. Опишіть реакцію за участю ксантиноксидази.
5. Біологічне значення і розповсюдження ксантиноксидази.
6. У чому полягає принцип методу визначення активності ксантиноксидази?

Лабораторна робота № 9 «Виявлення дії уреазі і пероксидази»

В основі якісних проб на наявність ферментів лежать специфічні реакції на продукт ферментативної реакції або виявлення їх присутності за допомогою певного фізико-хімічного методу.

Уреаза (карбамід-амідогідролаза; КФ 3.5.1.5) – фермент, який приймає участь у гідролізі сечовини:



Каталізує, також, розщеплення (але зі значно меншою швидкістю) гідроксі- та дигідроксісечовини.

Уреаза з бобів (Jack bean) має молекулярну масу близько 550 кДа та складається з однакових каталітично активних субодиниць, молекулярна маса яких близько 91 кДа. Кожна субодиниця містить іон Ni^{2+} , необхідний для прояву ферментативної активності. До активного центру входить залишок цистеїну у положенні 592, локалізований в області, багатій на залишки гістидину. Оптимальна каталітична активність уреазі проявляється при рН 6,5-7,5; рІ 5,0-5,1. Інгібується уреазі пероксидом водню, N-етилмалейнімідом, іонами Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ . Зберігає активність у 8 М розчині сечовини.

Уреаза відіграє важливу роль у кругообігу Нітрогену в природі. Ферменти синтезують деякі види бактерій, багато ферменту також у бобах сої. В організмі людини уреазі синтезується бактеріальною мікрофлорою. При тривалому застої сечі в ній розвиваються бактерії, що містять уреазу, від дії якої сечовина при гідролізі дає аміак, а середовище сечі стає лужним (аміачне бродіння сечі). Аміак використовується бактеріями ґрунту для біосинтезу білка.

Уреазою із соєвих бобів можна користуватися для кількісного визначення сечовини у біологічних рідинах. Для цього аміак, що виділяється внаслідок реакції, титрують кислотою. Оскільки дві молекули аміаку еквівалентні одній молекулі сечовини, то за кількістю першого можна встановити кількість сечовини у досліджуваних біологічних рідинах. Також

розроблено та впроваджено у клінічну практику, так званий, уреазний електрод, в основі роботи якого лежить дія уреазы, іммобілізованої на його поверхні. Уреазу застосовують у медицині для лікування деяких захворювань нирок та печінки.

Мета роботи: визначити активність уреазы у біологічних рідинах.

Принцип методу: метод заснований на встановленні лужної реакції суміші, яка розвивається внаслідок виділення аміаку та утворення іону амонію, завдяки каталітичному гідролізу уреазою сечовини.

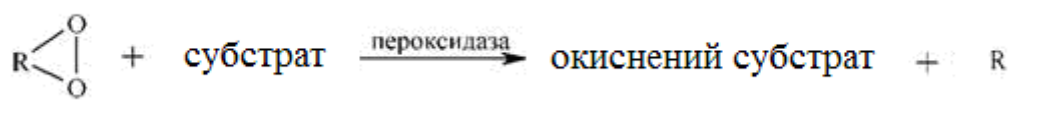
Обладнання та реактиви: пробірки, піпетки, сечовина (2 % розчин) або сеча, соєва мука, фенолфталеїн (0,1 % спиртовий розчин).

ХІД РОБОТИ

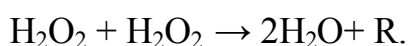
Вносять до пробірки 2-3 мл розчину сечовини або сечі та додають при перемішуванні близько 0,5 г соєвої муки та декілька крапель розчину фенолфталеїну. Спостерігають (краще після 15-20 хв інкубації при 37 °С) виділення аміаку, що може упізнаватися за запахом. При цьому вміст пробірки набуває рожевого забарвлення.

Зробити висновки

Пероксидаза (донор: пероксид гідрогену оксидоредуктази; КФ 1.11.1.7). Це група залізовмісних ферментів класу оксидоредуктаз, що каталізують реакцію окиснення ряду сполук за участю перекисів і утворенням води (у якості акцептора електронів використовують перекис гідрогену H_2O_2) за наступною загальною реакцією:



а також:



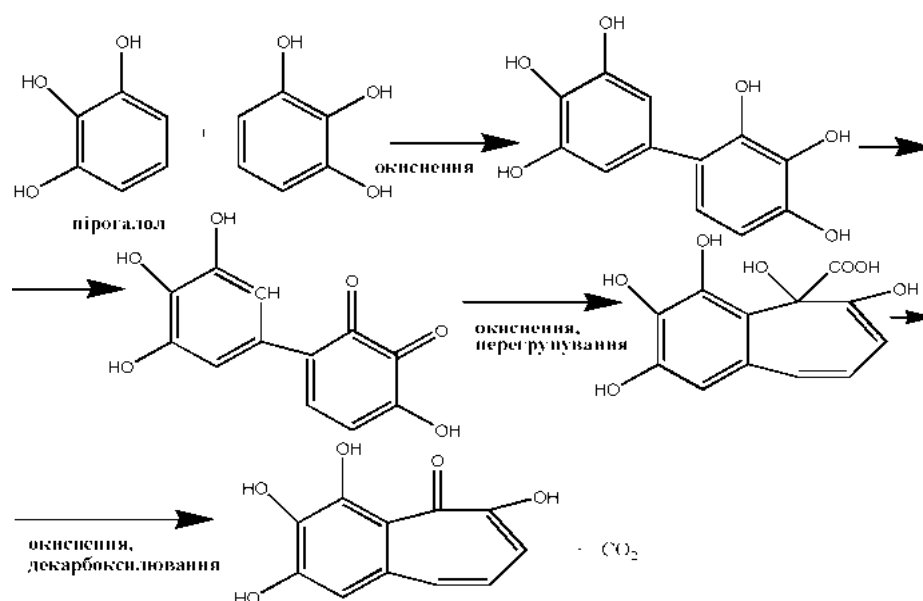
Пероксидази широко розповсюджені у тваринних та рослинних клітинах (можуть знаходитися як у зв'язаному з клітинною стінкою стані, так і у цитоплазмі). Вони приймають участь у фотосинтезі, енергетичному обміні, у трансформації пероксидів та чужорідних організму речовин. Активність пероксидаз та їх ізоферментний склад істотно змінюються за умов стресових станів, пораненнях, вірусному або мікробному інфікуванні організму. Найбільш дослідженою є пероксидаза з коренів хрону (пероксидаза С, Мм 40 кДа), молекула якої складається з одного поліпептидного ланцюга (308 амінокислотних залишків), зв'язаної ковалентно з 8 олігосахаридними ланцюгами. Молекула містить також нековалентно зв'язаний гем з атомами Fe (III) та Fe (IV) (у деяких пероксидаз гем відсутній). При рН, нижчих за 3 та вищих за 12, гем-білковий комплекс руйнується. Найбільш активні субстрати для неї – p- та o-заміщені феноли та ароматичні аміни.

Оптимальна каталітична активність пероксидаз із різних джерел у

реакціях з органічними субстратами спостерігається при рН 5-7, з неорганічними – при рН 4. Інгібітори пероксидаз – іони, які утворюють стійкі комплекси з катіоном Fe (CN^- , N_3^- , S_2^- тощо).

Використовують пероксидази у аналітичних цілях (наприклад, для визначення мікрокількостей H_2O_2 , ароматичних амінів, забруднень у довкіллі), а також для проведення імуноферментного аналізу. Дані по пероксидаційній активності враховують при селекції рослин (чим вище ця активність, тим більш стійка рослина до інфекцій). Перспективно використання пероксидаз для селективного окиснення органічних сполук, а також для глибокої очистки стічних вод від ароматичних сполук.

Принцип методів: виявлення дії пероксидази базується на окисненні пірогалолу до забарвленої речовини пурпурогаліну:



пурпурогалін (жовто-бурого кольору)

Обладнання та реактиви: пробірки; терка; сира картопля; капустияний качан, яблуко, пірогалол (1 % розчин); гідрохінон (1 % розчин); пероксид гідрогену (2 % розчин).

ХІД РОБОТИ

Метод 1

Картоплю, капустияний качан, яблуко, натирають на терці. Невелику кількість картоплі і яблука, не віджимаючи, переносять до пробірки. Із капусти отримують сік, шляхом віджимання крізь подвійний шар марлі і розводять у 10 разів. 2 мл отриманого розчину капустияного соку переносять до пробірки. У пробірки з дослідним матеріалом додають 2 мл 1 %-го розчину пірогалолу та 2 краплі 2 %-го розчину пероксиду гідрогену. При стоянні випадає жовто-бурий осад пурпурогаліну. Багаторазове дегідрування (окиснення) пірогалолу та низки проміжних

продуктів на шляху до пурпурогаліну здійснюється за участю пероксидази, яка кожного разу передає зняті атоми Гідрогену на пероксид гідрогену.

Метод 2

Картоплю, капустияний качан, яблуко, натирають на терці. Із кашки картоплі, яблука, капусти отримують сік, шляхом віджимання крізь подвійний шар марлі. Сік картоплі і яблука розводять у 2 рази, капусти – у 10 разів.

Для кожної дослідної рідини візьміть по 3 чистих сухих пробірок, пронумеруйте.

