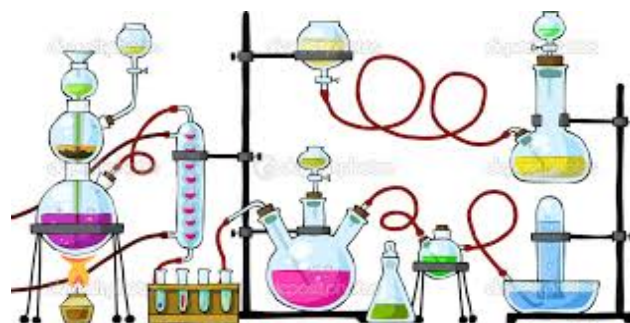


Г.А. Ушакова, О.А. Дёмшина

**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ К УЧЕБНОЙ
ДИСЦИПЛИНЕ «БИОХИМИЯ»**



2015

**Министерство образования и науки Украины
Днепропетровский национальный университет
имени Олеся Гончара**

Г.А. Ушакова, О.А. Дёмшина

**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ К УЧЕБНОЙ
ДИСЦИПЛИНЕ «БИОХИМИЯ»**

**Днепропетровск
Издательство Арбуз
2015**

ББК 616
У 93

Рецензент: д-р биол. наук, проф. О.В. Севериновская
д-р биол. наук, проф. А.И. Шевцова

У 93 Ушакова, Г.О. Лабораторный практикум к учебной дисциплине «Биохимия» [Текст]: / Г.А. Ушакова, О.А. Дёмшина – Д.: Арбуз, 2015. – 61 с.

Приведены основные методические положения для проведения лабораторных работ по дисциплине «Биохимия», также в сжатой форме представлены теоретические данные, контрольные вопросы, тестовые задания для усвоения главных тем по биологической химии.

Изучение данного материала способствует формированию практического умения у студентов проводить биохимические анализы, а также закреплению базовых теоретических знаний по дисциплине «Биохимия».

Для студентов ДНУ имени Олеся Гончара факультета биологии, экологии и медицины. Может быть полезным для студентов естественных и медицинских факультетов.

Учебное пособие

Галина Александровна Ушакова
Ольга Александровна Дёмшина

Лабораторный практикум к учебной дисциплине «Биохимия»

Редактор Г.А. Ушакова
Техредактор О.А. Дёмшина

Напечатано по решению Ученого совета факультета биологии, экологии и медицины ДНУ имени Олеся Гончара от 26.06.15

Подписано к печати 30.09.15 Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная

Усл. печ.лист 3,81. Усл. краскоотб. 3.81 Обл.-изд. лист

Тираж 150 пр. Зам. №

Отпечатано на базе полиграфически-издательского центра «Арбуз»

49018, г. Днепропетровск – 18, а/я № 1212

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

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

I. Учебная программа учебной дисциплины «Биохимия»

Актуальность: Биохимия – это наука, которая изучает химический состав живых организмов, строение, свойства, локализацию и роль содержащихся в них соединений, пути их возникновения и преобразования, а также присущие живой клетке химические процессы, которые в совокупности обеспечивают обмен веществ и превращения энергии.

Благодаря биохимии возможно решение основных вопросов естествознания и медицины, в частности, проблемы синтеза белков, биоэнергетики и др. В биохимических исследованиях используются современные физико-химические, физические и математические методы. Биохимические показатели используются для диагностики, лечения и профилактики заболеваний.

Для улучшения усвоения учебного материала студентам рекомендуется использовать современные учебники и пособия, разработанные ведущими специалистами Украины и мира.

Цель и задачи дисциплины

Целью учебной дисциплины "Биохимия" является формирование у будущего специалиста по биологии фундаментальных знаний химических основ жизни, молекулярных основ физиологических функций органов и систем организма человека, понимания биохимических процессов во всех живых организмах (человека, животных, растений, микроорганизмов).

Достичь этой цели можно путем оптимального сочетания теоретического курса с лабораторными занятиями, на которых теоретические сведения реализуются в процессе лабораторных работ, приобретает способность мыслить категориями биохимической логики.

Задачи.

В течение изучения дисциплины «Биохимия» студенты должны усвоить:

- основы биохимии, современные методы определения химических параметров биологических материалов для оценки функционального состояния тканей и систем организма; лабораторных показателей для диагностики заболеваний;
- механизмы биохимических превращений, происходящих с момента поступления пищевых соединений в организм к образованию конечных продуктов и вывод их из организма; принципы установления взаимосвязи структуры и функции клеток и ткани;
- практические навыки по лабораторной диагностике, лабораторные критерии патологических, компенсаторных, адаптационных реакций и процессов, направленных на восстановление исходного состояния организма.

Конечные цели при изучении учебной дисциплины "Биохимия" связаны с тем, что студент в своей будущей профессиональной деятельности должен уметь:

- анализировать соответствие структуры биоорганических соединений физиологическим функциям, которые они выполняют в организме человека;

- обосновывать особенности физиологического состояния организма и развития патологических процессов на основе лабораторных исследований;
- анализировать реакционную способность углеводов, липидов, аминокислот, протеинов, обеспечивающую их функциональные свойства и метаболические превращения в организме.

Содержание лекций

Тема 1. Введение в биохимию

Предмет и задачи биохимии, ее место среди других медико-биологических дисциплин. Основные отрасли и направления современной биохимии (биохимия статическая и динамическая, функциональная биохимия, молекулярная биология, клиническая биохимия). Основные достижения и перспективы развития биохимии, биотехнологии, генной и клеточной инженерии, с которыми связывают решение проблем диагностики и лечения многих болезней. Развитие биохимической диагностики в Украине. Общие представления о взаимосвязи биохимических систем в организме человека.

Тема 2. Общие понятия о метаболизме. Основы биоэнергетических процессов

Понятия – катаболизм и анаболизм, соотношение этих процессов. АТФ – энергетическая валюта клетки. Высокоэнергетические фосфорилированные соединения. АТФ-цикл. Химические свойства АТФ, гидролиз и величина свободной стандартной энергии гидролиза. НАД и НАДФ, как носители энергии в виде восстановительных эквивалентов. Субклеточная организация метаболизма. Анаэробный и аэробный пути биологического окисления. Принципы двух основных биоэнергетических путей фосфорилирования – субстратный и окислительный. Современные представления о механизме тканевого дыхания. Типы дыхательных цепей (полный, укороченный, короткий). Ингибиторы переноса электронов в дыхательной цепи. Разобщение окисления и фосфорилирования при патологических состояниях.

Тема 3. Обмен углеводов

Превращение углеводов в желудочно-кишечном тракте в норме и при патологии. Транспорт глюкозы через мембрану клеток. Анаэробный распад углеводов (гликолиз, молочно-кислое и спиртовое брожение, распад гликогена). Пентозофосфатный цикл. Превращение глюкозы в глюконовую и аскорбиновую кислоты. Поступление других углеводов в гликолитический путь расщепления. Аэробный путь распада углеводов (преобразование пирувата до ацетил-КоА, цикл трикарбоновых кислот). Энергетика окисления углеводов. Биосинтез углеводов (глюконеогенез, синтез гликогена). Мобилизация гликогена в тканях, роль аденилатциклазной системы. Регуляция метаболизма углеводов (уровни регуляции, реципрокность).

Тема 4. Фотосинтез

Значение процесса фотосинтеза как источника биологической энергии на планете. История открытия. Фотосинтезирующие организмы, световая и темновая фазы, субклеточная организация фотосинтеза. Общее уравнение фотосинтеза.

Световая фаза фотосинтеза. Фотосинтезирующие пигменты (хлорофиллы, каротиноиды, фикобилины), их спектры поглощения. Состав фотосистем 1 и 2, механизм работы.

Темновая фаза фотосинтеза. Цикл Кальвина. Синтез растительных полисахаридов. Метаболизм органических кислот по типу толстянковых. Регуляции темновых реакций. С4 путь фотосинтеза. Фотодыхание. Использование фотосинтезирующих организмов. Искусственный фотосинтез.

Тема 5. Обмен липидов

Окисление жирных кислот в тканях животных. Триацилглицеролы – важнейший источник энергии организма. Распад липидов в желудочно-кишечном тракте. Активация жирных кислот, три этапа активации, попадание жирных кислот в митохондрию. Роль карнитина. Бета-окисление жирных кислот с четным количеством атомов углерода. Реакции и ферменты первой стадии окисления. Реакции дегидрирования, гидратации, второго дегидрирования, тиолитического расщепления. Расчеты количества АТФ и ацетил-КоА, которые образуются на первой стадии. Вторая стадия окисления жирных кислот через цикл лимонной кислоты. Расчеты количества АТФ, которые образуются из одной молекулы жирной кислоты. Окисление жирных кислот с двойными связями. Необходимость дополнительных ферментов. Окисление жирных кислот с нечетным количеством атомов углерода. Синтез кетоновых тел в печени. Регуляция процесса разложения жирных кислот и образование кетоновых тел.

Биосинтез липидов, как активный процесс, который происходит в тканях животных и растений: Биосинтез запасных липидов и постоянное обновление мембранных липидов. Субклеточная локализация процесса. Отличие процесса синтеза жирных кислот от их разложения. Образование малонил-КоА, челночный механизм переноса ацетильных групп из митохондрий в цитозоль. Синтазная система жирных кислот, структура и механизм действия: Конденсация, кетовостановление, дегидратация, насыщение. Процессы элонгации пальмитоил-КоА, десатурация жирных кислот в животных и растительных организмах. Незаменимые жирные кислоты. Регуляция биосинтеза жирных кислот. Биосинтез триацилглицеролов, фосфолипидов. Общие предшественники и запасной путь. Генетические дефекты липидного обмена, лизосомные болезни. Биосинтез холестерина и стероидов.

Тема 6. Обмен белков и аминокислот

Распад белков в желудочно-кишечном тракте. Транспортные системы для аминокислот. Распад аминокислот. Реакции декарбоксилирования, образования нейромедиаторов (биогенных аминов). Реакции окислительного дезаминирования. Особенности глутаматдегидрогеназы. Транспорт аммиака. Реакции трансаминирования, особенности ферментов. Обмен аминокислот между органами. Выведение азота из организма. Реакции цикла мочевины. Сопряжение процесса образования мочевины с циклом трикарбоновых кислот. Биоэнергетика цикла мочевины. Регуляция процесса.

Метаболические нарушения цикла мочевины. Механизмы вывода аммиака из разных организмов. Катаболизм углеродного скелета аминокислот, понятие о глюкогенных и кетогенных аминокислотах (трансаминирование, дезаминирование, цикл мочевины, распад углеродного скелета). Понятие о заменимых и незаменимых аминокислотах. Биосинтез заменимых аминокислот. Особенности биосинтеза незаменимых аминокислот. Регуляция биосинтеза аминокислот. Сопряжение регуляции катаболизма и анаболизма аминокислот. Биологическая роль аминокислот в образовании жизненно важных соединений – нейромедиаторов, пигментов, нуклеиновых кислот, креатина.

Тема 7. Метаболизм азотистых оснований и нуклеиновых кислот

Обмен нуклеиновых кислот. Распад нуклеиновых кислот в желудочно-кишечном тракте. Распад пуринов и пиримидинов. Образование мочевой кислоты, желчных пигментов. Синтез пуринов, пиримидинов, рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов. Реутилизация пуриновых оснований. Уровни регуляции синтеза и распада пуринов и пиримидинов. Подагра. Регуляции обмена нуклеиновых кислот. Сопряжение регуляции распада и синтеза.

4. Перечень лабораторных работ по курсу «Биохимия»

1. Количественное определение АТФ в тканях.
2. Термолабильность и специфичность амилазы слюны.
3. Количественное определение глюкозы в биологических жидкостях.
4. Влияние рН среды на активность амилазы слюны.
5. Определение активности амилазы в биологических жидкостях. Унифицированный амилотестический метод с устойчивым крахмальным субстратом (метод Каравея).
6. Специфичность действия сахаразы дрожжей.
7. Определение концентрации лактозы в молоке.
8. Определение действия каталазы и ксантиноксидазы.
9. Определение действия уреазы и пероксидазы.
10. Определение липопротеидов в плазме крови. Электрофорез липопротеидов.
11. Определение холестерина методом Илька.
12. Определение аминного азота.
13. Исследование свойств нуклеопротеидов и нуклеотидов.
14. Количественное определение мочевой кислоты в биологических жидкостях по Бенедикту.
15. Исследование свойств витаминов (В1, РР, С, А).

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. Приступив к работе в биохимической лаборатории, студенты должны ознакомиться с размещением средств пожаротушения и первой медицинской помощи. Приступать к работе можно только в присутствии преподавателя и лаборанта.
2. Внимательно изучить требования по безопасному выполнению работы, а также ознакомиться со свойствами веществ, которые используются в лаборатории (огневая опасность, токсичность и т.п.).
3. При работе в биохимической лаборатории необходимо поддерживать чистоту, порядок, быть внимательным, исключить попадание веществ на кожу и одежду, не касаться руками лица и глаз, мыть руки с мылом.
4. В биохимической лаборатории не разрешается принимать пищу, пить воду из лабораторной посуды, пробовать на вкус вещества. Нюхать вещества можно осторожно, движениями рук направлять к себе пары или газ.
5. Категорически запрещается работать в биохимической лаборатории в одиночку.
6. Нельзя проводить опыты в грязной посуде.
7. Органические соединения в виде пара или газа могут взрываться в смеси с воздухом. Не допускайте образования таких смесей.
8. При проведении работ по применению щелочей, металлического натрия, концентрированных кислот, всегда следует пользоваться защитными очками, резиновыми перчатками.
9. Работу с большинством органических веществ следует проводить только в вытяжных шкафах.
10. Остатки реактивов следует сливать в специальные емкости для отходов.
11. При работе с бромом следует помнить, что это очень токсичное вещество, которое опасно для слизистой оболочки и образует на коже ожоги, которые трудно заживают. Все работы следует проводить в вытяжном шкафу. В случае ожога бромом, обожженное место обрабатывают спиртом, затем направляют в медицинское учреждение.
12. При попадании кислот на кожу необходимо быстро промыть пораженное место водой, а затем 3% раствором соды. При ожогах щелочами нужно промыть пораженное место водой, а затем 3% раствором уксусной кислоты. При попадании кислоты или щелочи в глаза необходимо промыть большим количеством воды, а затем обработать тампоном, смоченным в растворе соды или борной кислоты и снова промыть водой.
13. Концентрированные кислоты, щелочи, токсичные вещества хранят обязательно в хорошо вентилируемом шкафу.
14. Легковоспламеняющиеся и взрывоопасные вещества должны храниться в металлических шкафах в количествах, не превышающих ежедневную потребность.
15. В случае возгорания одежды необходимо сразу накинуть на пострадавшего халат, простыню и т.п. и, ни при каких обстоятельствах, не

давать ему возможности бежать, поскольку это усилит пламя. При возникновении пожара необходимо сразу выключить вентиляцию или электроэнергию и принять меры к ликвидации пожара. При необходимости вызвать пожарную команду. При загорании бензола, эфира нельзя применять для тушения воду. В этих случаях пламя тушат песком или асбестовой простыней.

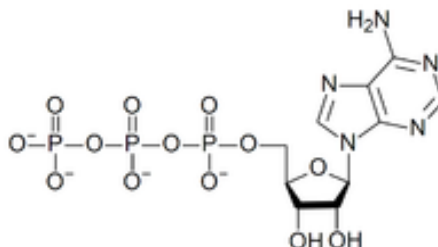
16. При работе со стеклом и химической посудой необходимо быть осторожным.

17. Запрещается смешивать органические вещества и проводить опыты, которые не связаны с программой учебной дисциплины.

18. После выполнения лабораторной работы сдать реактивы, посуду и оборудование лаборанту или преподавателю.

Лабораторная работа №1 «Количественное определение АТФ в тканях»

Всем клеткам для выполнения их работы необходима энергия и для всех клеток любого организма источником этой энергии является АТФ. Поэтому АТФ называют «универсальным носителем энергии» или «энергетической валютой» клеток.