Для капустияного соку: у пробірки № 1 і 2 додайте по 1 мл соку, у пробірку № 3 – 1 мл дистильованої води. Пробірку № 1 поставити у водяну лазню на 5 хв для інактивації ферменту, потім охолодити до кімнатної температури. У всі пробірки додати на кінчику лопатки гідрохінон і по п'ять крапель пероксиду гідрогену. Вміст кожної пробірки ретельно перемішати. Через 10-15 хв. спостерігати наявність або відсутність забарвлення дослідного розчину.

Ті ж самі маніпуляції повторити із картопляним і яблучним соком.

Результати записати у вигляді таблиці.

Таблиця

Номер пробірки	Склад суміші	Зміна забарвлення	Висновок про окиснення

Зробити висновки по кожному з методів.

Контрольні питання:

1. Опишіть реакцію за участю уреаз.
2. Біологічне значення і розповсюдження уреаз.
3. У чому полягає принцип методу визначення активності уреаз?
4. Охарактеризуйте фермент пероксидазу.
5. Опишіть методи визначення активності пероксидази у біологічних рідинах.
6. У чому полягають принципи методів визначення активності пероксидази?

Лабораторна робота № 10 «Визначення ліпопротеїдів у плазмі крові. Електрофорез ліпопротеїдів у драглях агарози»

Ліпопротеїди знаходяться у крові не у вільному стані, а у складі білок-ліпідних комплексів (хіломікрони, α - та β -ліпопротеїди). α - та β -Ліпопротеїди відрізняються не тільки молекулярною вагою, але й відсотковим вмістом окремих ліпідних компонентів (див. табл.).

Критерії оцінки ліпопротеїдів (ЛП)	Типи ліпопротеїдів			
	ЛПВЩ α-	ЛПНЩ β-	ЛПДНЩ пре- β-	Хіломікрони
Щільність (кг/л)	1,06-1,21	1,01-1,06	1,01-0,93	0,93
Молекулярна вага (кД)	180-380	2 200	3000-128000	-
Розмір молекул (нм)	7,0-10,0	10,0-30,0	200,0	>200,0
Вміст білків (%)	50-57	21-22	5-12	2
Вміст ліпідів (%)	43-50	78-79	88-95	98
Вільний холестерин (%)	2-3	8-10	3-5	2
Естер. холестерин (%)	19-20	36-37	10-13	4-5
Фосфоліпіди (%)	22-24	20-22	13-20	4-7
<u>Загальний холестерин</u> Фосфоліпіди	1	2,3	0,9	1,1
Тригліцериди (%)	4-8	11-12	50-60	84-87

Для α-ліпопротеїдів (ЛПВЩ – ліпопротеїди високої щільності), котрі містять більшу кількість білку, характерна й більш висока щільність. в- (ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності) та пре-β-ліпопротеїди (ЛПДНЩ – ліпопротеїди дуже низької щільності) мають нижчу щільність внаслідок значного вмісту ліпідів (біля 95 %). Ці властивості ліпопротеїдів дозволяють розділяти їх на фракції різноманітними методами.

Клініко-діагностичне значення дослідження ліпопротеїдів у сироватці крові. Дослідження порушень обміну ліпопротеїдів (типування гіперліпопротеїнемії) у хворих проводять відповідно класифікації Фредріксона (1971). В основу класифікації покладено не тільки характер фракційного розподілу ліпопротеїдів, але і вміст тригліцеридів та холестерину у сироватці крові.

Мета роботи: визначити співвідношення рівню ліпопротеїдів у плазмі крові.

Принцип методу: для виявлення окремих фракцій ліпопротеїдів застосовують методи електрофорезу на папері, ацетатцелюлозі, у агарозних, крохмальних, поліакріламідних драглях. Забарвлені ліпопротеїди плазми крові піддають електрофорезу для розподілення їх на фракції. Крім цього, ліпопротеїди можуть бути розділені за методом ультрацентрифугування при низькій температурі (етаноловий метод Кона та його модифікації).

Обладнання та реактиви: пробірки, колби, піпетки, водяна лазня, електрофоретична камера, веронал, мединал, 0,5 % розчин альбуміну на вероналовому буфері, агароза марки «А», судан чорний Б, етиленгліколь, льодяна оцтова кислота, етиловий спирт 96%.

Приготування робочих розчинів:

1) електродний буфер: 1,34 г вероналу розчинити у 600 мл дистильованої води та додати 10,3 г медуналу. Після охолодження розчин довести водою до 1 л (рН буферу 8,6 та йонна сила 0,05);

2) розчин барвника: 200 мг судану чорного Б розчинити у 20 мл етиленгліколю, перемістити посудину у кип'ячу водяну баню. Гарячий розчин профільтрувати та зберігати у склянці з темного скла.

ХІД РОБОТИ

Для приготування драглів 0,32 г агарози марки «А» розчинити у 20 мл дистильованої води при кипінні. Після цього посудину з розчином агарози помістити у водяний термостат при +50-55 °С та додати до нього 20 мл розчину альбуміну, все перемішати.

На знежирене скло, котре знаходиться горизонтально, нанести стільки розчину агарози, щоб товщина драглів була 0,15 мм (наприклад для скла 50 мм на 80 мм потрібно 6 мл розчину агарози) та охолодити. Після полімеризації драглів на катодному кінці зробити лунки довжиною 10 мм та діаметром 0,15 мм. Дно лунки не повинно доходити до скла, щоб запобігти підтіканню зразка під драглі (можна вносити зразки у лунки у розчині агарози). Провести преелектрофорез протягом 15 хв за напругою 100 В у електрофоретичній камері.

Підготовка зразків: до 0,1 мл сироватки крові у пробірці додати 50 мкл розчину барвника, перемістити та залишити у темному місті на 1 годину. Після інкубації зразок внести до лунки. Електрофорез провести за 100 В протягом 1 години. Після електрофорезу скло з драглями відтиснути фільтрувальним папером та зафіксувати у 5 % оцтовій кислоті протягом 1 години. Після цього скло помістити на 20 хв між фільтрувальним папером, який змочений 96 % етиловим спиртом. Потім електрофореграми залишити сохнути.

Кількісну обробку електрофореграм проводять на денситометрі.
Зробити висновок.

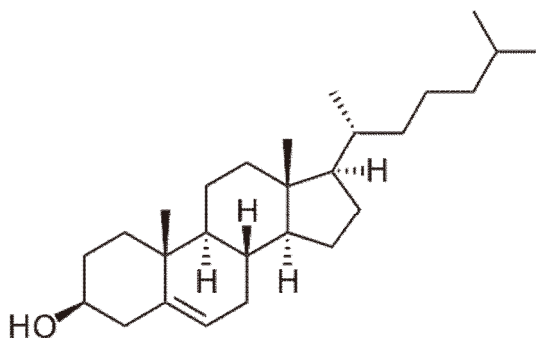
Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте основні фракції ліпопротеїдів крові.
2. Біологічне та клініко-діагностичне значення ліпопротеїдів.
3. У чому полягає принцип електрофоретичного методу визначення кількості ліпопротеїдів?
4. Опишіть послідовність електрофорезу ліпопротеїдів.

Лабораторна робота №11 “Визначення холестерину за методом Ілька”

Холестерин (грец. χολή – жовч і στερεός – твердий) – органічна сполука, природний ліпофільний спирт, що міститься в клітинних мембранах усіх живих організмів, за винятком грибів та без'ядерних (прокаріотів). У рослинних жирах вміст холестерину можна назвати слідовим: у 100 г

пальмового масла міститься 2,3-2,6 мг холестерину, коли як у вершковому маслі – 180-190 мг. Розчиняється у воді, розчинний у жирах і органічних розчинниках. Близько 80 % холестерину виробляється самим організмом людини: (печінкою, кишковиком, нирками, наднирковими, статевими залозами), решта 20 % надходять з їжею. 80 % холестерину в організмі вільні, а 20 % – зв'язані. Холестерин забезпечує стабільність клітинних мембран в широкому інтервалі температур. Попередник вітаміну D, стероїдних гормонів (кортизол, альдостерон, жіночі та чоловічі статеві гормони), відіграє важливу роль в діяльності нервової та імунної системи.



Структура холестеролу

Мета роботи: вивчити властивості та засвоїти метод визначення холестерину у біологічних рідинах.

Принцип методу: присутні у сироватці крові холестерин та його ефіри дають кольорове забарвлення при обробці сумішшю оцтового ангідриду, сульфатної та оцтової кислот.

Обладнання та реактиви: пробірки, колби, піпетки, водяна лазня, льодяна оцтова кислота (CH_3COOH), концентрована сульфатна кислота (H_2SO_4), оцтовий ангідрид, етиловий спирт ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), сироватка крові.

Приготування кислотної суміші: у суху колбу внести 10 мл льодяної оцтової кислоти та 50 мл оцтового ангідриду, потім при постійному перемішуванні та охолодженні додати 10 мл концентрованої сульфатної кислоти. Суміш повинна бути знебарвленою або з слабким жовтуватим відтінком. Зберігати суміш треба у холодильнику в темній щільно закритій склянці.

Приготування калібрувального розчину: 116 мг холестерину розчинити у 2 мл хлороформу та довести об'єм до 50 мл етиловим спиртом. Готовий розчин містить холестерин у концентрації 6 ммоль/л.

ХІД РОБОТИ

До 2,1 мл кислотної суміші повільно по стінці додають 0,1 мл сироватки крові без ознак гемолізу, перемішують і залишають на 20 хв у термостаті або водяній лазні при 37°C . Після цього проби фотометрують у кюветах 0,5 см проти розчину кислотної суміші при 625 нм.

Калібрувальна крива: у чотири пробірки вносять 0,05-0,2 мл калібрувального розчину та додають кислотної суміші до загального об'єму 2,2 мл (див. у табл.), перемішують та залишають на 20 хв при 37 °С також, як і дослідні проби, а потім фотометрують.

Таблиця

№	Холестерин, ммоль/л	Кількість калібр. Розчину, мл	Кількість кислотної Суміші, мл	E _{625 нм}
1	3 ммоль/л	0,05	2,15	
2	6 ммоль/л	0,1	2,1	
3	9 ммоль/л	0,15	2,05	
4	12 ммоль/л	0,2	2,0	

Зробити висновок.

Застереження при виконанні роботи:

а) попереджайте попаданню води у дослідні проби – приводить до помутніння розчину;

б) сліди гемолізу та жовтушність досліджуваної сироватки крові будуть завищувати значення результатів.

Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте основні функції холестерину у живих організмах.
2. Біологічне та клініко-діагностичне значення визначення холестерину.
3. Напишіть структурну формулу холестерину.
4. У чому полягає принцип методу визначення кількості холестерину?
5. Опишіть послідовність визначення холестерину у крові.

Лабораторна робота №12 “Визначення амінного нітрогену”

Збільшення рівня амінокислот у сироватці крові людини має місце після харчування, повернення кількості амінокислот до нормального рівня відбувається протягом 4 годин. Екскреція амінокислот з сечею підвищується під час вагітності внаслідок зниження ниркового порогу. У новонароджених відмічається аміноацидурія, яка поступово зникає. При надлишку м'яса у харчах у людини збільшується екскреція гістидину та метилгістидину, при голодуванні – β-аміноізобутирату.

Збільшення кількості амінокислот у крові людини спостерігається у хворих з комою печінки, гепатитах, отруєнні фосфором, фенілгідразіном, хлороформом, при тяжких опіках, цукровому діабеті, після кровотечі. Підвищення рівня амінокислот може бути при гострих інфекціях, а також при введенні АКТГ, кортизолу. У хворих на фенілкетонурію збільшується кількість вільного фенілаланіну. Зменшення кількості амінокислот у крові відбувається при нефрозах, а також після введення глюкози, інсуліну, гормону роста, андрогенів.

Мета роботи: визначити кількість амінного нітрогену у біологічних рідинах.

Принцип методу: кількість амінного нітрогену визначається колориметричним методом за інтенсивністю забарвлення комплексу, котрий утворюється при взаємодії аміногруп з нінгідринним реактивом.

Обладнання та реактиви: пробірки, колби, піпетки, водяна лазня, 0,04 н розчин оцтової кислоти (CH_3COOH), 1 % водний розчин нінгідрину.

ХІД РОБОТИ

Проведення аналізу складається з кількох етапів:

1. Осадження білків. У центрифужні пробірки вносять по 0,5 мл сироватки крові та 0,5 мл розчину оцтової кислоти, пробірки закривають пробками та поміщають їх у холодну водяну лазню. Воду в лазні доводять до кипіння. Зразки кип'ятять протягом 5 хв (з початку кипіння води). Потім пробірки охолоджують.

2. Фільтрування. До вмісту пробірок додають по 1 мл дистильованої води, перемішують та фільтрують розчин у мірну пробірку на 10 мл. Центрифужну пробірку та фільтр змивають ще 2 рази, кожний раз по 1 мл дистильованої води.

3. Реакція з нінгідриним. До фільтрату додають 0,5 мл розчину нінгідрину. Вміст пробірок перемішують та проводять інкубацію у водяній лазні, що кипить, протягом 20 хв. Після інкубації пробірки охолоджують у холодній воді. Після 5 хв перебування зразків при кімнатній температурі розчин у пробірках доводять дистильованою водою до 10 мл. Паралельно ставлять контрольну та стандартну проби. Контрольна проба: до 3 мл дистильованої води додають 0,5 мл розчину оцтової кислоти та 0,5 мл розчину нінгідрину, після перемішування кип'ятять 20 хв. Далі контрольні зразки обробляють як дослідні.

4. Колориметрія. Щільність зразків вимірюють на ФЕКі при зеленому світлофільтрі (540 нм) у 5 мм кюветі. Результати зрівнюють із аналогічними даними контрольного зразку та води.

5. Розрахунки проводять за формулою зі використанням отриманих даних екстинкції дослідної та стандартної проб:

$$\begin{aligned} E_{\text{дос}} - C_{\text{дос}} \\ E_{\text{ст}} - C_{\text{ст}} \\ C_{\text{дос}} = (E_{\text{дос}} C_{\text{ст}}) / E_{\text{ст}}, \end{aligned}$$

де $E_{\text{дос}}$ та $E_{\text{ст}}$ – значення екстинкцій дослідної та стандартної проб;

$C_{\text{ст}}$ – кількість мкг N (Нітрогену) у 0,5 мл стандартного розчину аланіну. Стандартний розчин аланіну з концентрацією 12,86 мг/100 мл містить 64 мкг аланіну у 0,5 мл. Молекулярна вага аланіну – 90 Да, одна молекула названої амінокислоти містить 1 атом Нітрогену (14 Да). Із відношення $90/14 = 6,4$ можна визначити, що 64 мкг аланіну мають 10 мкг Нітрогену.

0,5 мл стандартного розчину аланіну обробляють так само, як сироватку крові. Для переведення результатів у г/л кількість мкг Нітрогену помножують

на 2000 (для перерахування мкг азоту на 1 л біологічної рідини) та ділять на 10^6 (для переведення мкг у г). Отже, якщо використовувалось 0,5 мл сироватки крові, то кінцева формула має наступний вигляд:

$$X \text{ г/л} = C_{\text{дос}} \cdot 0,002, \text{ або}$$

$$X \text{ г/л} = C_{\text{дос}} / 500,$$

де X – кількість Нітрогену у сироватці крові (г/л); $C_{\text{дос}}$ – кількість Нітрогену (мкг) у 0,5 мл сироватки крові.

У нормі концентрація Нітрогену у сироватці крові складає 0,020-0,050 г/л.

Зробити висновок.

Контрольні питання:

1. Перелічити кінцеві продукти розкладу білків та описати шляхи їх утворення.
2. Назвіть небілкові нітрогенні сполуки крові та їх біологічне значення.
3. Біологічне та клініко-діагностичне значення визначення амінного нітрогену.
4. У чому полягає принцип методу визначення кількості амінного нітрогену?
5. Опишіть послідовність визначення амінного нітрогену у біологічних рідинах.

Лабораторна робота №13 «Дослідження властивостей нуклеопротейдів та нуклеотидів»

Нуклеїнові кислоти – це біополімери, мономерними ланками яких є нуклеотиди. У живих організмах нуклеїнові кислоти входять до складу нуклеопротейдів.

Нуклеопротейди – комплекси білка, які є складовими елементами ядер живих клітин та вірусів. Зв'язок білка, який має основні властивості, з молекулами нуклеїнової кислоти (НК) відбувається за рахунок солеподібних та водневих зв'язків і легко руйнується шляхом солевої коагуляції. У результаті цього НК можуть бути виділені у чистому вигляді.

Нуклеотидами називають природні чи синтетичні сполуки, у яких гідроксили вуглеводного залишку етерифіковані однією або декількома фосфатними групами.

Нуклеозиди – природні чи синтетичні сполуки, молекули яких складаються з пуринової чи піримідинової основи, зв'язаної N-глікозидним зв'язком з залишком D-рибози чи 2-дезоксид-рибози. Важливу роль у встановленні будови НК відіграє реакція гідролізу, яка може відбуватися згідно приведенної схеми:

Нуклеопротейд → Нуклеїнова кислота (+ Білок) → Нуклеотид →
Нуклеозид (+H₃PO₄) → Пурини + Піримідини + Пентози

Молекули НК усіх типів живих організмів – це довгі нерозгалужені полімери нуклеотидів. Роль містка між нуклеотидами виконує 3,5-фосфодіефірний зв'язок, який поєднує 5-фосфатний залишок одного нуклеотиду і 3-гідроксильний залишок вуглеводної частини наступного ланцюга. Тому ланцюг є полярним.

Даний тип зв'язку відбиває "первинну структуру" нуклеїнових кислот.

Нуклеїнові кислоти класифікують на 2 типи:

1 – дезоксирибонуклеїнові кислоти (ДНК), з яких при повному гідролізі можна виділити аденін, гуанін, цитозин, тимін, дезоксирибозу і фосфорну кислоту;

2 – рибонуклеїнові кислоти (РНК), які гідролізуються до аденіну, гуаніну, цитозину, урацилу, рибози и фосфорної кислоти.

Нуклеїнові кислоти у клітині знаходяться у вигляді нуклеопротейдних комплексів, які розглядаються як складні білки, простетичною групою яких є нуклеїнові кислоти.