АТФ поставляет энергию для выполнения следующих видов работы: механической – мышечное сокращение, передача нервных импульсов, осмотической – активный транспорт веществ, химической – биосинтез, передача генетической информации. АТФ легко доставляет энергию в любую часть клетки, которая требует ее для биохимических процессов. АТФ быстро высвобождает энергию, для чего нужно протекание только одной реакции – гидролиза. АТФ синтезируется во время клеточного дыхания за счет химической энергии, высвобождающейся при окислении таких органических веществ, как глюкоза, и во время фотосинтеза – за счет солнечной энергии. Синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата называют реакцией окислительного фосфорилирования (клеточное дыхание), если же для фосфорилирования используется световая энергия, то процесс называют фотофосфорилирование (фотосинтез). Скорость синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата (скорость процесса дыхания) легко регулируется в соответствии с потребностями клетки. Для синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата нужно 306 кДж энергии на 1 моль АТФ.

Цель работы: определить количество АТФ в мышечной ткани или печени крысы (лягушки).

Принцип метода: основывается на гидролизе АТФ, в результате чего освобождается остаток фосфорной кислоты.

Реактивы:

- 2,5 % раствор молибденовокислого аммония в 5 м растворе сульфатной кислоты;
- стандартный раствор фосфора (1 мл 0,025 мг фосфора);
- 5% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ);
- 2 н раствор гидроксида натрия;
- 0,15% спиртовой раствор фенолфталеина;
- 0,2% раствор аскорбиновой кислоты (20 мг на 10 мл воды);
- 2 н раствор соляной кислоты (HCl).

Посуда и оборудование: фотоэлектроколориметр (ФЭК), водяная баня, весы настольные, воронки, колбы, пипетки, пробирки, фильтровальная бумага, кристаллизатор, ножницы, штатив, стеклянные палочки.

ХОД РАБОТЫ

1. 2 г охлажденной и измельченной свежей ткани вносят в колбу с 20 мл ТХУ. Перемешивают и оставляют на 30 мин, после чего фильтруют в сухую колбу.

2. В две пробирки на 10 мл с меткой добавляют по 1 мл безбелкового фильтрата. Одну пробирку оставляют в штативе, во вторую добавляют 1 мл 2 н соляной кислоты и оставляют в кипящей водяной бане на 7 мин для гидролиза. Затем пробирку вынимают, охлаждают, добавляют 1-2 капли 0,1% раствора фенолфталеина и нейтрализуют 2 н раствором гидроксида натрия до слабо-розовой окраски. В обе пробирки добавляют по 1-2 мл 2,5% раствора молибденовокислого аммония и 1 мл 0,2% раствора аскорбиновой кислоты, и доводят до метки 10 мл дистиллированной водой.

3. Одновременно готовят стандартный раствор. Для этого в чистую пробирку на 10 мл добавляют 1 мл стандартного раствора фосфата, который содержит 0,025 мг фосфора, после чего добавляют те же реактивы, что и в опытную пробирку (молибденовый аммоний, аскорбиновая кислота) и доводят до 10 мл.

4. Во всех пробирках появляется синяя окраска. Интенсивность окраски зависит от количества фосфора. По разнице между содержанием фосфора до и после гидролиза рассчитывают содержание фосфора, который входил в состав АТФ. Полученные данные выражают в мг на 1000 г ткани.

5. Указания к составлению отчета

Расчет:

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

$$D_x = D_y - D;$$

де C_x – исследуемая концентрация АТФ;

D_x – исследуемая оптическая плотность;

D_y – оптическая плотность после гидролиза;

D – оптическая плотность до гидролиза;

$D_{ст}$ – оптическая плотность стандарта.

Сделать вывод.

Контрольные вопросы:

1. На каких свойствах базируется принцип метода определения АТФ?
2. Как приготовить 5% раствор ТХУ и 2 н раствор гидроксида натрия?
3. Напишите реакцию гидролиза АТФ.
4. Дайте определение биологической роли АТФ.

Лабораторная работа №2 «Термолабильность и специфичность амилазы слюны»

Ферменты – высокоспецифичные белковые катализаторы, присутствующие во всех живых клетках и способствующие превращению одних веществ (субстратов) в другие (продукты, метаболиты). Они выступают в роли катализаторов практически во всех биохимических реакциях, протекающих в живых организмах – ими катализируется около 4000 биореакций; они играют важнейшую роль во всех процессах жизнедеятельности, направляют и регулируют обмен веществ организма. Подобно всем катализаторам, ферменты ускоряют как прямую, так и обратную реакцию, снижая энергию активации процесса. При этом, химическое равновесие не смещается ни в сторону прямой, ни в сторону обратимой реакции. Ферменты имеют свои характерные особенности, такие как: термолабильность, специфичность, зависимость их активности и действия от значения рН среды, влияние модуляторов (активаторов и ингибиторов) и др.

Термолабильность – высокая чувствительность к изменениям температуры. Ферменты являются белками, поэтому для большинства из них температура выше 70°C приводит к денатурации и потере активности. При увеличении температуры на 10°C реакция ускоряется в 2-3 раза, а при температурах близких к 0°C скорость ферментативных реакций замедляется до минимума. Термолабильность ферментов объясняется тем, что температура, с одной стороны, влияет на белковую часть фермента и приводит, при очень высоких значениях, к денатурации и снижению каталитической функции, а с другой стороны, влияет на скорость реакции образования фермент-субстратного комплекса и на все последующие этапы преобразования субстрата, что приведет к усилению катализа.

При температуре выше 50°C денатурация фермента резко усиливается и, хотя скорость реакций превращения субстрата продолжает расти, активность фермента, которая выражается количеством превращенного субстрата, падает.

Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется его температурным оптимумом. Температурный оптимум для различных ферментов неодинаков. В основном, для ферментов животного происхождения он лежит между $40-50^{\circ}\text{C}$, а растительного - между $50-60^{\circ}\text{C}$. Однако, есть ферменты с более высоким температурным оптимумом, например, папаин (фермент растительного происхождения, ускоряет гидролиз белков) оптимум – 80°C . В то же время, для каталазы (фермент, который ускоряет распад H_2O_2 до H_2O и O_2) оптимальная температура активности находится между 0°C и 10°C , а при более высоких температурах происходит окисление фермента и его инактивация.

Цель работы: исследовать термолабильность и специфичность α -амилазы слюны.

Реактивы:

- 1% раствор крахмала;
- 10% раствор гидроксида натрия (NaOH);
- 1% раствор сульфата меди (CuSO₄);
- раствор йода в йодистом калии;
- слюна, разведенная в 5 раз физиологическим раствором.

Оборудование: мерные цилиндры на 10 мл или 25 мл, пипетки на 1 мл, термостат или водяная баня (температура 38 °С); штатив для пробирок, сухой спирт, спиртовки.

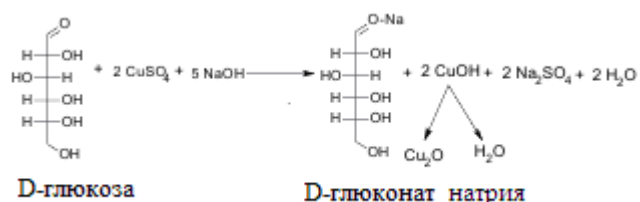
ХОД РАБОТЫ***Термолабильность***

Слюну разводят в мерном цилиндре в 5 раз. В чистую пробирку отливают небольшое количество разбавленной слюны (2 или 3 мл) и кипятят в течение 5-8 мин, после чего охлаждают.

В три пробирки вносят по 10 капель 1% раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 10 капель разбавленной слюны, во вторую – 10 капель прокипяченной слюны, в третью – 10 капель воды (в качестве контроля). Все пробирки переносят в термостат или водяную баню при температуре 38 °С и инкубируют в течение 10 мин. Затем проводят качественные реакции на крахмал и редуцирующие (восстанавливающие) вещества, для чего содержимое каждой пробирки делят на два объема.

Реакция на крахмал: к 5 каплям исследуемого раствора приливают 1 каплю раствора йода в йодистом калии. В присутствии крахмала развивается синий цвет.

Реакция Троммера (реакция на редуцирующие (восстанавливающие) вещества): к 5 каплям исследуемого раствора добавить 5 капель 10% раствора NaOH и 5 капель 1% раствора CuSO₄. Раствор окрашивается в синий цвет. Пробирку осторожно (на малом огне спиртовки) нагревают до кипения. Сначала выпадает желтый осадок гидроксида меди CuOH, который затем переходит в красный осадок Cu₂O.



Вещества, восстанавливающие сахара, имеют незамещенную полуацетальную гидроксильную группу у атома Карбона в 1 положении.

Глюкоза (продукт ферментативного гидролиза крахмала) в щелочной среде восстанавливает гидроксид меди до оксида, а сама окисляется до глюконовой (сахарной) кислоты. При более глубоком окислении глюкозы

образуются соли глюконовой кислоты (глюконат) и ряд других соединений. Реакция Троммера для крахмала и олигосахаридов не происходит. Необходимо предотвращать добавление избытка сульфата меди, поскольку гидрат окиси меди – $\text{Cu}(\text{OH})_2$ – имеет голубой цвет, а при нагревании образуется оксид меди (II) – осадок черного цвета, может маскировать появление красного осадка Cu_2O .

Полученные результаты рекомендуется занести в таблицу:

Таблица

Субстрат	Фермент	Реакция на крахмал с йодом	Реакция Троммера	Выводы

Специфичность

Отличительной особенностью ферментов, по сравнению с небелковыми катализаторами, является их высокая специфичность – константа взаимодействия некоторых субстратов с белком может достигать 10^{10} моль/л и менее. Специфичность – одно из самых значимых свойств ферментов. Это свойство было открыто еще в прошлом веке, когда было сделано наблюдение, что очень близкие по структуре вещества – пространственные изомеры, расщепляются по эфирной связи двумя совершенно разными ферментами.

Специфичность основывается на строгом соответствии стерической структуры субстрата и активного центра фермента. Структура активного центра фермента соответствует структуре его субстрата, в результате чего данный фермент из многих веществ, находящихся в клетке, присоединяет только свой субстрат. Таким образом, ферменты могут различать химические соединения, отличающиеся друг от друга очень незначительными элементами строения, такими, например, как пространственное расположение метоксильного радикала и атома водорода при 1 атоме углерода молекулы метилглюкозида.

По признаку специфичности ферменты делят на две группы: с абсолютной и относительной специфичностью. Ферменты, которые катализируют превращение только одного субстрата с определенной структурой, проявляют абсолютную специфичность. Любые модификации (изменения) в структуре субстрата делают его недоступным для действия фермента. Примером может быть уреазы, которая расщепляет только мочевины, но не действует на модификационную форму – тиомочевину. Сахараза гидролизует только сахарозу, а на другие дисахариды не действует.

К абсолютной специфичности принадлежит также и стереохимическая специфичность, которую проявляют ферменты, способные действовать только на определенные стереоизомеры, например, D- или L-изомеры, цис-

или транс-изомеры и т.д., то есть фермент, который расщепляет или синтезирует D-изомер, действовать на L-изомер не будет.

Ферменты с относительной (групповой) специфичностью – действуют на несколько (группу) веществ, которые имеют один и тот же определенный тип связи или похожую структуру. К таким ферментам, в частности, относятся эстеразы, которые катализируют гидролиз сложных эфиров, пищеварительные ферменты (протеазы, липазы), гексокиназа.

Реактивы:

- 1 % раствор сахарозы;
- 1 % раствор крахмала;
- 10 % раствор гидроксида натрия (NaOH);
- 1 % раствор сульфата меди (CuSO₄);
- слюна, разведенная 1:10.

Оборудование: термостат (или водяная баня) штатив с пробирками, сухой спирт, спиртовки.

ХОД РАБОТЫ

К двум пробиркам приливают по 5 капель разбавленной в 10 раз слюны. В первую пробирку вносят 10 капель 1% раствора крахмала, ко второй – 10 капель 1% раствора сахарозы. Обе пробирки переносят в термостат или водяную баню при температуре 38 °С, после чего с реакционной смесью проводят реакцию Троммера на редуцирующие углеводы.

Полученные результаты внести в таблицу:

Таблица

Субстрат	Фермент	Реакция Троммера	Выводы

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение термина термостабильность ферментов.
2. Что такое температурный оптимум фермента?
3. Чем объясняется термостабильность ферментов?
4. Опишите качественные реакции на крахмал и углеводы.
5. Какие вещества относят к редуцирующим?
6. Дайте определение термина специфичность ферментов. Типы специфичности.
7. На чем базируется явление специфичности ферментов?
8. Какова специфичность амилазы слюны?

Лабораторная работа №3 «Количественное определение глюкозы в биологических жидкостях»

Глюкоза является главным топливом для многих тканей, однако она (а также её метаболиты) принимают участие и в других процессах. Глюкоза превращается в полимер гликоген, который запасается в некоторых тканях, особенно в скелетных мышцах и печени. Глюкоза является субстратом пентозомонофосфатного цикла. Этот путь является источником восстановительных эквивалентов, используемых в процессах биосинтеза, например, биосинтеза жирных кислот; кроме того, является источником рибозы, которая нужна для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Триозофосфат, образующийся в ходе одной из стадий гликолиза, является источником глицерина для синтеза триацилглицеролов (жиров). Пируват и ряд промежуточных соединений цикла лимонной кислоты – это источники карбоновых остовов, используемых в синтезе аминокислот, а ацетил-КоА является основным строительным блоком в синтезе длинноцепочечных жирных кислот и холестерина – предшественников всех стероидов, синтезируемых в организме.

Цель работы: изучить характерные реакции углеводов, ознакомиться с методами количественного определения глюкозы в сыворотке, плазме крови, моче.

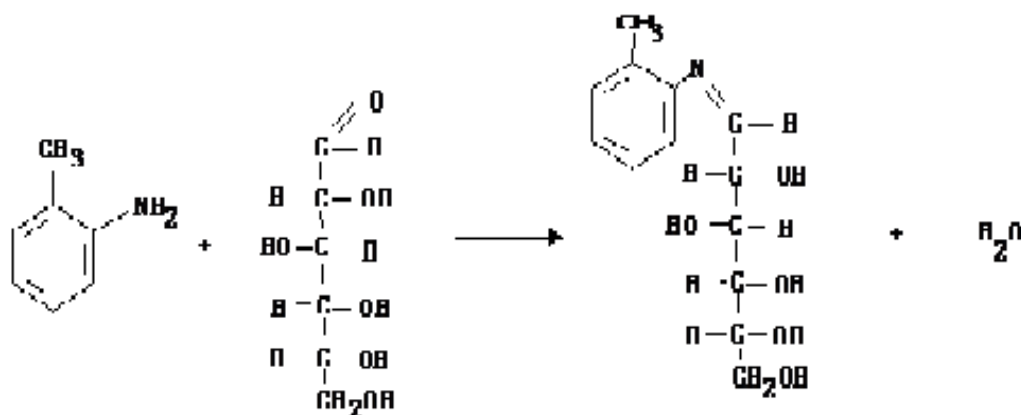
Определение глюкозы глюкозооксидазным методом

Принцип метода: глюкоза в присутствии фермента глюкозооксидазы окисляется с образованием перекиси водорода, который окисляет орто-толуидин, в результате чего образуется окрашенное вещество (интенсивность окраски пропорциональна содержанию глюкозы).

Реактивы:

- 1 % раствор орто-толуидина в абсолютном спирте (хранится в темном стекле в течение нескольких месяцев);
- 0,25 М ацетатный буфер, pH 4,8;
- 0,9 % раствор NaCl;
- 5 % раствор ZnSO₄ в дистиллированной воде;
- 0,3 М раствор NaOH.