Мета роботи: дослідити властивості нуклеопротейдів та нуклеотидів.

Принцип методу: для якісного аналізу хімічного складу нуклеопротейдів був використаний гідролізат дріжджів як об'єкт, багатий на нуклеопротейди. При частковому гідролізі нуклеопротейди розпадаються на білок (протаміни чи гістони) та нуклеїнові кислоти. При повному гідролізі нуклеопротейдів можуть бути виявлені: поліпептиди (біуретова реакція), пуринові основи (дають специфічну реакцію із залишками солей срібла); фосфорну кислоту виявляють молібдатом амонію, рибозу чи дезоксирибозу – за реакції "срібного дзеркала", з реактивом Фелінга чи пробую Тромера.

Обладнання та реактиви: колба, зворотній холодильник, водяна лазня, воронка, паперовий фільтр, пробірки, терези, піпетка мірка на 1 мл, пекарські дріжджі; сірчана кислота (10 % водний розчин); гідроксид натрію (10 % водний розчин); гідроксид натрію (30 % водний розчин); сульфат купруму (1 % водний розчин); сульфат купруму (7 % водний розчин); аміак (концентрований розчин); молібденова рідина.

ХІД РОБОТИ

Проведення аналізу складається з кількох етапів:

1. Проведення гідролізу: в колбу вносять 0,5 г пекарських дріжджів, приливають 4 мл 10% розчину сульфатної кислоти і кип'ятять на водяній лазні 1 годину. Колбу охолоджують і вміст фільтрують через складчастий фільтр. Фільтрат ділять на 4 частини.

2. Проведення біуретової реакції: до 0,5 мл гідролізату додають 10 крапель розчину гідроксиду натрію (10 %) до лужного середовища і 2 краплі розчину сульфату купруму.

Аналітичний ефект: суміш забарвлюється у фіолетовий колір.

3. Проведення проби Тромера на рибозу та дезоксирибозу: до 0,5 мл гідролізату 10 крапель розчину гідроксиду натрію (30 %) і 2 – 3 краплі розчину сульфату купруму (7 %). Суміш перемішують і нагрівають.

Аналітичний ефект: через 3-5 хв утворюється жовтий осад сполук купруму (I).

4. Проведення реакції на фосфорну кислоту: до 20 мл молібденової рідини додають 3-4 краплі гідролізату та кип'ячать на спиртівці.

Аналітичний ефект: через 3-5 хв випадає лимонно-жовтий осад, який утворює лимонно-жовту суміш.

Отримані результати представити у вигляді таблиці:

Реагент	Біуретова реакція	Проба Тромера	Молібденова рідина
Аналітичний ефект			

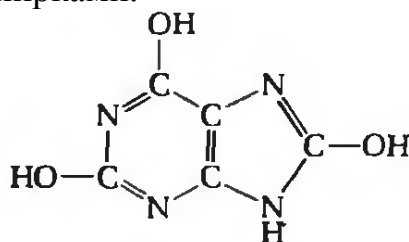
Зробити висновок.

Контрольні питання:

1. Дайте визначення поняттям: нуклеопротейди, нуклеїнові кислоти, нуклеотиди, нуклеозиди, азотисті основи.
2. Напишіть структурні формули пуринових і піримідинових основ.
3. Дайте характеристику білкам, що утворюють комплекси із нуклеїновими кислотами.
4. У чому полягає принцип методу якісного аналізу хімічного складу нуклеопротейдів?
5. Які якісні реакції використовують для дослідження властивостей нуклеотидів і нуклеопротейдів?

Лабораторна робота №14 «Кількісне визначення сечової кислоти у біологічних рідинах за Бенедиктом»

Сечова кислота, що утворюється в результаті розпаду пуринових основ, у вигляді розчину виділяється нирками.



Структура сечової кислоти

У нормі в людини із сечею виділяється 1,60-3,54 ммоль/добу (270-600 мг/добу) сечової кислоти. Нормальний вміст сечової кислоти в сироватці крові становить для чоловіків – 240-530 мкмоль/л (0,05-0,06 г/л), для жінок приблизно на 25 % менше – 185-440 мкмоль/л (0,04-0,05 г/л). Гіперурикемія – зростання концентрації сечової кислоти у крові, гіперурикурія (гіперурикурія) – збільшення вмісту сечової кислоти у сечі. Гіперурикемія викликає подагру, захворювання, що виникає за умов преципітації уратів у тканинах, у першу

чергу, в суглобах. Сечова кислота та її солі надзвичайно погано розчиняються у воді, нормальні концентрації їх в рідинах організму наближені до межі розчинності. Для лікування подагри використовують препарати, що гальмують утворення сечової кислоти (алопуринол) або стимулюють виведення її нирками (антуран, цинхофен). У хворих на подагру значення концентрації сечової кислоти у крові майже завжди перевищує 0,075-0,080 г/л, а під час утворення у них подагричних ущільнень вміст її рідко буває нижчим ніж 0,08-0,09 г/л.

Мета роботи: визначити кількість сечової кислоти у біологічних рідинах.

Дослід 1. Кількісне визначення сечової кислоти у сироватці крові.

Принцип методу: сечова кислота відновлює фосфатовольфраматний реактив з утворенням сполуки блакитного кольору, оптична густина якої за довжини хвилі 640 нм є пропорційною концентрації сечової кислоти у сироватці крові.

Обладнання та реактиви: сироватка або плазма крові, 10 % розчин натрію дигідрогенвольфрамат дигідрату, 10 % розчин натрію карбонату, 0,35 М розчин сульфатної кислоти, фосфатовольфраматний реактив (реактив Фоліна), 30 мкМ розчин сечової кислоти, піпетки, пробірки, центрифуга.

ХІД РОБОТИ

У центрифужну пробірку вносять 0,5 мл сироватки крові та 4 мл дистильованої води. Вміст пробірки перемішують і додають 0,25 мл 0,35 М розчину сульфатної кислоти та 0,25 мл 10 % розчину натрію дигідрогенвольфрамат дигідрату. Вміст пробірки перемішують і через 5 хв центрифугують протягом 10 хв за швидкості 3000 об/хв.

Вміст пробірок перемішують. Через 30 хв визначають оптичну густину стандартної та дослідних проб за довжини хвилі 640 нм (590-700 нм, червоний світлофільтр) проти контрольної проби у кюветі затовшки 10 мм. Забарвлення є стабільним протягом 30 хв.

Розрахунок вмісту сечової кислоти проводять за формулою:

$$C = \frac{A_{\text{досл}}}{A_{\text{станд}}} \cdot 30 \cdot 10,$$

де: C – вміст сечової кислоти у дослідній пробі, мкмоль/л;

$A_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби;

$A_{\text{станд}}$ – оптична густина стандартної проби;

30 – вміст сечової кислоти у стандартному розчині, мкмоль/л;

10 – величина розведення сироватки.

У чоловіків вміст сечової кислоти у сироватці крові становить 240-500 мкмоль/л, у жінок – 160-400 мкмоль/л.

Зробити висновок.

Дослід 2. Кількісне визначення сечової кислоти у сечі.

Принцип методу: метод ґрунтується на здатності сечової кислоти відновлювати фосфатвольфраматний реактив до фосфатвольфраматного синього, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту сечової кислоти. Кількість фосфатвольфраматного синього визначають шляхом титрування червоною кров'яною сіллю. Остання окиснює фосфатвольфраматний синій і синє забарвлення зникає.

Обладнання та реактиви: сеча, фосфатвольфраматний реактив Фоліна, 20 % розчин натрію карбонату Na_2CO_3 , 0,01 н розчин калію фериціаніду $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (червона кров'яна сіль), стандартний розчин сечової кислоти (0,5 мг в 1 мл), мікробюретки, колбочки для титрування, піпетки, пробірки.

ХІД РОБОТИ

У першу пробірку приливають 1,5 мл сечі, у другу – 1,5 мл стандартного розчину сечової кислоти. Потім до обох пробірок додають по 1 мл 20 % розчину натрію карбонату і по 1 мл фосфатвольфраматного реактиву Фоліна, змішують і титрують 0,01 н розчином калію фериціаніду до зникнення синього забарвлення.

Вміст сечової кислоти (в міліграмах) у добовій сечі вираховують за формулою:

$$X = \frac{0,75 \text{ Ч В Ч D}}{1,5 \text{ Ч С}}$$

де, 0,75 – кількість сечової кислоти у стандартній пробі, у мг; В – кількість калію фериціаніду, що пішла на титрування дослідної проби сечі, у мл; С – кількість калію фериціаніду, що пішла на титрування стандартної проби сечової кислоти, у мл; D – добовий діурез, у мл.

Коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (ммоль/добу) дорівнює 0,0059.

Зробити висновок.

Контрольні питання:

1. Шляхи утворення сечової кислоти у різних живих організмах.
2. Напишіть структурну формулу сечової кислоти.
3. У чому полягає принцип методу кількісного визначення сечової кислоти?
4. Клініко-діагностичне значення визначення сечової кислоти у біологічних рідинах.

Лабораторна робота №15 «Дослідження властивостей вітамінів (В₁, РР, С, А)»

Вітаміни – це низькомолекулярні органічні сполуки різної хімічної природи, які необхідні у невеликих кількостях для нормальної життєдіяльності організму. Одна з основних функцій вітамінів – це участь у ферментативних реакціях у якості коферментів і, таким чином, забезпечують обмін речовин, ріст і розвиток. Також, вітаміни є важливими компонентами біологічних мембран, низькомолекулярними компонентами

антиоксидантної системи організму. Усі вітаміни розподіляють на два класи: водорозчинні (вітаміни групи В, вітамін С, Р) і жиророзчинні (А, D, Е, К, F), також виділяють окрему групу вітаміноподібних речовин.

Принцип методу: базується на здатності вітамінів утворювати кольорові розчини при взаємодії зі хімічними речовинами.

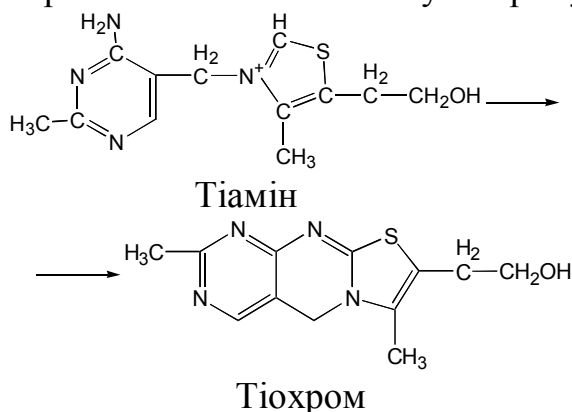
Обладнання та реактиви: хлороформ; HCl (конц.); H₂SO₄ (конц.); рибу'ячий жир; 2,6-дихлорфеноліндофенол; 5 % розчин K₃Fe(CN)₆; 1 % розчин FeCl₃; 10 % розчин оцтової кислоти; 5 % розчин оцтовокислого купрум(II); 10 % розчин гідроксиду натрію; розчин тіаміну; розчин аскорбінової кислоти, ніотинова кислота, терези, стакан хімічний, термометр, скляна воронка, пробірки, паперовий фільтр, крапельниця, водяна лазня.

ХІД РОБОТИ

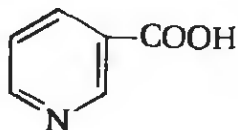
Дослід 1. Реакція окиснення тіаміну в тіохром.

До 1 краплі розчину тіаміну додають 5-10 крапель 10 % розчину гідроксиду натрію і 1-2 краплі 5 % розчину заліzosинеродистого калію і перемішати. При нагріванні рідина забарвлюється у жовтий колір у результаті перетворення тіаміну у тіохром.

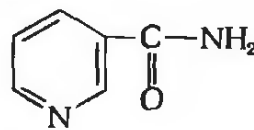
Аналітичний ефект: При дії заліzosинеродистого калію тіамін окиснюється з утворенням жовтого пігменту тіохрому.



Дослід 2. Реакція з ніотиновою кислотою (РР)



Ніотинова кислота (ніацин)



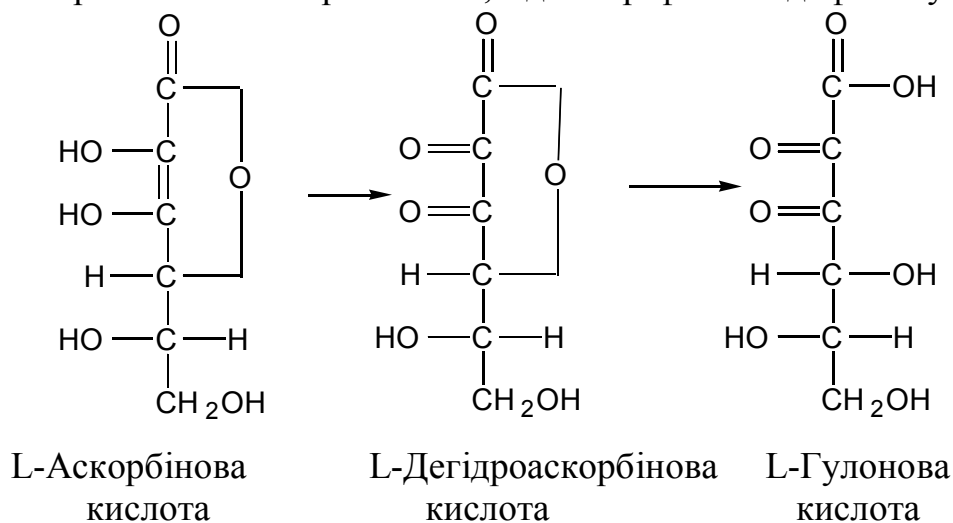
Нікотинамід (ніацинамід)

5-10 мг ніотинової кислоти розчиняють при нагріванні у 10-20 краплях 10 % розчину оцтової кислоти. До нагрітого до кипіння розчину додають рівний об'єм 5 % розчину оцтовокислого купрум(II). Рідина стає мутною, забарвлюється у блакитний колір, а при відстоюванні випадає осад синього кольору.

Аналітичний ефект: розчин ніотинової кислоти з оцтовокислим купрум(II) утворює осад мідної солі ніотинової кислоти.

Дослід 3. Реакція на аскорбінову кислоту з 2,6-дихлорфеноліндофенолом (за Тільмансом)

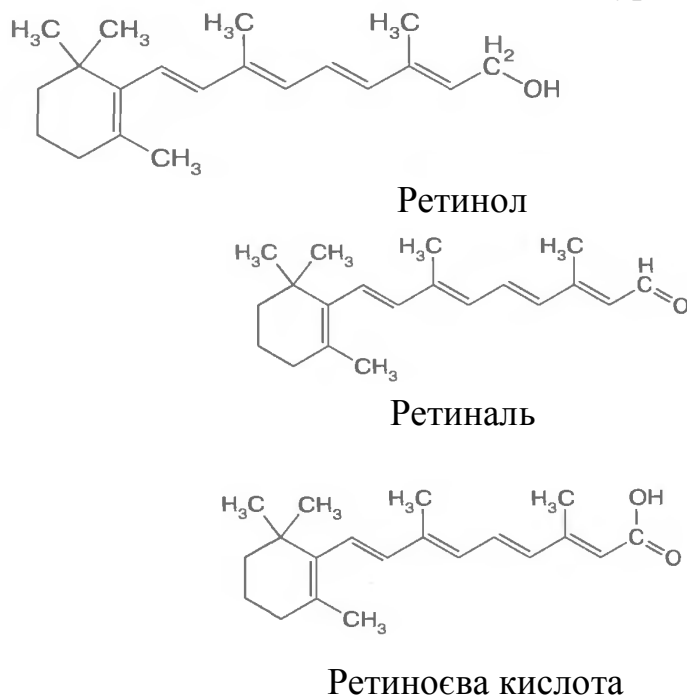
У пробірку з 2,6-дихлорфеноліндофенолом вносять 0,5 мл 0,1 %-го розчину HCl і по краплям – розчин аскорбінової кислоти. Спостерігається знебарвлення 2,6-дихлор-феноліндофенолу.



Дослід 5. Реакція на вітамін А концентрованою сульфатною кислотою

У суху пробірку вносять 1 краплю риб'ячого жиру або розчин ретинолу і 5 крапель хлороформу, перемішують і додають 1 краплю концентрованої сульфатної кислоти.

Аналітичний ефект: при додаванні концентрованої сульфатної кислоти до хлороформної емульсії риб'ячого жиру або ретинолу утворюється червоне забарвлення, яке переходить у червоно-буре.



Оформити звітність про аналітичні ефекти

ПРИКЛАД ТЕСТІВ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАНЬ З БІОХІМІЇ

1. АТФ – енергетична валюта клітини. Високоенергетичні фосфорилізовані сполуки. АТФ-цикл. Хімічні властивості АТФ, гідроліз і величина вільної стандартної енергії гідролізу. НАДН і НАДФН як носії енергії у вигляді відновних еквівалентів. Субклітинна організація метаболізму.

1. Головний хімічний посередник клітини, який пов'язує між собою процеси з виділенням та поглинанням енергії:
 - а) АМР;
 - б) НАД;
 - в) АТФ;
 - г) НАДН.
2. Продукти послідовних стадій гідролізу аденозинтрифосфата:
 - а) АДФ, АМФ;
 - б) НАД, НАДН;
 - в) АМФ;
 - г) всі відповіді вірні.
3. При розщепленні глюкози до лактату утворюється:
 - а) 2 АТФ;
 - б) 1 АТФ;
 - в) 4 АТФ;
 - г) розщеплення проходить без утворення АТФ.
4. Скорочення та розслаблення скелетних м'язів регулюється:
 - а) концентрацією Ca^{2+} в цитозолі;
 - б) концентрацією Ca^{2+} в мітохондріях;
 - в) концентрацією фібрилярного актину;
 - в) АДФ.
5. Постійна концентрація АТФ у м'язах забезпечується:
 - а) креатиніном;
 - б) креатин фосфатом;
 - в) іонами Ca^{2+} ,
 - г) іонами Mg^{2+} .
6. Амінокислоти використовуються для утворення:
 - а) фосфоліпідів;
 - б) АТФ;
 - в) холестерину;
 - г) НАДФ.
7. При відщепленні ортофосфатної групи від АТФ утвориться:
 - а) УТФ;
 - б) АМФ;
 - в) ГТФ;
 - г) АДФ.
8. Стандартна енергія гідролізу АТР у інтактній клітині складає:
 - а) 7,3 ккал/моль;
 - б) 7,3 ккал/моль;
 - в) 12,3 ккал/моль;
 - г) 12,3 ккал/моль.
9. Фермент якого класу забезпечує перетворення АДФ на АТФ
 - а) гідролази;
 - б) ліази;
 - в) кінази;
 - г) протеази.
10. Носії енергії у вигляді відновних еквівалентів:
 - а) ліпіди;
 - б) НАДН і НАДФН;
 - в) АТФ і АМФ;
 - г) ГТФ і УДФ.