Подготовка рабочего реактива: в 80 мл ацетатного буфера растворяют 2 мг глюкооксидазы (α -D-глюкоза: O₂-оксиредуктаза; КФ 1.1.3.4.) с активностью 3000 ед/мг и 1 мг пероксидазы хрена, добавляют 1 мл 1% раствора орто-толуидина, перемешивают и доводят объем до 100 мл. Рабочий раствор должен быть прозрачным, неокрашенным или иметь слабо-зеленый оттенок; хранить его следует при температуре +4 °C.



Орто-толуидин Глюкоза

Глюкозамин
(соединение
сине-зеленого
цвета)

Приготовление калибровочных растворов глюкозы: глюкозу высушивают при 37 ° С и готовят основной раствор с концентрацией 50 мМ в насыщенном (около 0,3%) растворе бензойной кислоты. Из основного раствора готовят рабочие калибровочные растворы с концентрациями 3; 6; 9; 12; 15, 18; и 21 мМ раствора глюкозы в бензойной кислоте.

ХОД РАБОТЫ

В центрифужные пробирки вносят 1,1 мл раствора 0,9% NaCl, 0,4 мл раствора 5% ZnSO₄ и 0,4 мл 0,3 М NaOH, перемешивают; при этом образуется тонкий гель гидроксида цинка, к нему добавляют 0,1 мл биологической жидкости или калибровочного раствора, снова перемешивают и через 10 мин центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин.

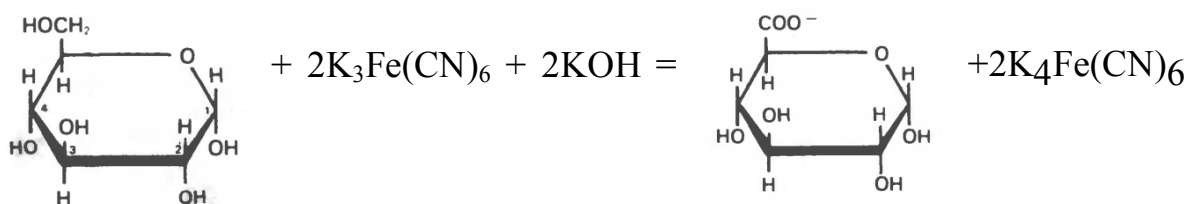
К 1 мл надосадочной жидкости добавляют 3 мл рабочего реактива и осторожно перемешивают. Постепенно развивается окраска, при комнатной температуре достигает максимума через 13-15 мин, а затем постепенно уменьшается. Фотометрируют в 1 см кюветах при красном светофильтре (620 нм) против холостой пробы (вместо биологической жидкости добавляют физиологический раствор 0,9% NaCl). Фотометрировать пробы нужно через один и тот же промежуток времени после внесения рабочего раствора!

Расчет проводят по правилу пропорций или по калибровочному графику, для построения которого на одной оси (X) откладывают значения концентрации глюкозы (ммоль), а на второй (Y) – величину экстинкции.

Определение глюкозы методом Хагедорна–Йенсена

Принцип метода: основывается на свойстве глюкозы принимать участие в окислительно-восстановительных реакциях.

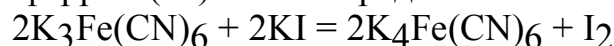
Глюкоза при окислении восстанавливает в щелочной среде красную кровяную соль (гексацианоферрат (III) калия), превращая ее в желтую кровяную соль (гексацианоферрат (II) калия):



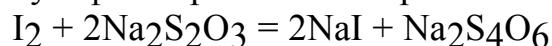
Глюкоза

Глюконовая кислота

Гексацианоферрат(III) калия (железосинеродистый калий) в ходе реакции добавляется с избытком. Оставшееся, после взаимодействия с глюкозой, количество гексацианоферрата(III) калия определяется методом йодометрии:



Для связывания образованного гексацианоферрата(III) калия добавляется сульфат цинка, входящий в состав тройного раствора. Свободный йод титруют раствором гипосульфита при наличии крахмала в кислой среде:



Метод Хагедорна–Йенсена имеет высокую чувствительность.

Реактивы и материалы:

- 0,45 % раствор сульфата цинка;
- 0,1 н раствор гидроксида натрия;
- 0,005 н раствор гексацианоферрат(III) калия;
- тройной хлор-цинк-йодистый раствор;
- 3 % раствор ацетатной (уксусной) кислоты;
- 1 % раствор крахмала в насыщенном растворе хлорида натрия;
- 0,0005 н раствор гипосульфита;
- сыворотка крови.

Оборудование: водяная баня со штативом для стаканов; пробирки; микропипетки; пипетки на 1, 2, 5 мл; бюретки на 2 мл; фильтры или вата.

ХОД РАБОТЫ

Для проведения анализа готовят 2 пробирки с гидроксидом цинка. Для этого в каждую пробирку приливают 5 мл 0,45 % раствора сульфата цинка и 1 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия. Затем микропипеткой прибавляют 0,1 мл исследуемой жидкости в одну из пробирок с гидроксидом цинка.

Затем две пробирки: первая с исследуемым раствором и вторая – контрольная (только с раствором гидроксида цинка), ставят в кипящую водяную баню ровно на 3 мин для осаждения белков. После этого, содержимое пробирок фильтруют через фильтр, заранее смоченный дистиллированной водой. Пробирки промывают дважды по 2 мл горячей дистиллированной воды и фильтруют через тот же фильтр. Затем в эти две пробирки добавляют по 2 мл титрованного раствора гексацианоферрата(III) калия 0,005 н, после чего переносят их в кипящую водяную баню на 15 мин. Нужно точно соблюдать время. После инкубации ко всем пробиркам

добавляют по 3 мл тройного раствора, содержащего йодистый калий, и по 2 мл 3% раствора ацетатной кислоты. Раствор начинает желтеть от свободного йода. В каждую пробирку добавляют по 50 мкл раствора крахмала и титруют гипосульфитом до исчезновения синего цвета.

Указания к составлению отчета. Количество сахара в 0,1 мл крови вычисляют по таблице, составленной для 0,005 н раствора гипосульфита. По таблице находят количество сахара в миллиграммах, эквивалентную объема гипосульфита, израсходованного на титрование.

Пример: на титрование исследуемой пробы потрачено 1,43 мл гипосульфита, находим в таблице в первом вертикальном столбце цифру 1,4 и в верхнем горизонтальном – 0,03. В месте пересечения найдем цифру 0,101, что соответствует количеству сахара в 0,1 мл крови.

Предположим, что на титрование контрольной пробы потрачено 1,97 мл гипосульфита, что соответствует 0,005 мг сахара. По количеству сахара, найденного в крови (0,101), отнимают значение, соответствующее контрольной пробе (0,005). Итак, в 0,1 мл крови содержится 0,096 мг сахара (у 100 мл – 96 мг).

Таблица

Содержание глюкозы в крови методом Хагедорна–Йенсена

Гипосуль- фит, 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

Нормальные величины концентрации глюкозы в крови – 3,5-5,5 мМ/л, сыворотке – 3,6-6,1 мМ/л, спинномозговой жидкости – 2,78-3,89 мМ/л.

Контрольные вопросы:

1. Структура и функции углеводов.
2. Характеристика основных пищевых углеводов.
3. Биохимические механизмы транспорта различных углеводов из кишечника в кровь.
4. Регулирование количества сахара в крови.
5. Биохимические пути использования глюкозы в тканях.
6. Анаэробные пути окисления глюкозы.
7. Специфичность вовлечения различных углеводов в гликолитический метаболизм.
8. Нарушение обмена углеводов.
9. В чем разница между методами определения глюкозы в биологических жидкостях?

Лабораторная работа №4 «Влияние рН среды на активность амилазы слюны»

рН, Водородный показатель – величина, показывающая количество ионов водорода (H^+) в растворе, то есть степень кислотности или основности этого раствора. Молекулы воды в определенной степени способны к диссоциации, описываемой уравнением:



рН вычисляется как отрицательный десятичный логарифм концентрации ионов H^+ (или, точнее, для водных растворов – ионов гидроксония [H_3O^+]) и является безразмерной величиной:

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

Так что, для нейтральных растворов значение рН равен 7, для щелочных – больше 7, для кислых – меньше. По значению рН можно рассчитать рОН.

$$pOH = 14 - pH$$

Активность ферментов зависит от реакции среды, что объясняется его белковой природой. Значение рН, при котором наблюдается максимальная активность фермента, называется оптимумом рН. Изменения рН приводят к изменениям степени ионизации ионогенных групп в активном центре. При различных значениях рН, в реакционной среде активный центр может быть слабее или сильнее ионизированный, больше или меньше экранированный соседними с ним фрагментами полипептидной цепи белковой части фермента и т.п. рН среды влияет на степень ионизации субстрата, фермент-субстратного комплекса и продуктов реакции, сильно влияет на состояние фермента, определяя соотношение в нем катионных и анионных центров, что сказывается на третичной структуре белковой молекулы. Последнее

обстоятельство заслуживает особого внимания, поскольку определенная третичная структура белка-фермента необходима для образования фермент-субстратного комплекса. Кроме того, изменения ионизации белка (не только в области активного центра) вызывают конформационные изменения молекулы фермента. Оптимум рН для большинства ферментов лежит в пределах 6-8 (трипсин – 8,0-9,0; сахараза – 6,2; амилаза слюны – 6,9-7,0; панкреатическая липаза – 7,0-8,0; каталаза – 7,0- 7,6). Исключение – пепсин – 1,5-2,5. Количественное определение ферментов проводят по оптимальному значению рН для каждого фермента.

Цель работы: определить оптимальное значение рН среды на активность амилазы слюны.

Принцип метода: влияние рН среды на активность амилазы определяют на основании интенсивности расщепления этим ферментом крахмала.

Реактивы:

- 0,5% раствор крахмала;
- слюна в разведении 1:100 (в зависимости от активности слюны ее можно разводить в 50 или 10 раз);
- 0,2 М раствор Na_2HPO_4 ;
- 0,1 М раствор цитратной кислоты;
- раствор йода в йодистом калии;
- 1% раствор NaCl .

Оборудование: водяная баня или термостат с температурой 38°C, штатив с пробирками, пипетки.

ХОД РАБОТЫ

В пробирки вносят 0,2 М раствор Na_2HPO_4 и 0,1 М раствора цитратной кислоты в соотношениях, приведенных в таблице:

Таблица

Приготовление инкубационной смеси с разными значениями рН

Объем 0,2 М раствора Na_2HPO_4 , мл	Объем 0,1 М раствора цитратной кислоты, мл	рН смеси	Окрашивание 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	

Получают буферные растворы, рН которых от 5,6 до 8,0. К каждой

пробирки добавляют по 10 капель 1% раствора NaCl и 0,5% раствора крахмала, а также по 1 мл слюны, разведенной в 10 раз. Перемешивают содержимое пробирок и переносят их в водяную баню или термостат (38 ° C) на 10 мин. Затем ко всем пробирок добавляют по 1 капле раствора йода, перемешивают, наблюдают окраску и определяют рН, при котором амилаза действует наиболее активно.

Сделать вывод.

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение понятию рН среды.
2. Напишите уравнения ионизации воды и расчета рН.
3. Что такое оптимальное значение рН ферментов (приведите примеры)?
4. Опишите механизм влияния рН среды на активность ферментов.

Лабораторная работа № 5. «Определение активности амилазы в биологических жидкостях. Унифицированный амилокластический метод с устойчивым крахмальным субстратом (метод Каравея)»

α -Амилаза (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.1.) относится к эндоамилазам и катализирует гидролитическое расщепление внутренних 1,4- α -гликозидных связей в молекулах гликогена и крахмала без определенного порядка, в результате чего сначала образуются олигосахариды, а при их гидролизе образуется дисахарид мальтоза в α -форме, откуда и происходит название фермента. α -Амилаза образуется, главным образом, экзокринной поджелудочной железой и слюнными железами. Определение активности данного фермента проводится для диагностики и контроля заболеваний поджелудочной железы, как острого, так и хронического панкреатита. Активность α -амилазы, также, может характеризовать желчные или желудочно-кишечные заболевания.

Цель работы: ознакомиться с методом количественного определения активности амилазы в сыворотке, плазме крови, мочи.

Принцип метода: α -амилаза гидролизует крахмал с образованием конечных продуктов, которые не дают окраску с йодом. Снижение активности α -амилазы определяют по уменьшению интенсивности окраски.

Реактивы:

– раствор субстрата, рН 7,0: 13,3 г Na_2HPO_4 и 2 г бензойной кислоты растворяют в 250 мл 0,154 М NaCl и доводят до кипения. Суспендируют 0,2 г крахмала (крахмал за Линтнер) в малом объеме дистиллированной воды и добавляют его в кипящий буферный раствор, кипятят в течение 1 мин. После охлаждения доводят объем до 500 мл дистиллированной водой. Раствор стабилен при комнатной температуре в течение 10-12 дней. Раствор должен оставаться прозрачным.

– рабочий раствор йода: 0,036 г KIO_3 и 0,45 г KI растворяют в 40 мл дистиллированной воды, при перемещении добавляют 0,09 мл

концентрированной HCl. 5 г KF растворяют в 50 мл воды, фильтруют в мерную колбу, добавляют 40 мл раствора йода и доливают водой до 100 мл. Хранят раствор в темном стекле в течение месяца.

– материал для исследования: свежая сыворотка крови или плазма крови, моча.

Оборудование: водяная баня или термостат с температурой 38 °С, штатив с пробирками, пипетки.

ХОД РАБОТЫ

Микровариант. Опытная проба: 0,5 мл субстратного раствора вносят в пробирки, нагревают 5 мин при 37 °С, добавляют 0,01 мл биологической жидкости. Инкубация осуществляется в течение 7 мин при 37 °С. Время инкубации нужно строго высчитывать с момента добавления биологической жидкости к крахмальному субстрату. После инкубации добавляют 0,5 мл 0,01 н рабочего раствора йода и доводят объем дистиллированной водой до 5 мл. Пробы измеряют на ФЕКе в 1 см кювете при 630-690 нм (красный светофильтр) против воды.

Контроль или холостую пробу ставят так же, как и опытную, но биологическую жидкость добавляют после инкубации с 0,01 н раствором йода. Измеряют при одинаковых условиях, как и опытную – против воды.

Макровариант. Ход определения исследуемой и холостой проб такой же, что и при микроварианте, но объем всех реактивов и биологической жидкости увеличивают в 5-10 раз.

Расчет. Активность α-амилазы выражают в миллиграммах или граммах крахмала, который гидролизуется в 1 л биологической жидкости за 1 с инкубации при 37 °С. Расчет проводят по формуле:

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

где E_1 – экстинкция холостой пробы;

E_2 – экстинкция исследуемой пробы;

C – количество крахмала, введение в опытную и холостую пробы (0,2 мг при микроварианте);

t – коэффициент пересчета на 1 секунду инкубации;

K – коэффициент пересчета на 1 литр биологической жидкости с учетом разведения.

Нормальные величины. Сыворотка крови: 3,3 – 8,9 мг / (с*л), или 12 – 32 мг / (г*мл). Моча: до 44 мг / (с*л), или до 120 мг / (г*мл).

Сделать вывод.

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение α-амилазы.

2. Какая специфичность α -амилазы.
3. Назовите оптимальные параметры активности α -амилазы.
4. Опишите последовательность манипуляций для определения активности α -амилазы.
5. Клиническое значение определения активности амилазы в биологических жидкостях человека.
6. Изоферменты амилазы: сходство и различия.
7. Другие ферменты, расщепляющие углеводы в ЖКТ человека, кроме α -амилазы.
8. Какие продукты образуются в условиях действия α -амилазы на крахмал и гликоген.
9. Может ли α -амилаза расщеплять целлюлозу?
10. Есть ли видовая специфичность α -амилазы (различные микроорганизмы, различные животные, человек)?