2. Гліколітичний шлях. Енергетика гліколізу. Розрахунок кількості вільної стандартної енергії, яку отримує клітина при розкладі однієї молекули глюкози. Регуляція гліколізу. Анаеробні шляхи розщеплення глюкози.

1. Гліколіз:

- а) не має енергетичного значення;
- б) є розпадом глюкози до CO_2 і H_2O ;
- в) є розпадом глікогену до CO_2 і H_2O ;
- г) відбувається в мітохондріях.

2. Продуктами гліколізу в анаеробних умовах є:

- а) CO_2 і H_2O ;
- б) лактат;
- в) етанол і CO_2 ;
- г) Ацетил-КоА.

3. Продуктами гліколізу в апоеробних умовах є:

- а) CO_2 і H_2O ;
- б) лактат;
- в) етанол і CO_2 ;
- г) Ацетил-КоА.

4. Продуктами гліколізу в аеробних умовах є:

- а) CO_2 і H_2O ;
- б) лактат;
- в) етанол і CO_2 ;
- г) Ацетил-КоА.

5. На першому етапі гліколізу відбувається:

- а) затрата 2-х молекул АТФ;
- б) виділення 2-х молекул АТФ;
- в) виділення 4-х молекул АТФ;
- г) затрата 4-х молекул АТФ.

6. На другому етапі гліколізу відбувається:

- а) затрата 2-х молекул АТФ;
- б) виділення 2-х молекул АТФ;
- в) виділення 4-х молекул АТФ;
- г) затрата 4-х молекул АТФ.

7. Перший етап гліколізу закінчується утворенням:

- а) лактату;
- б) пірувату;
- в) гліцеральдегід-3-фосфату;
- г) фосфоенолпірувату.

8. Для активації ферментів гліколізу необхідно:

- а) CO_2 ;
- б) іони Ca^{2+} ;
- в) іони Mg^{2+} ;
- г) всі відповіді вірні.

9. Перетворення 3-фосфогліцероїл фосфат в трифосфогліцерат відбувається за рахунок:

- а) фосфогліцераткінази;
- б) фосфогліцератмутази;
- в) енолази;
- г) D-гліцеральдегідфосфат дегідрогенази.

10. Відновлення пірувату до лактату відбувається за рахунок:

- а) фосфогліцераткіназа
- б) фосфогліцератмутаза
- в) лактатдегідрогеназа
- г) D-гліцеральдегідфосфат дегідрогеназа

3. Робота піруватдегідрогеназного комплексу. Ферменти і коферменти піруватдегідрогеназного комплексу. Регуляція перетворення пірувату в ацетил-КоА.

1. Хвороба бері-бері обумовлена:
 - а) нестачею вітаміну В1;
 - б) надлишком вітаміну В1;
 - в) нестачею вітаміну В6;
 - г) надлишком вітаміну В6.
2. Перетворення пірувату в ацил-КоА регулюється:
 - а) НАДН і АТФ;
 - б) АДФ і НАД;
 - в) кількістю пірувату;
 - г) АМФ і НАД.
3. Піруватдегідрогеназний комплекс включає:
 - а) 5 коферментів;
 - б) 5 ферментів;
 - в) 3 ферменти і 5 коферментів;
 - г) 3 коферментів і 3 ферменти.
4. Піруватдегідрогеназний комплекс включає:
 - а) 7 реакцій;
 - б) 5;
 - в) 6;
 - г) 8.
5. Втрата гідроксильної групи піруватом в піруватдегідрогеназному комплексі відбувається на:
 - а) 1 стадії;
 - б) 2;
 - в) 3;
 - г) 4.
6. Головний фермент другої стадії піруватдегідрогеназного комплексу
 - а) піруватдегідрогеназа;
 - б) дегідроліпоїлацетилтрансфераза;
 - в) дегідроліпоїлацетилдегідрогеназа;
 - г) дегідроліпоїлдегідроредуктаза.
7. Головний фермент четвертої стадії піруватдегідрогеназного комплексу:
 - а) піруватдегідрогеназа;
 - б) дегідроліпоїлацетилтрансфераза;
 - в) дегідроліпоїлацетилдегідрогеназа;
 - г) дегідроліпоїлдегідроредуктаза.
8. На 5-му етапі піруватдегідрогеназного комплексу утворюється:
 - а) НАД;
 - б) НАДФ;
 - в) НАДН;
 - г) ФАД.
9. На якій стадії піруватдегідрогеназного комплексу утворюється дітіолова форма ліпоїльних груп:
 - а) 1 стадія;
 - б) 2;
 - в) 3;
 - г) 4.
10. Ключова кислота піруватдегідрогеназного комплексу:
 - а) ліпоїва;
 - б) лимона;
 - в) бурштинова;
 - г) немає правильної відповіді.

4. Реакції та ферменти циклу ЦТК. Біологічна доцільність циклу. Використання проміжних продуктів ЦТК в метаболізмі організму.

1. Скільки стадій ЦТК:

- а) 6;
- б) 7;
- в) 8;
- г) 9.

2. Енергетичний вихід ЦТК:

- а) 12 АТФ;
- б) 24;
- в) 32;
- г) 36.

3. Фермент, що лімітує загальну швидкість ЦТК:

- а) сукцинатсинтаза;
- б) цитратсинтаза;
- в) ізоцитратдегідрогеназа;
- г) α -кетоглутаратдегідрогеназа.

4. Цикл Кребсу:

- а) є перетворенням ацетил-КоА ;
- б) є перетворенням ацил-КоА;
- в) не має енергетичного значення;
- г) каталізується ферментами шостого класу.

5. Швидкість ЦТК зменшується при збільшенні концентрації:

- а) АТФ і НАДН;
- б) АДФ;
- в) сукциніл-КоА;
- г) НАД^+ .

6. ЦТК протікає:

- а) в мітохондріях;
- б) в цитозолі;
- в) на поверхні гладкого ендоплазматичного ретикулюма;
- г) на поверхні шорсткого ендоплазматичного ретикулюма.

7. Скільки незворотних реакцій в ЦТК:

- а) 2;
- б) 3;
- в) 4;
- г) немає правильної відповіді.

8. Перетворення сукцинату на фумарат відбувається з виділенням:

- а) НАД^+ ;
- б) ФАД;
- в) ФАДН_2 ;
- г) НАДН

9. При кожному оберті з циклу Кребса виводиться:

- а) 2 АТФ;
- б) 2 CO_2 ;
- в) 4 АТФ;
- г) 4 CO_2 .

10. На утворення 1 мол. цитрату витрачається:

- а) 1 ізоцитрат;
- б) 2 ізоцитрати;
- в) 1 оксалоацетат;
- г) 2 оксалоацетати.

5. Тканинне дихання. Ланцюг перебігу електронів – система окислювально-відновних реакцій. Окислювальне фосфорилування.

1. Фермент, що передає на O_2 електрони:

- а) убіхінон;
- б) цитохромоксидаза;
- в) цитохромсинтаза;
- г) цитохромдегідрогеназа.

2. Процес переносу електронів супроводжується:

- а) зниженням вільної енергії;
- б) збільшенням вільної енергії;
- в) вільна енергія залишається сталою;
- г) вільна енергія = 0.

3. Запас енергії відбувається в результаті синтезу:

- а) АДФ;
- б) НАДН;
- в) АТФ;
- г) НАД.

4. Процес переносу електронів знижується при:

- а) зниженні АДФ;
- б) збільшенні АДФ;
- в) зниженні АТФ;
- г) збільшенні АТФ.

5. Процес переносу електронів блокується:

- а) цитохромом с;
- б) цитохромом в;
- в) убіхіноном;
- г) ціанідом.

6. При повному окисненні глюкози утворюється:

- а) 32 АТФ;
- б) 34;
- в) 36;
- г) 38.

7. Дихальний ланцюг:

- а) система оксидоредуктаз;
- б) система лігаз;
- в) система каталаз;
- г) не ферментативна система.

8. Окислювальне фосфорилування протікає:

- а) на внутрішній мітохондріальній мембрані;
- б) на зовнішній мітохондріальній мембрані;
- в) у цитозолі;
- г) на ендоплазматичному ретикулюмі.

9. Сумарне рівняння перебігу електронів у мітохондрії:

- а) $НАДН + H^+ + 1/2O_2 = H_2O$;
- б) $НАДН + H^+ = H_2O + НАД^+$;
- в) $НАДН + H^+ + 1/2O_2 = H_2O + НАД^+$;
- г) $НАДН + H^+ + 1/2O_2 = H_2O + НАД^+ + АТФ$.