Лабораторная работа № 6 «Специфичность действия сахаразы дрожжей»

Сахараза (β -Фруктофуранозидаза, инвертаза) – фермент класса гидролаз (КФ 3.2.1.26), специфичными субстратами которого есть β -Д-фруктофуранозиды, в том числе сахароза, и катализирует гидролитическое расщепление β -2 \rightarrow α -1-гликозидной связи с образованием свободных глюкозы и фруктозы. Также, субстратом для сахараз является трисахарид рафиноза, при расщеплении которой высвобождается свободная только фруктоза.

Принцип метода: действие фермента можно обнаружить по специфической реакцией на свободную глюкозу (реакция Троммера на восстанавливающие углеводы, "серебряного зеркала" с реактивом Фелинга). Сахароза не содержит свободного полуацетального гидроксила, поэтому в реакции Троммера и "серебряного зеркала" не вступает.

Цель работы: выявить специфичность действия сахаразы дрожжей.

Реактивы:

- пекарские дрожжи;
- 1% раствор крахмала;
- 1% раствор сахарозы;
- 1% водный раствор сульфата меди;
- 10% водный раствор гидроксида натрия;
- дистиллированная вода.

Оборудование: весы, стеклянная воронка, бумажный фильтр, пробирки, термометр, зажим, ступка, водяная баня, секундомер.

ХОД РАБОТЫ

Для получения сахаразы навеску сухих пекарских дрожжей массой 0,5 г растирают для разрушения клеток. Затем добавляют 5 мл

дистиллированной воды и снова продолжают растирать. Полученную суспензию фильтруют через складчатый бумажный фильтр. В фильтрате содержится сахараза.

В две пробирки вносят по 1 мл раствора сахаразы. В пробирку № 1 приливают – 1 мл 5% раствора сахарозы; в пробирку № 2 – 1 мл 5% раствора крахмала. Пробирки ставят на водяную баню или термостат с температурой 36-38 ° С и выдерживают в течение 15 минут.

С каждой пробирки отбирают пробы объемом 0,5 мл. Затем, в каждую пробирку добавляют по 10 капель 10% раствора NaOH и по 3 капли 1% раствора CuSO₄. Затем пробы перемешивают и нагревают до кипения. Образование красного или желтого осадка свидетельствует о наличии в пробе глюкозы.

Полученные результаты занести в таблицу.

Таблица

№ п/п	Фермент (сахараза), мл	Раствор сахарозы, мл	Раствор крахмала, мл	Присутствие свободной глюкозы
1				
2				

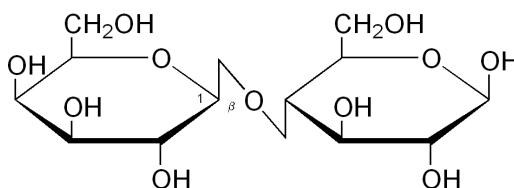
Сделать вывод.

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение сахарозы.
2. Какова специфика сахаразы.
3. Назовите оптимальные параметры активности сахаразы.
4. Укажите причины отрицательной реакции Троммера при добавлении в реакцию смесь фермента сахаразы и раствора крахмала.
5. Опишите реакцию Троммера.

Лабораторная работа № 7 «Определение концентрации лактозы в молоке»

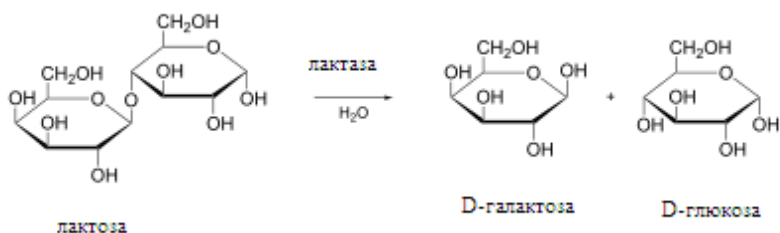
Лакто́за (β -D-галактопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-глюкопираноза), молочный сахар, – углевод группы дисахаридов, содержится в молоке и молочных продуктах. Молекула лактозы состоит из остатков молекул глюкозы и галактозы, и обнаруживает восстановительные свойства.



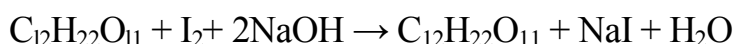
Молекула лактозы

Во время пищеварительного процесса лактоза расщепляется с помощью лактазы (фермента, выделяемого в тонком кишечнике, КФ 3.2.1.108) на простые моносахара глюкозу и галактозу, которые всасываются энтероцитами и попадают в кровь.

«Непереносимость» лактозы означает неспособность ее переваривать, связанную с недостаточностью фермента лактазы. Симптомы непереносимости лактозы: после употребления молочных продуктов развиваются диарея или метеоризм, судороги в кишечнике, степень тяжести которых зависит от уровня недостаточности фермента. Причиной может быть чрезмерный рост и усиление жизнедеятельности микрофлоры кишечника, которые используют лактозу в качестве питательного вещества, а также осмотическим эффектом непереваренной лактозы, которая связывает молекулы воды.



Принцип метода: основан на способности альдегидной группы лактозы в щелочной среде окисляться молекулярным йодом по следующей реакции:



Избыточное количество йода, которое не вступило в реакцию, определяют титрованием тиосульфатом натрия и в качестве индикатора используют крахмал.

Реактивы и материалы исследования:

- 7 % раствор $CuSO_4$;
- 2 % раствор $NaOH$;
- 5 % раствор NaF ;
- 0,04 М I_2 ;
- 5 % раствор HCl ;
- 0,05 М $Na_2S_2O_3$;
- 1 % раствор крахмала;
- молоко.

Посуда и оборудование: пробирки, штативы, пипетки, стеклянные палочки, колбы мерные, бюретки, капельницы, часы.

ХОД РАБОТЫ

В две мерные колбы внести по 5 мл раствора сульфата меди, по 5 мл раствора натрия гидроксида и по 2,5 мл раствора натрия фторида. В одну из них (проба) добавить 5 мл молока, в другую (контроль) – 5 мл дистиллированной воды, перемешать, долить дистиллированной воды до объема 50 мл и через 30 минут отфильтровать. Затем в две конические колбы перенести по 20 мл фильтрата: в

первую – пробы, во вторую – контроля. В каждую колбу влить по 20 мл раствора йода и, непрерывно перемешивая, одновременно добавить по 10 мл раствора гидроксида натрия. Колбы тщательно закрыть и оставить при комнатной температуре на 20 мин, затем к их содержимому добавить по 10 мл раствора хлоридной кислоты и по три капли раствора крахмала и титруют раствором натрия тиосульфата до исчезновения окраски, которое образовалось в результате добавления крахмала.

Массовую концентрацию лактозы в молоке, мг/мл, рассчитывают по формуле:

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

A и B – объем раствора натрия тиосульфата, израсходованного на титрование пробы и контроля;

f – коэффициент поправки на титр 0,05 моль / л раствора натрия тиосульфата (0,97);

Q – масса лактозы (18,1 мг), эквивалентная 1 мл 0,05 моль/л раствора натрия тиосульфата;

V_0 – общий объем пробы;

V_1, V_2 – объемы фильтрата и молока, взятых для исследования.

Сделать вывод.

Контрольные вопросы:

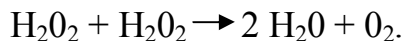
1. Дайте определение лактозы, напишите ее структурную формулу.
2. Какой фермент кишечника расщепляет лактозу.
3. Назовите причины непереносимости лактозы.
4. Назовите симптомы и причины непереносимости лактозы.
5. Какая качественная реакция лежит в основе количественного определения лактазы? Напишите ее.
6. Напишите реакцию распада лактозы.

Лабораторная работа № 8 «Определение действия каталазы и ксантиноксидазы»

Каталаза (водород-пероксидаза: водород-пероксид- оксидоредуктаза; КФ 1.11.1.6) – фермент, который находится в клетках почти всех аэробных организмов. Молекула типичной каталазы состоит из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых содержит в качестве кофактора феррумпорфириновый комплекс. Молекулярные массы каталаз составляют обычно 220-270 кДа. В клетках эукариот каталаза локализована в пероксисомах. Пероксисомы – ограниченные элементарной бислоидной мембраной органеллы. Каталаза относится к числу ферментов, которые наиболее интенсивно исследуются. Впервые эритроцитная каталаза была выделена и очищена в 1910 р., а кристаллический препарат каталазы печени

быка был получен Самнером в 1937 году.

Каталаза является компонентом комплексной ферментативной антиоксидантной защиты организма от токсичных веществ, особенно активных форм кислорода. Фермент восстанавливает перекись водорода до воды согласно ниже приведенному уравнению:



Каталаза может также специфично реагировать с липидными гидропероксидами. Наряду с распадом перекиси водорода и, таким образом, защитой клетки от его токсического воздействия, фермент катализирует целый ряд метаболически значимых реакций, перечень которых постоянно расширяется. Каталитическая активность каталазы не зависит от изменений pH в области 5-10,5. Типичные каталазы стойки к действию органических растворителей и относительно термостабильные. Каталаза образует обратимые комплексы с цианидом, азидом и фторидом, которые действуют как ингибиторы каталазной активности.

Каталазу используют в промышленном производстве. В пищевой промышленности применение глюкозооксидазы в качестве антиоксиданта и для удаления сахара при хранении продуктов, стабилизации вин, безалкогольных напитков, соков, жировых, мясных и молочных продуктов должно осуществляться в комплексе с каталазой. Использование каталазы при холодной стерилизации молока, сыра, яиц обеспечивает получение более высококачественных продуктов. Препараты каталазы также могут быть полезными для целого ряда процессов химического производства, связанных с использованием перекиси водорода: отбеливание материалов, органического синтеза, полимеризации каучука, получения пористых материалов.

Описаны патологические процессы, связанные с недостаточностью каталазы в организме. В 1946 г. впервые у японских пациентов была описана редкая аутосомная рецессивная недостаточность каталазы (1-3% от нормы), которая наблюдалась во всех тканях и проявлялась в рецидивирующих некрозах, гангрене, гранулематозных повреждениях носоглоточной и гайморовых полостей, миндалин. Оральные язвы при этом могут приводить к потере зубов в раннем возрасте.

Цель работы: определить действие каталазы в биологических жидкостях.

Принцип метода: выявление каталазы в биологических жидкостях базируется на расщеплении перекиси водорода с выделением молекулярного кислорода в виде пузырьков газа.

Оборудование и реактивы: пробирки; пипетки; биологическая жидкость в разведении 1: 1000; 2% раствор перекиси водорода.

ХОД РАБОТЫ

В пробирку наливают 1-1,5 мл биологической жидкости, добавляют 5-6

капель перекиси водорода. Наблюдают бурное выделение пузырьков кислорода.

Ксантиноксидаза (КФ 1.1.3.22)

Фермент, который играет важную роль в процессе деградации пуриновых азотистых оснований, так как катализирует превращения гипоксантина в ксантин, а ксантина – в мочевую кислоту, а также осуществляет окислительную трансформацию птеридина и некоторых алифатических и ароматических альдегидов. На каждой из этих стадий реакции в субстрат вводится оксогруппа путем окисления молекулярным кислородом. В качестве другого продукта реакции образуется токсичный пероксид водорода (H_2O_2), который в клетках обезвреживается пероксидазами.

Цель работы: определить активность ксантиноксидазы в молоке.

Принцип метода: реакция обусловлена восстановлением метиленовой сини в лейкоформу за счет окисления формальдегида в муравьиную кислоту благодаря каталитическому действию фермента ксантиноксидазы.

Оборудование и реактивы: пробирки; пипетки; водяная баня; свежее молоко; метиленовая синь.

ХОД РАБОТЫ

В две пробирки наливают по 1 мл свежего молока, в третью – 1 мл прокипяченного и охлажденного молока. В первую и третью пробирки наливают по 1 капле смеси формальдегида и метиленовой сини, а во вторую – 1 каплю водного раствора метиленовой сини. Жидкость во всех трех пробирках тщательно закупоривают (или наслаивают вазелиновое масло) для предотвращения проникновения кислорода и помещают на водяную баню при температуре $40^{\circ}C$. Через некоторое время в первой пробирке жидкость обесцвечивается, во второй и третьей она остается окрашенной в синий цвет.

Сделать вывод.

Контрольные вопросы:

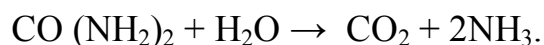
1. Опишите реакцию с участием каталазы.
2. Биологическое значение и распространение каталазы.
3. В чем заключается принцип метода определения активности каталазы?
4. Опишите реакцию с участием ксантиноксидазы.
5. Биологическое значение и распространение ксантиноксидазы.
6. В чем заключается принцип метода определения активности ксантиноксидазы?

Лабораторная работа № 9 «Определение действия уреазы и пероксидазы»

В основе качественных проб на наличие ферментов лежат специфические реакции на продукт ферментативной реакции или выявления

их присутствия с помощью определенного физико-химического метода.

Уреаза (карбамид-амидогидролаза; КФ 3.5.1.5) – фермент, который принимает участие в гидролизе мочевины:



Также, катализирует расщепление (но со значительно меньшей скоростью) гидрокси- и дигидроксимочевины.

Уреаза из бобов (Jack bean) имеет молекулярную массу около 550 кДа и состоит из одинаковых каталитически активных субъединиц, молекулярная масса которых около 91 кДа. Каждая субъединица содержит ион Ni^{2+} , необходимый для проявления ферментативной активности. В активный центр входит остаток цистеина в положении 592, локализованный в области, богатой остатками гистидина. Оптимальная каталитическая активность уреазы проявляется при pH 6,5-7,5; pI 5,0-5,1. Ингибируется уреазы пероксидом водорода, N-этилмалеинимидом, ионами Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ . Сохраняет активность в 8 М растворе мочевины.

Уреаза играет важную роль в круговороте азота в природе. Фермент синтезируют некоторые виды бактерий, много фермента, также, в бобах сои. В организме человека уреазы синтезируются бактериальной микрофлорой. При длительном застое мочи в ней развиваются бактерии, содержащие уреазу, от действия которой мочевина при гидролизе дает аммиак, а среда мочи становится основной (аммиачное брожение мочи). Аммиак используется бактериями почвы для биосинтеза белка.

Уреазой из соевых бобов можно пользоваться для количественного определения мочевины в биологических жидкостях. Для этого аммиак, выделяемый в результате реакции, титруют кислотой. Поскольку две молекулы аммиака эквивалентны одной молекуле мочевины, то по количеству первого можно установить количество мочевины в исследуемых биологических жидкостях. Также, разработан и внедрен в клиническую практику, так называемый, уреазный электрод, в основе работы которого лежит действие уреазы, иммобилизированной на его поверхности. Уреазу применяют в медицине для лечения некоторых заболеваний почек и печени.

Цель работы: определить активность уреазы в биологических жидкостях.

Принцип метода: метод основан на установлении основной реакции смеси, которая развивается в результате выделения аммиака и образования иона аммония, благодаря каталитическому гидролизу мочевины уреазой.

Оборудование и реактивы: пробирки, пипетки, мочевина (2 % раствор) или моча, соевая мука, фенолфталеин (0,1 % спиртовой раствор).

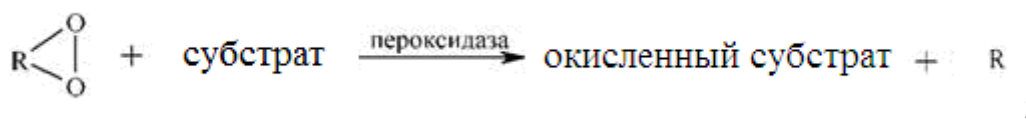
ХОД РАБОТЫ

Вносят в пробирки 2-3 мл раствора мочевины или мочи и добавляют при перемешивании около 0,5 г соевой муки и несколько капель раствора фенолфталеина. Наблюдают (лучше после 15-20 мин инкубации при 37 °С)

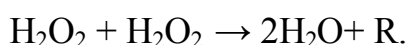
выделение аммиака, может быть определено по запаху. При этом содержимое пробирки приобретает розовую окраску.

Сделать вывод

Пероксидаза (донор: пероксид водорода оксидоредуктазы; КФ 1.11.1.7). Это группа феррумсодержащих ферментов класса оксидоредуктаз, катализирующие реакцию окисления ряда соединений с участием перекисей и образованием воды (в качестве акцептора электронов используют перекись водорода H_2O_2) по следующей общей реакции:



а также:

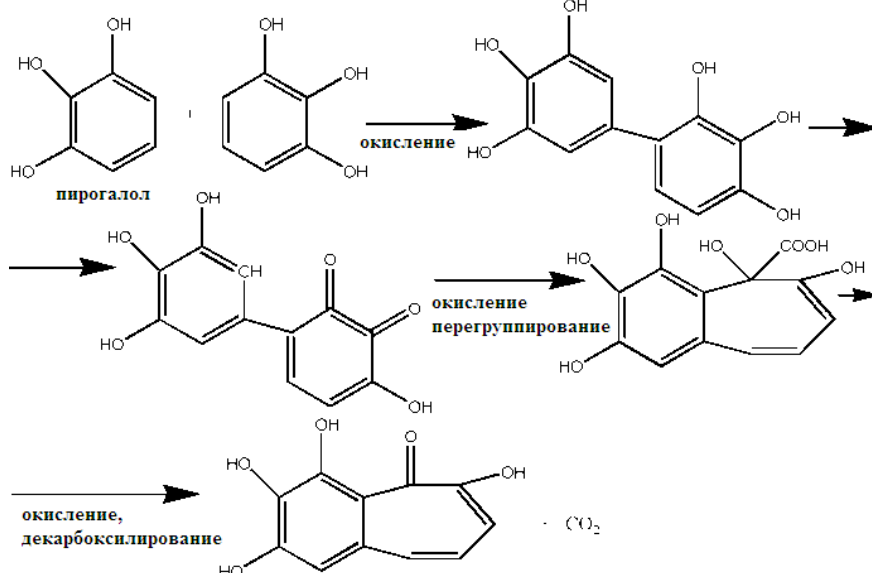


Пероксидазы широко распространены в животных и растительных клетках (могут находиться как в связанном с клеточной мембраной состоянии, так и в цитоплазме). Они принимают участие в фотосинтезе, энергетическом обмене, в трансформации пероксидов и чужеродных организму веществ. Активность пероксидаз и их изоферментный состав существенно изменяются в условиях стрессовых состояний, ранениях, вирусном или микробном инфицировании организма. Наиболее исследованной является пероксидаза из корней хрена (пероксидаза С, М 40 кДа), молекула которой состоит из одной полипептидной цепи (308 аминокислотных остатков), связанной ковалентно с 8 олигосахаридными цепями. Молекула содержит, также, нековалентно связанный гем с атомами Fe (III) и Fe (IV) (некоторые пероксидазы не содержат гем). При pH, ниже 3 и превышающих 12 гем-белковый комплекс разрушается. Наиболее активные субстраты для нее – p- и o- замещенные фенолы и ароматические амины.

Оптимальная каталитическая активность пероксидаз из разных источников в реакциях с органическими субстратами наблюдается при pH 5-7, с неорганическими – при pH 4. Ингибиторы пероксидаз – ионы, которые образуют устойчивые комплексы с катионом Fe (CN^- , N_3^- , S^{2-} и т.д.).

Используют пероксидазы в аналитических целях (например, для определения микроколичеств H_2O_2 , ароматических аминов, загрязнителей окружающей среды), а также для проведения иммуноферментного анализа. Данные по пероксидазной активности учитывают при селекции растений (чем выше эта активность, тем более устойчиво растение к инфекциям). Перспективно использование пероксидаз для селективного окисления органических соединений, а также для глубокой очистки сточных вод от ароматических соединений.

Принцип методов: выявление действия пероксидазы базируется на окислении пирогаллола в окрашенное вещество пурпурогалин:



Пурпурогалин (жёлто-бурого цвета)

Оборудование и реактивы: пробирки; терка; сырой картофель; капустный кочан, яблоко, пирогаллол (1 % раствор); гидрохинон (1 % раствор); пероксид водорода (2 % раствор).

ХОД РАБОТЫ

Метод 1

Картофель, капустный кочан, яблоко, натирают на терке. Небольшое количество картофеля и яблоки, а не отжимая, переносят в пробирки. Капустный сок получают путем отжима через двойной слой марли и разводят в 10 раз. 2 мл полученного раствора капустного сока переносят в пробирки. В пробирки с опытным материалом добавляют 2 мл 1 % раствора пирогаллола и 2 капли 2 % раствора перекиси водорода. При стоянии выпадает желто-бурый осадок пурпурогалина. Многократное дегидрирование (окисление) пирогаллола и ряда промежуточных продуктов на пути к пурпурогалину осуществляется с участием пероксидазы, которая каждый раз передает снятые атомы водорода на пероксид водорода.

Метод 2

Картофель, капустный кочан, яблоко, натирают на терке. С кашицы картофеля, яблока, капусты получают сок, путем отжима через двойной слой марли. Сок картофеля и яблока разводят в 2 раза, капусты – в 10 раз.

Для каждой исследуемой жидкости возьмите по 3 чистых сухих пробирки, пронумеруйте.

Для капустного сока: в пробирки № 1 и № 2 добавьте по 1 мл сока, в пробирку № 3 – 1 мл дистиллированной воды. Пробирку № 1 поставить в водяную баню на 5 мин для инактивации фермента, затем охладить до комнатной температуры. Во все пробирки добавить на кончике лопатки гидрохинон и по пять капель перекиси водорода. Содержание каждой пробирки тщательно перемешать. Через 10-15 мин. наблюдать наличие или

отсутствие окраски исследуемого раствора.

Те же манипуляции повторить с картофельным и яблочным соком.

Результаты записать в виде таблицы.

Таблица

Номер пробирки	Состав смеси	Изменение окрашивания	Вывод об окислении

Сделать выводы по каждому из методов.

Контрольные вопросы:

1. Опишите реакцию с участием уреазы.
2. Биологическое значение и распространение уреазы.
3. В чем заключается принцип метода определения активности уреазы?
4. Охарактеризуйте фермент пероксидазу.
5. Опишите методы определения активности пероксидазы в биологических жидкостях.
6. В чем заключается принцип методов определения активности пероксидазы?

Лабораторная работа № 10 «Определение липопротеидов в плазме крови. Электрофорез липопротеидов»

Липопротеиды находятся в крови в связанном состоянии, в составе белок-липидных комплексов (хиломикроны, α - и β -липопротеиды). α - и β -Липопротеиды отличаются не только молекулярным весом, но и процентным содержанием отдельных липидных компонентов (см. табл.).

Таблица

Критерии оценки липопротеидов (ЛП)	Типы липопротеидов			
	ЛПВЩ α -	ЛПНЩ β -	ЛПДНЩ пре- β -	Хиломикроны
Плотность (кг/л)	1,06-1,21	1,01-1,06	1,01-0,93	0,93
Молекулярный вес (кД)	180-380	2 200	3000-128000	-
Размер молекул (нм)	7,0-10,0	10,0-30,0	200,0	>200,0
Содержание белков (%)	50-57	21-22	5-12	2
Содержание липидов (%)	43-50	78-79	88-95	98
Свободный холестерин (%)	2-3	8-10	3-5	2
Этериф. холестерин (%)	19-20	36-37	10-13	4-5
Фосфолипиды (%)	22-24	20-22	13-20	4-7
Общий холестерин	1	2,3	0,9	1,1
Фосфолипиды				
Триглицериды (%)	4-8	11-12	50-60	84-87

Для α -липопротеидов (ЛПВП – липопротеиды высокой плотности), которые содержат большее количество белка, характерна и более высокая плотность. β - (ЛПНП – липопротеиды низкой плотности) и пре- β -липопротеиды (ЛПОНП – липопротеиды очень низкой плотности) имеют низкую плотность вследствие значительного содержания липидов (около 95%). Эти свойства липопротеидов позволяют разделять их на фракции различными методами.

Исследования липопротеидов в сыворотке крови имеет клинико-диагностическое значение. Исследование нарушений обмена липопротеидов (типирование гиперлипопротеинемий) у больных проводят в соответствии классификации Фредриксона (1971). В основу классификации положены не только характер фракционного распределения липопротеидов, но и содержание триглицеридов и холестерина в сыворотке крови.

Цель работы: определить соотношение уровня липопротеидов в плазме крови.

Принцип метода: для выявления отдельных фракций липопротеидов применяют методы электрофореза на бумаге, ацетатцеллюлозы, в агарозном, крахмальном, полиакриламидном гелях. Окрашенные липопротеиды плазмы крови подвергают электрофорезу для распределения их на фракции. Кроме этого, липопротеиды могут быть разделены по методу ультрацентрифугирования при низкой температуре (этаноловый метод Кона и его модификации).

Оборудование и реактивы: пробирки, колбы, пипетки, водяная баня, электрофоретическая камера, веронал, медунал, 0,5% раствор альбумина на вероналовом буфере, агароза марки «А», судан черный Б, этиленгликоль, ледяная уксусная кислота, этиловый спирт 96% .

Приготовление рабочих растворов:

1) электродный буфер: 1,34 г веронала растворить в 600 мл дистиллированной воды и добавить 10,3 г медунала. После охлаждения, раствор довести водой до 1 л (рН буфера 8,6 и ионная сила 0,05);

2) раствор красителя 200 мг судана черного Б растворить в 20 мл этиленгликоля, переместить сосуд в кипящую водяную баню. Горячий раствор отфильтровать и хранить в посуде из темного стекла.

ХОД РАБОТЫ

Для приготовления геля 0,32 г агарозы марки «А» растворить в 20 мл дистиллированной воды при кипении. После этого сосуд с раствором агарозы поместить в водяной термостат при $+50-55^{\circ}\text{C}$ и добавить в него 20 мл раствора альбумина, все перемешать.

На обезжиренное стекло, которое находится горизонтально, нанести столько раствора агарозы, чтобы толщина геля была 0,15 мм (например, для стекла 50 мм на 80 мм требуется 6 мл раствора агарозы) и охладить. После полимеризации геля на катодном конце сделать лунки длиной 10 мм и диаметром 0,15 мм. Дно лунки не должно доходить до стекла, чтобы

предотвратить подтекание образца под гель (можно вносить образцы в лунки в растворе агарозы). Провести преэлектрофорез в течение 15 мин при напряжении 100 В в электрофоретической камере.

Подготовка образцов: в пробирку с 0,1 мл сыворотки крови добавить 50 мкл раствора красителя, перенести и оставить в темном месте на 1 час. После инкубации образец внести в лунки. Электрофорез провести при 100 В в течение 1 часа. После электрофореза стекло с гелем отжать фильтровальной бумагой и зафиксировать в 5% уксусной кислоты в течение 1 часа. После этого стекло поместить на 20 мин между фильтровальной бумагой, смоченной 96 % этиловым спиртом. Затем электрофореграммы оставить сохнуть.

Количественную обработку электрофореграмм проводят на денситометре.

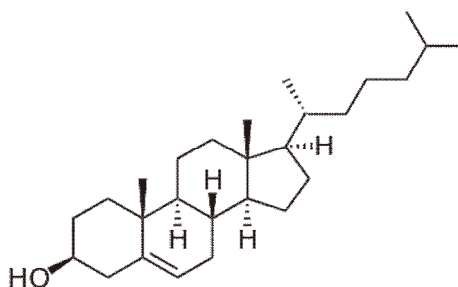
Сделать вывод.

Контрольные вопросы:

1. Охарактеризуйте основные фракции липопротеидов крови.
2. Биологическое и клинко-диагностическое значение липопротеидов.
3. В чем заключается принцип электрофоретического метода определения количества липопротеидов?
4. Опишите последовательность электрофореза липопротеидов.

Лабораторная работа №11 “Определение холестерина методом Ильяка”

Холестерин (греч. χολή — желчь и στερεός — твердый) — органическое соединение, природный липофильный спирт, содержащийся в клеточных мембранах всех живых организмов, за исключением грибов и безъядерных (прокариот).



Структура холестерина

В растительных жирах содержание холестерина можно назвать следовой: в 100 г пальмового масла содержится 2,3-2,6 мг холестерина, когда как в сливочном масле — 180-190 мг. Растворяется в воде, растворим в жирах и органических растворителях. Около 80 % холестерина вырабатывается самим организмом человека: (печенью, кишечником, почками,

надпочечниками, половыми железами), остальные 20% поступают с пищей. 80% холестерина в организме свободные, а 20% – связаны. Холестерин обеспечивает стабильность клеточных мембран в широком интервале температур. Предшественник витамина D, стероидных гормонов (кортизол, альдостерон, женские и мужские половые гормоны), играет важную роль в деятельности нервной и иммунной систем.

Цель работы: изучить свойства и освоить метод определения холестерина в биологических жидкостях.

Принцип метода: присутствующие в сыворотке крови холестерин и его эфиры дают цветную окраску при обработке смесью уксусного ангидрида, сульфатной и ацетатной (уксусной) кислот.

Оборудование и реактивы: пробирки, колбы, пипетки, водяная баня, ледяная уксусная кислота (CH_3COOH), концентрированная серная кислота (H_2SO_4), уксусный ангидрид, этиловый спирт ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), сыворотка крови.

Приготовление кислотной смеси: в сухую колбу внести 10 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл уксусного ангидрида, затем при постоянном перемешивании и охлаждении добавить 10 мл концентрированной серной кислоты. Смесь должна быть обесцвеченной или со слабым желтоватым оттенком. Хранить смесь нужно в холодильнике в темной плотно закрытой посуде.

Приготовление калибровочного раствора: 116 мг холестерина растворить в 2 мл хлороформа и довести объем до 50 мл этиловым спиртом. Готовый раствор содержит холестерин в концентрации 6 ммоль/л.

ХОД РАБОТЫ

К 2,1 мл кислотной смеси медленно по стенке добавляют 0,1 мл сыворотки крови без признаков гемолиза, перемешивают и оставляют на 20 мин в термостате или водяной бане при 37°C . Затем пробы фотометрируют в кюветах 0,5 см против раствора кислотной смеси при 625 нм.

Калибровочная кривая: в четыре пробирки вносят 0,05-0,2 мл калибровочного раствора и добавляют кислотной смеси к общему объему 2,2 мл (см. табл.), перемешивают и оставляют на 20 мин при 37°C также, как и исследуемые пробы, а затем фотометрируют.

Таблица

№	Холестерин, ммоль/л	Количество калибр. раствора, мл	Количество кислотной смеси, мл	$E_{625 \text{ нм}}$
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	

Сделать вывод.

Предостережение при выполнении работы:

а) предупреждайте попадание воды в исследуемые пробы – приводит к помутнению раствора;

б) следы гемолиза и желтушность исследуемой сыворотки крови будут завышать значение результатов.

Контрольные вопросы:

1. Охарактеризуйте основные функции холестерина в живых организмах.
2. Биологическое и клинико-диагностическое значение определения холестерина.
3. Напишите структурную формулу холестерина.
4. В чем заключается принцип метода определения количества холестерина?
5. Опишите последовательность определения холестерина в крови.

Лабораторная работа №12 “Определение аминного азота”

Увеличение уровня аминокислот в сыворотке крови человека имеет место после приёма пищи, возврат количества аминокислот до нормального уровня происходит в течение 4 часов. Экскреция аминокислот с мочой повышается во время беременности, вследствие снижения почечного порога. У новорожденных отмечается аминоацидурия, которая постепенно исчезает. При избытке мяса в пище у человека увеличивается экскреция гистидина и метилгистидина, при голодании – β -аминоизобутирата.

Увеличение количества аминокислот в крови человека наблюдается у больных с комой печени, гепатитах, отравлении фосфором, фенилгидразином, хлороформом, при тяжелых ожогах, сахарном диабете, после кровотечения. Повышение уровня аминокислот может быть при острых инфекциях, а также при введении АКТГ, кортизола. У больных фенилкетонурией увеличивается количество свободного фенилаланина. Уменьшение количества аминокислот в крови происходит при нефрозах, а также после введения глюкозы, инсулина, гормона роста, андрогенов.