10. Кінцевий акцептор електронів у аеробів:

- а) вода;
- б) кисень;
- в) цитохром а;
- г) немає правильної відповіді.

6. Бета-окиснення жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю. Розрахунки кількості АТФ, яка утворюється з однієї молекули жирної кислоти. Окиснення жирних кислот з подвійними зв'язками.

1. Триацилгліцерол окислюється

до:

- а) CO_2 і H_2O ;
- б) спирту і жирних кислот;
- в) ацетил-КоА;
- г) кетонових тіл.

2. Активація та окиснення жирних кислот відбувається:

- а) у цитозолі;
- б) мітохондріях;
- в) на мембрані;
- г) в рибосомах.

3. На першій стадії окиснення жирів утворюється:

- а) ацетил-КоА і АТФ;
- б) CO_2 і H_2O ;
- в) КоА-SH і АТФ;
- г) АТФ і H_2O .

4. Фермент, що каталізує перетворення цис D^3 еноіл-КоА в транс D^2 еноіл-КоА:

- а) епімераза;
- б) КоА-ізомераза;
- в) еноіл-КоА-гідратаза;
- г) син таза.

5. Вітамін для розщеплення жирів з непарною кількістю С:

- а) В6;
- б) В12;
- в) В3;
- г) В1.

6. Сполука, що пригнічує окиснення жирних кислот:

- а) дофамін;
- б) гіпогліцин;
- в) інсулін;
- г) нікотин.

7. Регуляція процесу окиснення жирних кислот відбувається за допомогою:

- а) карнітинацилтрансферази;
- б) еноіл-КоА-гідратази;
- в) сукцинатсинтази;
- г) немає правильної відповіді.

8. Один ацил-КоА відповідає:

- а) 6 АТФ;
- б) 12;
- в) 24;
- г) 36.

9. При окисненні арахідонової кислоти утвориться:

- а) 120 АТФ;
- б) 156;
- в) 165;
- г) 174.

7. Біосинтез ліпідів. Процеси елонгації пальмітоїл-СоА, денатурація жирних кислот в тваринних та рослинних організмах. Незамінні жирні кислоти. Синтез арахідонової кислоти та її похідних.

1. Попередниками лейкотрієнів, простогландинів і тромбоксанів є
а) насичені жирні кислоти;
б) ненасичені;
в) незамінні;
г) ізопреноїди.

2. Продукти окислення жирних кислот у пероксисомах:
а) ацетил- КоА і H_2O_2 ;
б) CO_2 і H_2O ;
в) ацетил-КоА і АТФ;
г) кетоніві тіла.

3. До незамінних жирних кислот відносять:
а) лінолева, ліноленова, арахідонова;
б) арахісова, арахідонова, лінолева;
в) олеїнова, арахідонова, арахісова;
г) всі ненасичені кислоти.

4. У клітинах самостійне омилення ліпідів інгібується вітаміном:
а) А;
б) В;
в) Е;
г) Д.

5. Яка з кислот в організмі може перетворюватися на арахідонову:
а) ліноленова;
б) лінолева;
в) олеїнова;
г) всі ненасичені кислоти.

6. Арахідонова кислота утворюється за результатом дегідрування:
а) лецитину;
б) ейкозатрієну;
в) сукцинату;
г) фосфатидилінозитулу.

7. Перетворення арахідонової кислоти в простогландини відбувається за:
а) ліпоксигеназним шляхом;
б) циклооксигеназним;
в) пентозофосфатним;
г) немає правильної відповіді.

8. Перетворення арахідонової кислоти в лейкотрієни відбувається за:
а) ліпоксигеназним шляхом;
б) циклооксигеназним;
в) пентозофосфатним;
г) немає правильної відповіді.

9. Утворення простогландинів та лейкотрієнів відбувається під дією:
а) циклооксигенази;
б) циклооксидегідрогенази;
в) десатурази;
г) елонгази.

10. Лейкотрієни утворюються лише під дією:
а) 2-ліпоксигенази;
б) 3-ліпоксигенази;
в) 4-ліпоксигенази;
г) 5-ліпоксигенази.

8. Шлях глюконеогенезу. Енергетичні витрати глюконеогенезу. Порівняння з гліколітичним шляхом. Пентозофосфатний шлях окислення глюкози.

1. Фермент що перетворює піруват на оксалоацетат:
 - а) піруваткарбоксилаза;
 - б) піруватсинтаза;
 - в) піруваткіназа;
 - г) фосфоенолпіруваткарбоксилаза.
2. Без якого з зазначених вітамінів неможлива реакція утворення оксалоацетату з пірувату:
 - а) піридоксаль;
 - б) нікотинамід;
 - в) піридоксамін;
 - г) біотин.
3. Функція пентозофосфатного шляху полягає в утворенні:
 - а) НАДФН;
 - б) АТФ;
 - в) фруктози та рибози;
 - г) НАД.
4. Ферменти пентозофосфатного шляху локалізовані в:
 - а) мітохондріях;
 - б) цитозолі;
 - в) на мембрані;
 - г) у полісомах.
5. Пентозофосфатний шлях на відміну від гліколізу:
 - а) генерує АТФ;
 - б) не генерує АТФ;
 - в) не утворюється CO_2 ;
 - г) окислення за рахунок НАД.
6. Глюконеогенез забезпечує утворення:
 - а) холестерину;
 - б) пірувату;
 - в) глюкози;
 - г) фруктози.
7. Каталізує реакцію перетворення оксалоацетату в фосфоенолпіруват:
 - а) піруваткарбоксилаза;
 - б) фосфоенолпіруватсинтаза;
 - в) фосфоенолпіруваткіназа.
 - г) фосфоенолпіруваткарбоксилаза.
8. Для реакції перетворення оксалоацетату в фосфоенолпіруват необхідні:
 - а) АДФ, УДФ;
 - б) АТФ, УДФ;
 - в) ГТФ, ІТФ;
 - г) ГТФ, УДФ.
9. Пентозофосфатний шлях постачає в еритроцити:
 - а) НАДФН;
 - б) АТФ;
 - в) рибозу;
 - г) НАД.
10. Пентозофосфатний шлях складається з:
 - а) двох фаз;
 - б) трьох;
 - в) п'яти;
 - г) восьми.

9. Виведення амінного азоту з організму. Реакції циклу сечовини. Механізми виведення аміаку з різних організмів.

1. Азот в організмі людини накопичується найбільше є у складі:
 - а) моноцукрів;
 - б) пігментів;
 - в) сечовини;
 - г) порфіринів.
2. Амінний азот транспортується у печінку у складі:
 - а) глютаміну;
 - б) глутатіону;
 - в) глютамату;
 - г) немає правильної відповіді.
3. Амінний азот у риб виводиться з організму у складі:
 - а) сечовини;
 - б) сечової кислоти;
 - в) аміаку;
 - г) немає правильної відповіді.
4. У тварин аміак транспортується у печінку з м'язів у вигляді:
 - а) глютаміну;
 - б) глутатіону;
 - в) глютамату;
 - г) аланіну.
5. У циклі сечовини задіяні:
 - а) 3 моля АТФ і 5 ферментів;
 - б) 3 АТФ і 6 ферментів;
 - в) 2 АТФ і 5 ферментів;
 - г) 2 АТФ і 6 ферментів.
6. Амінний азот у птахів виводиться з організму у вигляді:
 - а) сечовини;
 - б) сечової кислоти;
 - в) аміаку;
 - г) немає правильної відповіді
7. Амінний азот у людини виводиться з організму у вигляді:
 - а) сечовини;
 - б) сечової кислоти;
 - в) аміаку;
 - г) немає правильної відповіді.
8. Амінокислота, що не приймає участі в циклі сечовини:
 - а) L-цитрулін;
 - б) N-ацетилглютаMAT;
 - в) L-аргінін;
 - г) L-орнітин.
9. Скільки амінокислот задіяні в циклі сечовини:
 - а) 5;
 - б) 6;
 - в) 7;
 - г) 8.
10. В ході циклу сечовини постійно потребується:
 - а) CO₂, АТФ, цитрулін;
 - б) CO₂, АТФ, аргінін;
 - в) CO₂, АТФ, аспартат;
 - г) CO₂, АТФ, орнітин.

10. Регуляція біосинтезу жирних кислот. Біосинтез триацилгліцеролів, фосфоліпідів. Генетичні дефекти ліпідного обміну. Біосинтез холестеролу та стероїдів. Принципова схема біосинтезу ізопреноїдів.