Цель работы: определить количество аминного азота в биологических жидкостях.

Принцип метода: количество аминного азота определяется колориметрическим методом по интенсивности окраски комплекса, который образуется при взаимодействии аминокрупп с нингидриновым реактивом.

Оборудование и реактивы: пробирки, колбы, пипетки, водяная баня, 0,04 н раствор уксусной кислоты (CH_3COOH), 1 % водный раствор нингидрина.

ХОД РАБОТЫ

Проведение анализа состоит из нескольких этапов:

1. Осаждение белков. В центрифужные пробирки вносят по 0,5 мл сыворотки крови и 0,5 мл раствора уксусной кислоты, пробирки закрывают пробками и помещают их в холодную водяную баню. Воду в бане доводят до кипения. Образцы кипятят в течение 5 мин (с начала кипения воды). Затем пробирки охлаждают.

2. Фильтрация. К содержимому пробирок добавляют по 1 мл дистиллированной воды, перемешивают и фильтруют раствор в мерную пробирку на 10 мл. Центрифужную пробирку и фильтр смывают еще 2 раза, каждый раз по 1 мл дистиллированной воды.

3. Реакция с нингидрином. К фильтрату добавляют 0,5 мл раствора нингидрина. Содержимое пробирок перемешивают и проводят инкубацию в водяной бане, кипящей в течение 20 мин. После инкубации пробирки охлаждают в холодной воде. После 5 мин пребывания образцов при комнатной температуре раствор в пробирках доводят дистиллированной водой до 10 мл. Параллельно ставят контрольную и стандартную пробы. В пробирку с контрольной пробой приливают 3 мл дистиллированной воды, а в пробирку со стандартной: 3 мл стандартного раствора аланина. Затем в обе пробирки добавляют 0,5 мл раствора уксусной кислоты и 0,5 мл раствора нингидрина, после перемешивания кипятят 20 мин. Далее контрольные образцы обрабатывают как исследуемые.

4. Колориметрия. Плотность образцов измеряют на ФЕКе при зеленом светофильтре (540 нм) в 5 мм кювете. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольного образца и воды.

5. Расчеты проводят по формуле с использованием полученных данных экстинкции исследовательской и стандартной проб:

$$E_{\text{дос}} - C_{\text{дос}}$$

$$E_{\text{ст}} - C_{\text{ст}}$$

$$C_{\text{дос}} = (E_{\text{дос}} C_{\text{ст}}) / E_{\text{ст}},$$

где $E_{\text{дос}}$ и $E_{\text{ст}}$ – значение экстинкций исследуемой и стандартной проб;

$C_{\text{ст}}$ – количество мкг N (азота) у 0,5 мл стандартного раствора аланина. Стандартный раствор аланина с концентрацией 12,86 мг/100 мл содержит 64 мкг аланина в 0,5 мл. Молекулярный вес аланина – 90 Да, одна молекула аминокислоты содержит 1 атом азота (14 Да). По соотношению $90/14 = 6,4$ можно определить, что 64 мкг аланина содержат 10 мкг азота.

0,5 мл стандартного раствора аланина обрабатывают так же, как сыворотку крови. Для перевода результатов в г/л количество мкг азота умножают на 2000 (для перечисления мкг азота на 1 л биологической жидкости) и делят на 10^6 (для перевода мкг в г). Итак, если использовалось 0,5 мл сыворотки крови, то конечная формула имеет следующий вид:

$$X \text{ г/л} = C_{\text{ис}} 0,002, \text{ или}$$

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

где X – количество азота в сыворотке крови (г/л); $C_{\text{ис}}$ – количество азота (мкг) в 0,5 мл сыворотки крови.

В норме концентрация азота в сыворотке крови составляет 0,020-0,050 г/л.

Сделать вывод.

Контрольные вопросы:

1. Перечислить конечные продукты разложения белков и описать пути их образования.

2. Назовите небелковые азотистые соединения крови и их биологическое значение.

3. Биологическое и клинико-диагностическое значение определения аминного азота.

4. В чем заключается принцип метода определения количества аминного азота?

5. Опишите последовательность определения аминного азота в биологических жидкостях.

Лабораторная работа №13 «Исследование свойств нуклеопротеидов и нуклеотидов»

Нуклеиновые кислоты – это биополимеры, мономерными звеньями которых являются нуклеотиды. В живых организмах нуклеиновые кислоты входят в состав нуклеопротеидов.

Нуклеопротеиды – комплексы белка, которые являются составными элементами ядер живых клеток и вирусов. Связь белка, который обладает основными свойствами, с молекулами нуклеиновой кислоты (НК) происходит за счет ионных и водородных связей и легко разрушается путем солевой коагуляции. В результате этого НК могут быть выделены в чистом виде.

Нуклеотидами называют природные или синтетические соединения, в которых гидроксилы углеводного остатка этерифицированы одной или несколькими фосфатными группами.

Нуклеозиды – природные или синтетические соединения, молекулы которых состоят из пуриновых или пиримидиновых оснований, связанных N-гликозидной связью с остатком D-рибозы или 2-дезоксид-рибозы. Важную роль в установлении строения НК играет реакция гидролиза, которая может происходить согласно приведенной схемы:

Нуклеопротеид → нуклеиновая кислота (+ Белок) → Нуклеотид → Нуклеозид (+ H_3PO_4) → Пурины + пиримидины + Пентозы

Молекулы НК всех типов живых организмов – это длинные неразветвленные полимеры нуклеотидов. Роль мостика между нуклеотидами выполняет 3,5 фосфодиэфирная связь, объединяющая 5-фосфатный остаток одного нуклеотида и 3-гидроксильный остаток углеводной части следующей цепи. Поэтому цепь является полярной.

Данный тип связи отражает "первичную структуру" нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты классифицируют на 2 типа:

1 – дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), из которых при полном гидролизе можно выделить аденин, гуанин, цитозин, тимин, дезоксирибозу и фосфорную кислоту;

2 – рибонуклеиновые кислоты (РНК), которые гидролизуются до аденина, гуанина, цитозина, урацила, рибозы и фосфорной кислоты.

Нуклеиновые кислоты в клетке находятся в виде нуклеопротеидных комплексов, которые рассматриваются как сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты.

Цель работы: исследовать свойства нуклеопротеидов и нуклеотидов.

Принцип метода: для анализа химического состава нуклеопротеидов был использован гидролизат дрожжей как объект, богатый на нуклеопротеиды. При частичном гидролизе нуклеопротеиды распадаются на белок (протамины или гистоны) и нуклеиновые кислоты. При полном гидролизе нуклеопротеидов могут быть обнаружены: полипептиды (биуретовая реакция), пуриновые основания (дают специфическую реакцию с остатками солей серебра), фосфорную кислоту проявляют молибдатом аммония, рибозу или дезоксирибозу – по реакции "серебряного зеркала", с реактивом Фелинга или пробой Троммера.

Оборудование и реактивы: колба, обратный холодильник, водяная баня, воронка, бумажный фильтр, пробирки, весы, пипетка мерная на 1 мл, пекарские дрожжи, сульфатная кислота (10% водный раствор), гидроксид натрия (10% водный раствор), гидроксид натрия (30% водный раствор), сульфат меди (1% водный раствор) сульфат меди (7% водный раствор), аммиак (концентрированный раствор), молибденовая жидкость.

ХОД РАБОТЫ

Проведение анализа состоит из нескольких этапов:

1. Проведение гидролиза: в колбу вносят 0,5 г пекарских дрожжей, приливают 4 мл 10% раствора сульфатной кислоты и кипятят на водяной бане 1 час. Колбу охлаждают, и содержимое фильтруют через складчатый фильтр. Фильтрат делят на 4 части.

2. Проведение биуретовой реакции: к 0,5 мл гидролизата добавляют 10 капель раствора гидроксида натрия (10%) в основной среде и 2 капли раствора сульфата меди.

Аналитический эффект: смесь окрашивается в фиолетовый цвет.

3. Проведение пробы Троммера на рибозу и дезоксирибозу: до 0,5 мл гидролизата 10 капель раствора гидроксида натрия (30%) и 2-3 капли раствора сульфата меди (7%). Смесь перемешивают и нагревают.

Аналитический эффект: через 3-5 мин образуется желтый осадок соединений меди (I).

4. Проведение реакции на фосфорную кислоту: до 20 мл молибденовой жидкости добавляют 3-4 капли гидролизата и кипятят на спиртовке.

Аналитический эффект: через 3-5 мин выпадает лимонно-желтый осадок, который образует лимонно-желтую смесь.

Полученные результаты представить в виде таблицы:

Реагент	Биуретовая реакция	Проба Троммера	Молибденовая жидкость
Аналитический эффект			

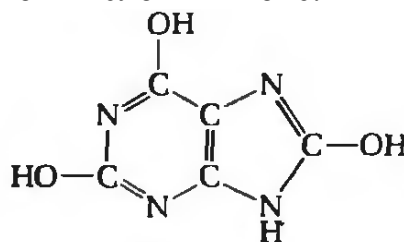
Сделать вывод.

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение понятиям: нуклеопротеиды, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды, нуклеозиды, азотистые основания.
2. Напишите структурные формулы пуриновых и пиримидиновых оснований.
3. Дайте характеристику белкам, которые образуют комплексы с нуклеиновыми кислотами.
4. В чем заключается принцип метода анализа химического состава нуклеопротеидов?
5. Какие качественные реакции используют для исследования свойств нуклеотидов и нуклеопротеидов?

Лабораторная работа №14 «Количественное определение мочевой кислоты в биологических жидкостях по Бенедикту»

Мочевая кислота, образующаяся в результате распада пуриновых оснований, в виде раствора выделяется почками. В норме у человека с мочой выделяется 1,60-3,54 ммоль/сут (270-600 мг/сут) мочевой кислоты. Нормальное содержание мочевой кислоты в сыворотке крови составляет для мужчин – 240-530 мкмоль/л (0,05-0,06 г/л), для женщин примерно на 25% меньше – 185-440 мкмоль/л (0,04-0,05 г/л). Гиперурикемия – рост концентрации мочевой кислоты в крови, гиперурикурия (гиперуриатурия) – увеличение содержания мочевой кислоты в моче.



Структура мочевой кислоты

Гиперурикемия вызывает подагру, заболевание, возникающее в условиях преципитации уратов в тканях, в первую очередь, в суставах. Мочевая кислота и ее соли чрезвычайно плохо растворяются в воде, нормальные концентрации их в жидкостях организма приближены к границе растворимости. Для лечения подагры используют препараты, тормозящие образование мочевой кислоты (аллопуринол) или стимулируют выведение ее почками (антуран, цинхофен). У больных подагрой значения концентрации мочевой кислоты в крови почти всегда превышает 0,075-0,080 г/л, а при образовании в них подагрических уплотнений содержание ее редко бывает ниже чем 0,08-0,09 г/л.

Цель работы: определить количество мочевой кислоты в биологических жидкостях.

Опыт 1. Количественное определение мочевой кислоты в сыворотке крови.

Принцип метода: мочевая кислота восстанавливает фосфатвольфрамовый реактив с образованием соединения голубого цвета, оптическая плотность которой при длине волны 640 нм пропорциональна концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови.

Оборудование и реактивы: сыворотка или плазма крови, 10 % раствор натрия дигидровольфрамат дигидрата, 10 % раствор натрия карбоната, 0,35 М раствор сульфатной кислоты, фосфатвольфрамовый реактив (реактив Фолина), 30 мкм раствор мочевой кислоты, пипетки, пробирки, центрифуга.

ХОД РАБОТЫ

В центрифужную пробирку вносят 0,5 мл сыворотки крови и 4 мл дистиллированной воды. Содержимое пробирки перемешивают и добавляют 0,25 мл 0,35 М раствора сульфатной кислоты и 0,25 мл 10 % раствора натрия дигидровольфрамат дигидрата. Содержимое пробирки перемешивают и через 5 мин центрифугируют в течение 10 мин при скорости 3000 об/мин.

Содержимое пробирок перемешивают. Через 30 мин определяют оптическую плотность стандартной и опытной проб при длине волны 640 нм (590-700 нм, красный светофильтр) против контрольной пробы в 10 мм кювете. Окраска является стабильной в течение 30 мин.

Расчет содержания мочевой кислоты проводят по формуле:

$$C = \frac{A_{\text{иссл}}}{A_{\text{станд}}} * 30 * 10,$$

где: С – содержание мочевой кислоты в исследуемой пробе, мкмоль/л;

$A_{\text{иссл}}$ – оптическая плотность исследуемой пробы;

$A_{\text{станд}}$ – оптическая плотность стандартной пробы;

30 – содержание мочевой кислоты в стандартном растворе, мкмоль/л;

10 – величина разведения сыворотки.

У мужчин содержание мочевой кислоты в сыворотке крови составляет 240-500 мкмоль/л, у женщин – 160-400 мкмоль/л.

Сделать вывод.

Опыт 2. Количественное определение мочевой кислоты в моче.

Принцип метода: метод основан на способности мочевой кислоты восстанавливать фосфатвольфрамовый реактив до фосфатвольфрамового синего, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию мочевой кислоты. Количество фосфатвольфрамового синего определяют путем титрования красной кровяной солью. Последняя окисляет фосфатвольфрамовый синий и синий цвет исчезает.

Оборудование и реактивы: моча, фосфатовольфрамный реактив Фолина, 20 % раствор натрия карбоната Na_2CO_3 , 0,01 н раствор калия ферицианиду $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (красная кровяная соль), стандартный раствор мочевого кислоты (0,5 мг в 1 мл), микробюретки, колбочки для титрования, пипетки, пробирки.

ХОД РАБОТЫ

В первую пробирку приливают 1,5 мл мочи, во вторую – 1,5 мл стандартного раствора мочевого кислоты. Затем к обеим пробиркам добавляют по 1 мл 20 % раствора натрия карбоната и по 1 мл фосфатовольфрамного реактива Фолина, смешивают и титруют 0,01 н раствором калия ферицианида до исчезновения синей окраски.

Содержание мочевого кислоты (в миллиграммах) в суточной моче вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0,75 * B * D}{1,5 * C}$$

где, 0,75 – количество мочевого кислоты в стандартной пробе, в мг; В – количество калия ферицианида, которое пошло на титрование опытной пробы мочи, в мл; С – количество калия ферицианида, которое пошло на титрование стандартной пробы мочевого кислоты, в мл; D – суточный диурез, в мл.

Коэффициент перерасчета в единицах СИ (ммоль/сутки) равен 0,0059.

Сделать вывод.

Контрольные вопросы:

1. Пути образования мочевого кислоты в разных живых организмах.
2. Напишите структурную формулу мочевого кислоты.
3. В чем заключается принцип метода количественного определения мочевого кислоты?
4. Клинико-диагностическое значение определения мочевого кислоты в биологических жидкостях.

Лабораторная работа №15 «Исследование свойств витаминов (В1, РР, С, А)»

Витамины – это низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, которые необходимы в небольших количествах для нормальной жизнедеятельности организма. Одна из основных функций витаминов – это участие в ферментативных реакциях в качестве коферментов и, таким образом, обеспечивают обмен веществ, рост и развитие. Также, витамины являются важными компонентами биологических мембран, низкомолекулярными компонентами

антиоксидантной системы организма. Все витамины делят на два класса: водорастворимые (витамины группы В, витамин С, Р, Н) и жирорастворимые (А, D, Е, К, F), также выделяют отдельную группу витаминоподобных веществ.

Цель работы: определить витамины в биологических жидкостях.

Принцип метода: основан на способности витаминов образовывать цветные растворы при взаимодействии с химическими веществами.

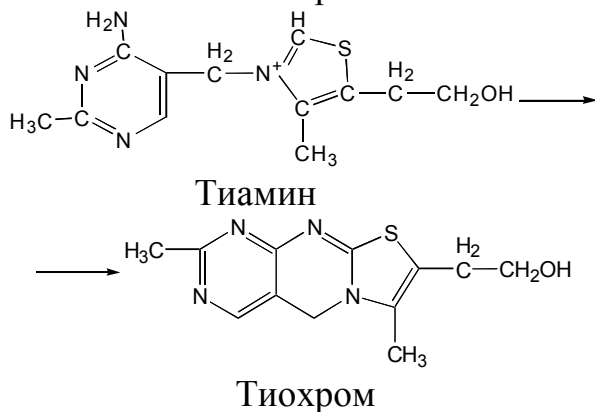
Оборудование и реактивы: хлороформ; HCl (конц.) H₂SO₄ (конц.) рыбий жир; 2,6-дихлорфенолиндофенол; 5 % раствор K₃Fe(CN)₆; 1 % раствор FeCl₃; 10 % раствор уксусной кислоты, 5 % раствор уксуснокислой меди; 10 % раствор гидроксида натрия, раствор тиамина; раствор аскорбиновой кислоты, никотиновая кислота, весы, стакан химический, термометр, стеклянная воронка, пробирки, бумажный фильтр, капельница, водяная баня.

ХОД РАБОТЫ

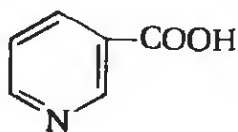
Опыт 1. Реакция окисления тиамина в тиохром.

К 1 капле раствора тиамина добавляют 5-10 капель 10 % раствора гидроксида натрия и 1-2 капли 5 % раствора железосинеродистого калия и перемешать. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет в результате преобразования тиамина в тиохром.

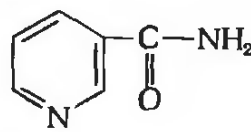
Аналитический эффект: При действии железосинеродистого калия тиамин окисляется с образованием желтого пигмента тиохром.



Опыт 2. Реакция с никотиновой кислотой (РР)



Никотиновая кислота (ниацин)



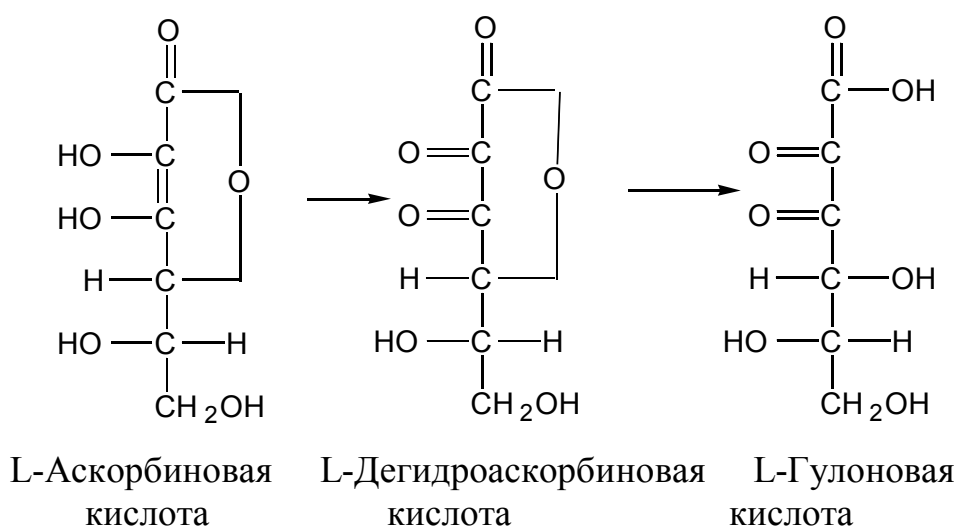
Никотинамид (ниацинамид)

5-10 мг никотиновой кислоты растворяют при нагревании в 10-20 каплях 10 % раствора уксусной кислоты. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем 5 % раствора уксуснокислой меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при отстаивании выпадает осадок синего цвета.

Аналитический эффект: раствор никотиновой кислоты с уксуснокислой медью образует осадок медной соли никотиновой кислоты.

Опыт 3. Реакция на аскорбиновую кислоту с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (по Тильмансу)

В пробирку с 2,6-дихлорфенолиндофенолом вносят 0,5 мл 0,1 % раствора HCl и по каплям – раствор аскорбиновой кислоты. Наблюдается обесцвечивание 2,6-дихлор-фенолиндофенола.

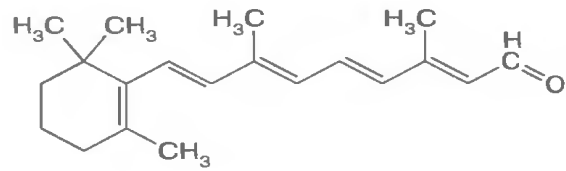


Опыт 5. Реакция на витамин А с концентрированной сульфатной кислотой

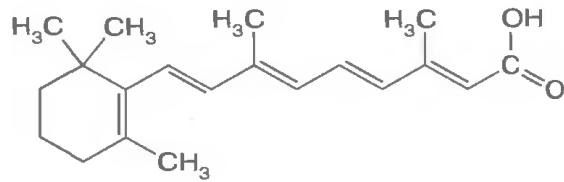
В сухую пробирку вносят 1 каплю рыбьего жира или раствор ретинола и 5 капель хлороформа, перемешивают и добавляют 1 каплю концентрированной сульфатной кислоты.

Аналитический эффект: при добавлении концентрированной сульфатной кислоты к хлороформной эмульсии рыбьего жира или ретинола образуется красное окрашивание, которое переходит в красно-бурое.





Ретиналь



Ретиновая кислота

Оформить отчетность об аналитических эффектах.

ПРИМЕРЫ ТЕСТОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ ПО БИОХИМИИ

1. АТФ – энергетическая валюта клетки. Низкоэнергетические фосфорилированные соединения. АТФ-цикл. Химические свойства АТФ, гидролиз и величина свободной стандартной энергии гидролиза. НАДН и НАДФН как носители энергии в виде восстановительных эквивалентов. Субклеточная организация метаболизма.

1. Главный химический посредник клетки, который связывает между собой процессы с выделением и поглощением энергии:

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

2. Продукты последовательных стадий гидролиза аденозинтрифосфата:

- а) АДФ, АМФ;
- б) НАД, НАДН;
- в) АМФ;
- г) все ответы правильные.

3. При расщеплении глюкозы до лактата образуется:

- а) 2 АТФ;
- б) 1 АТФ;
- в) 4 АТФ;
- г) расщепление проходит без образования АТФ.

4. Сокращение и расслабление скелетных мышц регулируется:

- а) концентрацией Ca^{2+} в цитозоле;
- б) концентрацией Ca^{2+} в митохондриях;
- в) концентрацией фибриллярного актина;
- в) АДФ.

5. Постоянная концентрация АТФ в мышцах обеспечивается:

- а) креатинином;
- б) креатинфосфатом;

- в) ионами Ca^{2+} ;
- г) ионами Mg^{2+} .

6. Аминокислоты используются для образования:

- а) фосфолипидов;
- б) АТФ;
- в) холестерина;
- г) НАДФ.

7. При отщеплении ортофосфорной группы от АТФ образуется:

- а) УТФ;
- б) АМФ;
- в) ГТФ;
- г) АДФ.

8. Стандартная энергия гидролиза АТФ в здоровой клетке составляет:

- а) 7,3 ккал/моль;
- б) 7,3 ккал/моль;
- в) 12,3 ккал/моль;
- г) 12,3 ккал/моль.

9. Фермент какого класса обеспечивает преобразование АДФ в АТФ

- а) гидролазы;
- б) лиазы;
- в) киназы;
- г) протеазы.

10. Носители энергии в виде восстановительных эквивалентов:

- а) липиды;
- б) НАДН и НАДФН;
- в) АТФ и АМФ;
- г) ГТФ и УДФ.

2. Гликолитический путь. Энергетика гликолиза. Расчет количества свободной стандартной энергии, которую получает клетка при распаде одной молекулы глюкозы. Регуляции гликолиза. Анаэробные пути расщепления глюкозы.

1. Гликолиз:

- а) не имеет энергетического значения;
- б) является распадом глюкозы до CO_2 и H_2O ;
- в) является распадом гликогена до CO_2 и H_2O ;
- г) происходит в митохондриях.

2. Продуктами гликолиза в анаэробных условиях является:

- а) CO_2 и H_2O ;
- б) лактат;
- в) этанол и CO_2 ;
- г) ацетил-КоА.

3. Продуктами гликолиза в анаэробных условиях является:

- а) CO_2 и H_2O ;
- б) лактат;
- в) этанол и CO_2 ;
- г) ацетил-КоА.

4. Продуктами гликолиза в аэробных условиях является:

- а) CO_2 и H_2O ;
- б) лактат;
- в) этанол и CO_2 ;
- г) ацетил-КоА.

5. На первом этапе гликолиза происходит:

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

6. На втором этапе гликолиза происходит:

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

7. Первый этап гликолиза заканчивается образованием:

- и) лактата;
- б) пирувата;
- в) глицеральдегид-3-фосфата;
- г) фосфоэнолпируват.

8. Для активации ферментов гликолиза необходимо:

- а) CO_2 ;
- б) ионы Ca^{2+} ;
- в) ионы Mg^{2+} ;
- г) все ответы правильные.

9. Преобразование 3-фосфоглицероил фосфата в трифосфоглицерат происходит за счет:

- а) фосфоглицераткиназы;
- б) фосфоглицератмутазы;
- в) энолазы;
- г) D-глицеральдегидфосфат дегидрогеназы.

10. Восстановление пирувата до лактата происходит за счет:

- а) фосфоглицераткиназы;
- б) фосфоглицератмутазы;
- в) лактатдегидрогеназы;
- г) D-глицеральдегидфосфат дегидрогеназы.

3. Работа пируватдегидрогеназного комплекса. Ферменты и коферменты пируватдегидрогеназного комплекса. Регуляция преобразования пирувата в ацетил-КоА.

1. Болезнь бери-бери обусловлена:
 - а) нехваткой витамина В1;
 - б) избытком витамина В1;
 - в) нехваткой витамина В6;
 - г) избытком витамина В6.
2. Преобразование пирувата в ацил-КоА регулируется:
 - а) НАДН и АТФ
 - б) АДФ и НАД;
 - в) количеством пирувата;
 - г) АМФ и НАД.
3. Пируватдегидрогеназный комплекс включает:
 - а) 5 коферментов;
 - б) 5 ферментов;
 - в) 3 фермента и 5 кофермента;
 - г) 3 кофермента и 3 фермента.
4. Пируватдегидрогеназный комплекс включает:
 - а) 7 реакций;
 - б) 5;
 - в) 6;
 - г) 8.
5. Потеря гидроксильной группы пирувата в пируватдегидрогеназном комплексе происходит на:
 - а) 1 стадии;
 - б) 2;
 - в) 3;
 - г) 4.
6. Главный фермент второй стадии пируватдегидрогеназного комплекса:
 - а) пируват дегидрогеназа;
 - б) дегидролипоилацетилтрансфераза;
 - в) дегидролипоилацетилдегидрогеназа;
 - г) дегидролипоилдегидроредуктаза.
7. Главный фермент четвертой стадии пируватдегидрогеназного комплекса:
 - а) пируват дегидрогеназа;
 - б) дегидролипоилацетилтрансфераза;
 - в) дегидролипоилацетилдегидрогеназа;
 - г) дегидролипоилдегидроредуктаза.
8. На 5-м этапе пируватдегидрогеназного комплекса образуется:
 - а) НАД;
 - б) НАДФ;
 - в) НАДН;
 - г) ФАД.
9. На какой стадии пируватдегидрогеназного комплекса образуется дитиоловая форма липоильных групп:
 - а) 1 стадия;
 - б) 2;
 - в) 3;
 - г) 4.
10. Ключевая кислота пируватдегидрогеназного комплекса:
 - а) липоевая;
 - б) лимонная;
 - в) янтарная;
 - г) нет правильного ответа.

4. Реакции и ферменты цикла трикарбоновых кислот. Биологическая целесообразность цикла. Использование промежуточных продуктов ЦТК в метаболизме организма.

1. Сколько стадий ЦТК:

- а) 6;
- б) 7;
- в) 8;
- г) 9.

2. Энергетический выход ЦТК:

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

3. Фермент, лимитирующий общую скорость ЦТК:

- а) сукцинатсинтаза;
- б) цитратсинтаза;
- в) изоцитратдегидрогеназа;
- г) α -кетоглутаратдегидрогеназа.

4. Цикл Кребса:

- а) превращение ацетил-КоА ;
- б) превращение ацил-КоА;
- в) не имеет энергетического значения;
- г) катализируется ферментами шестого класса.

5. Скорость ЦТК уменьшается при увеличении концентрации:

- а) АТФ и НАДФ;
- б) АДФ;
- в) сукцинил-КоА;
- г) НАД^+ .

6. ЦТК протекает:

- а) в митохондриях;
- б) в цитозоле;
- в) на поверхности гладкого эндоплазматического ретикулула;
- г) на поверхности шероховатого эндоплазматического ретикулула.

7. Сколько необратимых реакций в ЦТК:

- а) 2;
- б) 3;
- в) 4;
- г) нет правильного ответа.

8. Преобразование сукцината в фумарат происходит с выделением:

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

9. При каждом обороте из цикла Кребса выводится:

- а) 2 АТФ;
- б) 2 СО_2 ;
- в) 4 АТФ;
- г) 4 СО_2 .

10. На образование 1 моль. цитрата расходуется:

- а) 1 изоцитрат;
- б) 2 изоцитрата;
- в) 1 оксалоацетат;
- г) 2 оксалоацетата.

5. Тканевое дыхание. Цепь переноса электронов – система окислительно-восстановительных реакций окислительного фосфорилирования.

1. Фермент передающий на O_2 электроны:
 - а) убихинон;
 - б) цитохромоксидаза;
 - в) цитохромсинтаза;
 - г) цитохромдегидрогеназа.

2. Процесс переноса электронов сопровождается:
 - а) снижением свободной энергии;
 - б) увеличением свободной энергии;
 - в) свободная энергия остается постоянной;
 - г) свободная энергия = 0.

3. Запас энергии происходит в результате синтеза:
 - а) АДФ;
 - б) НАДН;
 - в) АТФ;
 - г) НАД.

4. Процесс переноса электронов уменьшается при:
 - а) снижении АДФ;
 - б) увеличении АДФ;
 - в) снижении АТФ;
 - г) увеличении АТФ.

5. Процесс переноса электронов блокируется:
 - а) цитохромом с;
 - б) цитохромом в;
 - в) убихиноном;
 - г) цианидом.

6. При полном окислении глюкозы образуется:
 - а) 32 АТФ;
 - б) 34;
 - в) 36;
 - г) 38.

7. Дыхательная цепь:
 - а) система оксидоредуктаз;
 - б) система лигаз;
 - в) система каталаз;
 - г) не ферментативная система.

8. Окислительное фосфорилирование протекает:
 - а) на внутренней митохондриальной мембране;
 - б) на внешней митохондриальной мембране;
 - в) в цитозоле;
 - г) в эндоплазматическом ретикулуме.

9. Суммарное уравнение переноса электронов в митохондрии:
 - 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. Конечный акцептор электронов у аэробов:
 - а) вода;
 - б) кислород;
 - в) цитохром а;
 - г) нет правильного ответа.

6. Бета-окисление жирных кислот с четным количеством атомов углерода. Расчеты количества АТФ, которое образуется из одной молекулы жирной кислоты. Окисление жирных кислот с двойными связями.