1. Біосинтез ліпідів починається з утворення:
 - а) двохвуглецевих продуктів;
 - б) трьох вуглецевих;
 - в) чотирьох вуглецевих;
 - г) п'ятивуглецевих.
2. Синтазна система, що каталізує утворення жирної кислоти має:
 - а) 5 активних центрів;
 - б) 6;
 - в) 7;
 - г) 8.
3. Приєднання кожного двохвуглецевого фрагменту в біосинтезі жирної кислоти включає:
 - а) три етапи;
 - б) чотири;
 - в) п'ять;
 - г) шість.
4. Швидкість біосинтезу жирних кислот залежить від:
 - а) ацетил-КоА-карбоксилази;
 - б) гліцеролфосфатацилтрансферази;
 - в) фосфатидатфосфатази;
 - г) розщеплення АТФ.
5. Перетворення вуглеводів у триацилгліцерол стимулюється:
 - а) валіном;
 - б) інсуліном;
 - в) вазопресином;
 - г) адреналіном.
6. Для біосинтезу фосфоліпідів необхідним є:
 - а) валін;
 - б) холін;
 - в) АТФ;
 - г) немає правильної відповіді.
7. При хворобі Німана-Піка сфінгомієлін накопичується в:
 - а) мозку, кістках;
 - б) мозку, м'язах;
 - в) мозку, печінці;
 - г) мозку, жировій тканині.
8. Біосинтез холестеролу інгібується потраплянням з їжею:
 - а) холестерину;
 - б) вуглеводів;
 - в) вітаміну В;
 - г) вітаміну А.
9. Холестерол синтезується з
 - а) пірувату;
 - б) ацетил-КоА;
 - в) ацетофосфату;
 - г) немає правильної відповіді.
10. Попередником ізопреноїдів є:
 - а) пірофосфат;
 - б) ізопентенілпірофосфат;
 - в) ацетил-КоА;
 - г) поліпrenoли.

11. Перетворення білків у шлунково-кишковому тракті. Транспортні системи для амінокислот. Розклад амінокислот. Реакції декарбоксілювання, утворення нейромедіаторів (біогенних амінів). Реакції дезамінування, трансамінування. Обмін амінокислот між органами.

1. До супернезамінних амінокислот людини відносять:
 - а) Ліз, Тир;
 - б) Вал, Лей;
 - в) Ліз, Три;
 - г) Лей, Три.
2. Перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті забезпечує:
 - а) амілаза;
 - б) трипсин;
 - в) пепсин;
 - г) всі відповіді вірні.
3. Попередником глутаміну є:
 - а) L-кетоглутарат;
 - б) глутатіон;
 - в) сукцинат;
 - г) піруват.
4. Попередником аланіну є:
 - а) L-кетоглутарат;
 - б) глутатіон;
 - в) сукцинат;
 - г) піруват.
5. Глутаматдегідрогеназа інгібується:
 - а) АТФ, НАДН;
 - б) АДФ, НАДН;
 - в) УДФ, НАД;
 - г) УДФ, АТФ.
6. Глутаматдегідрогеназа стимулюється:
 - а) АТФ, НАДН;
 - б) АДФ, НАДН;
 - в) УДФ;
 - г) УДФ, АТФ.
7. Реакцію утворення аміаку каталізує:
 - а) глутаміназа;
 - б) трансфераза;
 - в) мутаза;
 - г) аланінсинтаза.
8. Понад 50 % аміаку припадає на:
 - а) аланін, валін;
 - б) аланін, серин;
 - в) аланін, глутамін;
 - г) аланін, аспартат.
9. Більшість амінокислот є субстратами:
 - а) гексокіназ;
 - б) мутаза;
 - в) синтаз;
 - г) трансаміназ.
10. Окислювальне дезамінування здійснюється за допомогою:
 - а) гексокіназ;
 - б) мутаза;
 - в) синтаз;
 - г) трансаміназ.

12. Катаболізм вуглецевого скелету амінокислот, поняття про глікогенні та кетогенні амінокислоти. Шляхи розкладу амінокислот. Біологічна роль амінокислот в утворенні життєвоважливих сполук – нейромедіаторів, пігментів, нуклеїнових кислот, креатину та ін.

1. Вуглецевий скелет глутамату є попередником:

- а) Arg, Gln, Pro, His;
- б) Ile, Met, Val;
- в) Tyr, Phe;
- г) Asn.

2. Сукциніл-КоА є попередником:

- а) Arg, Gln, Pro, His;
- б) Ile, Met, Val;
- в) Tyr, Phe;
- г) Asn.

3. Фумарат є попередником:

- а) Arg, Gln, Pro, His;
- б) Ile, Met, Val;
- в) Tyr, Phe;
- г) Asn.

4. Аспартат є попередником:

- а) Arg, Gln, Pro, His;
- б) Ile, Met, Val;
- в) Tyr, Phe;
- г) Asn.

5. Гемоглобін це:

- а) порфірин зв'язаний з білком глобіном;
- б) дихальний пігмент;
- в) пігмент, що бере участь у фотосинтезі;
- г) переносник електронів.

6. Міоглобін:

- а) порфірин зв'язаний з білком глобіном;
- б) дихальний пігмент;
- в) пігмент, що бере участь у фотосинтезі;
- г) переносник електронів.

7. Хлорофіл це:

- а) порфірин, що зв'язаний з білком глобіном;
- б) дихальний пігмент;
- в) пігмент, що бере участь у фотосинтезі;
- г) переносник електронів.

8. Цитохром це:

- а) порфірин, що зв'язаний з білком глобіном;
- б) дихальний пігмент;
- в) пігмент, що бере участь у фотосинтезі;
- г) переносник електронів.

9. Гем ферментативно перетворюється на:

- а) окиси вуглецю;
- б) білірубін;
- в) порфірин;
- г) немає правильної відповіді.

10. Амінокислоти, що утворюють ацетоацетил-КоА:

- а) Arg, Gln, Pro, His;
- б) Ile, Met, Val;
- в) Tyr, Phe;
- г) Tyr, Phe, Leu, Lys, Trp.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Delvin, T. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations [Текст]/ T. Delvin – Willey-Liss, Inc., 1992.
2. Nelson D.L., Cox M. M. Lehninger. Principles of biochemistry [Текст]/fifth edition/ D.L. Nelson – W.H. Freeman and Company, New York. – 2010.
3. Албертс, Б. Молекулярная биология клетки [Текст]: в 3-х т./ Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, Дж. Уотсон – М: Мир, 1994.
4. Биохимия [Текст]: сборник задач и упражнений – Киев: Вища школа, 1988.
5. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення [Текст]/ За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004.
6. Боечко, Ф.Ф. Біохімія [Текст]/ Ф.Ф. Боечко – К: Вища школа, 1995.
7. Гонський Я.І. Біологічна хімія: лабораторний практикум [Текст].- Тернопіль: Укрмедкнига, 2001.
8. Губський Ю.І. Біологічна хімія [Текст]/ Ю.І. Губський – Київ, Тернопіль: Укрмед-книга, 2000.
9. Кононский, А. И. Биохимия животных [Текст]/ А.И. Кононский – К: Вища школа, 1984
10. Ленинджер, А. Основы биохимии [Текст]: в 3 т./ А. Ленинджер – М: Мир, 1985.
11. Марри, Р. Биохимия человека [Текст]: в 2-х т./ Р. Марри – М Мир, 1993.
12. Мецлер, Д. Биохимия [Текст]: в 3-х т./ Д. Мецлер – М: Мир, 1980.
13. Практикум з біологічної хімії [Текст]/ За ред. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2002.
14. Ситуаційні задачі та тести з біологічної хімії: Посібник для студентів [Текст]/ За ред. проф. Склярова О.Я. – Львів: Світ, 2006.
15. Сухаренко, О.В. Біохімія. Лабораторний практикум завдання модульного контролю : навч. посібник для студентів вищ. навч. закладів [Текст] / О.В., Сухаренко, В.С. Недзвецкий // – К: Видавництво Ліра-К, 2014 . – 196 с.
16. Филлипович, Ю.Б. Упражнения и задачи по биологической химии [Текст]/ Ю.Б. Филлипович, Г.А. Севастьянова, Л.И. Щеголева – М: Просвещение, 1986.
17. Штеменко, Н.І. Органічна хімія та основи статичної біохімії [Текст]/ Н.І. Штеменко, З.Ф. Соломко, В.І. Авраменко – Д: РВВ ДНУ, 2004 – 686с.

ЗМІСТ

Програма навчальної дисципліни «Біохімія»	3
Техніка безпеки у біохімічній лабораторії	6
Лабораторна робота №1. «Кількісне визначення АТФ у тканинах»	8
Лабораторна робота №2. Термолабільність та специфічність амілази слини	10
Лабораторна робота №3. Кількісне визначення глюкози у біологічних рідинах	13
Лабораторна робота №4. Вплив рН середовища на активність амілази слини	18
Лабораторна робота №5. Визначення активності амілази у біологічних рідинах. Уніфікований амілокластичний метод із стійким субстратом (метод Кавея)	20
Лабораторна робота №6. Специфічність дії сахарози дріжджів	22
Лабораторна робота №7. Визначення концентрації лактози в молоці	23
Лабораторна робота №8. Виявлення дії каталази і ксантинооксидази	25
Лабораторна робота №9. Виявлення дії уреазы і пероксидази	27
Лабораторна робота №10. Визначення ліпопротеїдів у плазмі крові. Електрофорез ліпопротеїдів у драглях агарози	30
Лабораторна робота №11. Визначення холестерину за методом Ілька	32
Лабораторна робота №12. Визначення амінного нітрогену	34
Лабораторна робота №13. Дослідження властивостей нуклеопро- теїдів та нуклеотидів	36
Лабораторна робота №14. Кількісне визначення сечової кислоти у біологічних рідинах за Бенедиктом	38
Лабораторна робота № 15. Дослідження властивостей вітамінів (В ₁ , РР, С, А)	40
Приклад тестів для контролю знань з біохімії	43
Список рекомендованої літератури	55