1. Триацилглицерол окисляется до:
 - а) CO_2 и H_2O ;
 - б) спирта и жирных кислот;
 - в) ацетил-КоА;
 - г) кетоновых тел.
2. Активация и окисление жирных кислот происходит:
 - а) в цитозоле;
 - б) митохондриях;
 - в) на мембране;
 - г) в рибосомах.
3. На первой стадии окисления жиров образуется:
 - а) ацетил-КоА и АТФ;
 - б) CO_2 и H_2O ;
 - в) КоА-SH и АТФ;
 - г) АТФ и H_2O .
4. Фермент катализирующий превращение цис D^3 эноил-КоА в транс D^2 эноил-КоА:
 - а) эписмераза;
 - б) КоА-изомераза;
 - в) эноил-КоА-гидратаза;
 - г) синтаза.
5. Витамин для расщепления жиров с нечетным количеством С:
 - а) В6;
 - б) В12;
 - в) В3;
 - г) В1.
6. Ингибитор окисления жирных кислот:
 - а) дофамин;
 - б) гипоглицин;
 - в) инсулин;
 - г) никотин.
7. Регуляция процесса окисления жирных кислот происходит с участием:
 - а) карнитинацилтрансферазы;
 - б) эноил-КоА-гидратазы;
 - в) сукцинатсинтазы;
 - г) нет правильного ответа.
8. Одна молекула ацил-КоА соответствует:
 - а) 6 АТФ;
 - б) 12;
 - в) 24;
 - г) 36.
9. При окислении арахидоновой кислоты образуется:
 - а) 120 АТФ;
 - б) 156;
 - в) 165;
 - г) 174.

7. Биосинтез липидов. Процессы элонгации пальмитоил-КоА, денатурация жирных кислот в животных и растительных организмах. Незаменимые жирные кислоты. Синтез арахидоновой кислоты и её производных.

1. Предшественниками лейкотриенов, простагландинов и тромбоксана являются

- а) насыщенные жирные кислоты
- б) ненасыщенные;
- в) незаменимые;
- г) изопреноиды.

2. Продукты окисления жирных кислот в пероксисомах:

- а) ацетил-КоА и H_2O_2 ;
- б) CO_2 и H_2O ;
- в) ацетил-КоА и АТФ;
- г) кетоновые тела.

3. К незаменимым жирным кислотам относятся:

- а) линолевая, линоленовая, арахидоновая;
- б) арахисовая, арахидоновая, линолевая;
- в) олеиновая, арахидоновая, арахисовое;
- г) все ненасыщенные кислоты.

4. В клетках самостоятельное омыление липидов ингибируется витамином:

- а) А;
- б) В;
- в) Е;
- г) Д.

5. Какая из кислот в организме может превращаться в арахидоновую:

- а) линоленовая;
- б) линолевая;
- в) олеиновая;
- г) все ненасыщенные кислоты.

6. Арахидоновая кислота образуется по результатам дегидрирования:

- а) лецитина;
- б) эйкозатриена;
- в) сукцината;
- г) фосфатидилинозитола.

7. Превращение арахидоновой кислоты в простагландины происходит:

- а) липоксигеназным путем;
- б) циклооксигеназным;
- в) пентозофосфатным;
- г) нет правильного ответа.

8. Преобразование арахидоновой кислоты в лейкотриены происходит:

- а) липоксигеназным путем;
- б) циклооксигеназным;
- в) пентозофосфатным;
- г) нет правильного ответа.

9. Образование простагландинов и лейкотриенов происходит под действием:

- а) циклооксигеназы;
- б) циклооксидегидрогеназы;
- в) десатуразы;
- г) элонгазы.

10. Лейкотриены образуются только под действием:

- а) 2-липоксигеназы;
- б) 3-липоксигеназы;
- в) 4-липоксигеназы;
- г) 5-липоксигеназы.

8. Путь глюконеогенеза. Энергетические затраты глюконеогенеза. Сравнение с гликолитическим путем. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы.

1. Фермент превращающий пируват на оксалоацетат:
 - а) пируваткарбоксилаза;
 - б) пируватсинтаза;
 - в) пируваткиназа;
 - г) фосфоэнолпируваткарбоксилаза.
2. Без какого, из указанных, витаминов невозможна реакция образования оксалоацетата из пирувата:
 - а) пиридоксаль;
 - б) никотинамид;
 - в) пиридоксамин;
 - г) биотин.
3. Функция пентозофосфатного пути заключается в образовании:
 - а) НАДФН;
 - б) АТФ
 - в) фруктозы и рибозы;
 - г) НАД.
4. Ферменты пентозофосфатного пути локализованы в:
 - а) митохондриях;
 - б) цитозоле;
 - в) на мембране;
 - г) в полисомах.
5. Пентозофосфатный путь в отличие от гликолиза:
 - а) генерирует АТФ
 - б) не генерирует АТФ
 - б) не образуется CO_2 ;
 - г) окисление за счет НАД.
6. Глюконеогенез обеспечивает образование:
 - и) холестерина;
 - б) пирувата;
 - в) глюкозы
 - г) фруктозы.
7. Катализирует реакцию превращения оксалоацетата в фосфоэнолпируват:
 - а) пируваткарбоксилаза;
 - б) фосфоэнолпируватсинтаза;
 - в) фосфоэнолпируваткиназа.
 - г) фосфоэнолпируват-карбоксилаза.
8. Для реакции превращения оксалоацетата в фосфоэнолпируват необходимы:
 - а) АДФ, УДФ;
 - б) АТФ, УДФ;
 - в) ГТФ, ИТФ;
 - г) ГТФ, УДФ.
9. Пентозофосфатный путь поставляет в эритроциты:
 - а) НАДФН;
 - б) АТФ
 - в) рибозу;
 - г) НАД.
10. Пентозофосфатный путь состоит из:
 - а) двух фаз;
 - б) трех;
 - в) пяти;
 - г) восьми.

9. Выведение аминного азота из организма. Реакции цикла мочевины.
Механизмы выведения аммиака из разных организмов.

1. Азот в организме человека накапливается больше в составе:
 - а) моносахаров;
 - б) пигментов;
 - в) мочевины;
 - г) порфиринов.
2. Аминный азот транспортируется в печень в составе:
 - а) глутамина;
 - б) глутатиона;
 - в) глутамата;
 - г) нет правильного ответа.
3. Аминный азот у рыб выводится из организма в составе:
 - а) мочевины;
 - б) мочевой кислоты;
 - в) аммиака;
 - г) нет правильного ответа.
4. У животных аммиак транспортируется в печень из мышц в виде:
 - а) глутамина;
 - б) глутатиона;
 - в) глутамата;
 - г) аланина.
5. В цикле мочевины задействованы:
 - а) 3 моля АТФ и 5 ферментов
 - б) 3 АТФ и 6 ферментов
 - в) 2 АТФ и 5 ферментов
 - г) 2 АТФ и 6 ферментов.
6. Аминный азот у птиц выводится из организма в виде:
 - а) мочевины;
 - б) мочевой кислоты;
 - в) аммиака;
 - г) нет правильного ответа
7. Аминный азот у человека выводится из организма в виде:
 - а) мочевины;
 - б) мочевой кислоты;
 - в) аммиака;
 - г) нет правильного ответа.
8. Аминокислота, которая не принимает участия в цикле мочевины:
 - а) L-цитруллин;
 - б) N-ацетилглутамат;
 - в) L-аргинин;
 - г) L-орнитин.
9. Сколько аминокислот задействованы в цикле мочевины:
 - а) 5;
 - б) 6;
 - в) 7;
 - г) 8.
10. В ходе цикла мочевины постоянно требуется:
 - а) CO₂, АТФ, цитруллин;
 - б) CO₂, АТФ, аргинин;
 - в) CO₂, АТФ, аспарат;
 - г) CO₂, АТФ, орнитин.

10. Регуляция биосинтеза жирных кислот. Биосинтез триацилглицеролов, фосфолипидов. Генетические дефекты липидного обмена. Биосинтез холестерина и стероидов. Принципиальная схема биосинтеза изопреноидов.

1. Биосинтез липидов начинается с образования:
 - а) одноуглеродных продуктов;
 - б) трех углеродных;
 - в) четырех углеродных;
 - г) пятиуглеродный.
2. Синтазная система, катализирующая образование жирной кислоты имеет:
 - а) 5 активных центров;
 - б) 6;
 - в) 7;
 - г) 8.
3. Присоединение каждого двухуглеродистого фрагмента в биосинтезе жирных кислот включает:
 - а) три этапа;
 - б) четыре;
 - в) пять;
 - г) шесть.
4. Скорость биосинтеза жирных кислот зависит от:
 - а) ацетил-КоА-карбоксилазы;
 - б) глицеролфосфатацил-трансферазы;
 - в) фосфатидатфосфатазы;
 - г) расщепление АТФ.
5. Преобразование углеводов в триацилглицеролов стимулируется:
 - а) валином;
 - б) инсулином;
 - в) вазопрессином;
 - г) адреналином.
6. Для биосинтеза фосфолипидов необходимы:
 - а) валин;
 - б) холин;
 - в) АТФ
 - г) нет правильного ответа.
7. При болезни Нимана-Пика сфингомиелин накапливается в:
 - а) мозге, костях;
 - б) мозге, мышцах;
 - в) мозге, печени;
 - г) мозге, жировой ткани.
8. Биосинтез холестерина ингибируется попаданием с пищей:
 - а) холестерина;
 - б) углеводов;
 - в) витамина В;
 - г) витамина А.
9. Холестерол синтезируется из:
 - а) пирувата;
 - б) ацетил-КоА;
 - в) ацетофосфата;
 - г) нет правильного ответа.
10. Предшественником изопреноидов является:
 - а) пирофосфат;
 - б) изопентенилпирофосфат;
 - в) ацетил-КоА;
 - г) полипренолы.

11. Преобразование белков в желудочно-кишечном тракте. Транспортные системы для аминокислот. Распад аминокислот. Реакции декарбоксилирования, образования нейромедиаторов (биогенных аминов). Реакции дезаминирования, трансаминирования. Обмен аминокислот между органами.

1. К супернезаменимым аминокислотам человека относят:

- а) Лиз, Тир;
- б) Вал, Лей;
- в) Лиз, Три;
- г) Лей, Три.

2. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте обеспечивает:

- а) амилаза;
- б) трипсин;
- в) пепсин;
- г) все ответы верны.

3. Предшественником глутамина являются:

- а) L-кетоглутарат;
- б) глутатион;
- в) сукцинат;
- г) пируват.

4. Предшественником аланина являются:

- а) L-кетоглутарат;
- б) глутатион;
- в) сукцинат;
- г) пируват.

5. Глутаматдегидрогеназа ингибируется:

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

6. Глутаматдегидрогеназа стимулируется:

- а) АТФ, НАДФ;
- б) АДФ, НАДН;
- в) УДФ;
- г) УДФ, АТФ.

7. Реакцию образования аммиака катализирует:

- а) глутаминазы;
- б) трансфераза;
- в) мутаза;
- г) аланинсинтаза.

8. Более 50% аммиака приходится на:

- а) аланин, валин;
- б) аланин, серин;
- в) аланин, глутамин;
- г) аланин, аспарат.

9. Большинство аминокислот являются субстратами:

- а) гексокиназы;
- б) мутаза;
- в) синтазы;
- г) трансаминаз.

10. Окислительное дезаминирование осуществляется посредством:

- а) гексокиназы;
- б) мутаза;
- в) синтазы;
- г) трансаминаз.

12. Катаболизм углеродного скелета аминокислот, понятие о глюкогенных и кетогенных аминокислотах. Пути разложения аминокислот. Биологическая роль аминокислот в образовании жизненно важных соединений – нейромедиаторов, пигментов, нуклеиновых кислот, креатина и др.

1. Углеродный скелет глутамата

является предшественником:

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

2. Сукцинил-КоА является предшественником:

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

3. Фумарат является предшественником:

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

4. Аспартат является предшественником:

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

5. Гемоглобин это:

- а) порфирин связан с белком глобином;
- б) дыхательный пигмент;
- в) пигмент, участвует в фотосинтезе;
- г) переносчик электронов.

6. Миоглобин:

- а) порфирин связан с белком глобином;
- б) дыхательный пигмент;
- в) пигмент, участвует в фотосинтезе;
- г) переносчик электронов.

7. Хлорофилл это:

- а) порфирин, который связан с белком глобином;
- б) дыхательный пигмент;
- в) пигмент, участвует в фотосинтезе;
- г) переносчик электронов.

8. Цитохром это:

- а) порфирин, который связан с белком глобином;
- б) дыхательный пигмент;
- в) пигмент, участвует в фотосинтезе;
- г) переносчик электронов.

9. Гем ферментативно превращается в:

- а) окись карбона;
- б) билирубин;
- в) порфирин;
- г) нет правильного ответа.

10. Аминокислоты, образующие ацетоацетил-КоА:

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

13. Метаболизм нуклеиновых кислот. Превращение нуклеиновых кислот в желудочно-кишечном тракте. Синтез и распад пуринов и пиримидинов.

г) ИМФ в НАД.

1. Рибонуклеазы и

дезоксирибонуклеазы, гидролизующие нуклеиновые кислоты до нуклеотидов находятся

в:

а) панкреатического сока;

б) желудочном;

в) кишечном;

г) нет правильного ответа.

2. Синтез пуриновых нуклеотидов в тканях человека:

а) начинается с образования фосфорибозилпирофосфата;

б) требует ЦТФ;

в) связан с распадом глюкозы в пентозофосфатном пути;

г) нет правильного ответа.

3. Предшественником пуринового кольца при синтезе пуриновых нуклеотидов являются:

а) аммиак;

б) глутамин;

в) аденозин;

г) аспарагиновая кислота.

4. Ингибиторы биосинтеза пуринов:

а) азасерин, АМФ;

а) глицин, АМФ,

в) азасерин, АТФ,

г) глицин, АТФ.

5. Циклы реутилизации пуринов включают взаимопревращения:

а) АТФ в АМФ;

б) АДФ в АМФ;

в) АМФ в ИМФ;

6. Конечный продукт катаболизма пуринов у человека:

а) аммиак;

б) мочева кислота

в) мочевины;

г) аллантоин.

7. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов начинается с образования:

а) оротовой кислоты

б) карбомаилфосфата;

в) оротидилмонофосфата;

г) УМФ.

8. Конечным продуктом распада ТМФ в организме человека являются:

а) аммиак;

б) мочева кислота

в) CO_2 ;

г) β -аланин.

9. Фермент биосинтеза пиримидинов

аспартаттранскарбомаилаза

ингибируется:

а) УТФ;

б) ЦТФ;

в) ФРПФ;

г) АТФ.

10. Оба пути биосинтеза пуринов и пиримидинов ингибируются общим ингибитором:

а) ФРПФ;

б) ЦТФ;

в) УТФ;

г) не имеет правильного ответа.

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.

СОДЕРЖАНИЕ

Программа учебной дисциплины «Биохимия»	3
Техника безопасности в биохимической лаборатории	6
Лабораторная работа №1. «Количественное определение АТФ в тканях»	8
Лабораторная работа №2. Термолабильность и специфичность амилазы слюны	10
Лабораторная работа №3. Количественное определение глюкозы в биологических жидкостях	13
Лабораторная работа №4. Влияние pH среды на активность амилазы слюны	18
Лабораторная работа №5. Определение активности амилазы в биологических жидкостях. Унифицированный амилокластичный метод с устойчивым субстратом (метод Каравея)	20
Лабораторная работа №6. Специфичность действия сахароз дрожжей	22
Лабораторная работа №7. Определение концентрации лактозы в молоке	23
Лабораторная работа №8. Выявление действия каталазы и ксантиноксидазы	25
Лабораторная работа №9. Выявление действия уреазы и пероксидазы	27
Лабораторная работа №10. Определение липопротеидов в плазме крови. Электрофорез липопротеидов	30
Лабораторная работа №11. Определение холестерина методом Илька	32
Лабораторная работа №12. Определение аминного азота	34
Лабораторная работа №13. Исследование свойств нуклеопротеидов и нуклеотидов	36
Лабораторная работа №14. Количественное определение мочевой кислоты в биологических жидкостях по Бенедикту	38
Лабораторная работа № 15. Исследование свойств витаминов (В1, РР, С, А)	40
Пример тестов для контроля знаний по биохимии	47
Список рекомендованной литературы	60