

577
М-34

П. МИРХАМИДОВА, Д. ОТАЖОНОВА

**МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ
ЗАНЯТИЙ ПО ПРЕДМЕТУ**

БИОХИМИЯ



577
М-34

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕ – СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ЧИРЧИКСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
ИНСТИТУТ ТАШКЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

ФАКУЛЬТЕТ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

П. МИРХАМИДОВА, Д. ОТАЖОНОВА

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ
ПО ПРЕДМЕТУ

БИОХИМИЯ

-3047-

Книга должна быть
возвращена не позже
указанного здесь срока

Количество предыдущих
выдач

--	--

O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLYI VA O'RTA MAXSUS TA'LIM VAZIRLIGI
TOSHKENT VILOYATI CHIRCHIQ
DAVLAT PEDAGOGIKA INSTITUTI
AXBOROT RESURS MARKAZI
1-FILIALI

ТАШКЕНТ – 2021

Данное методическое пособие было написано для студентов направления "Методика преподавания биологии".

Составители:

П. Мирхамидова – доктор биологических наук, профессор.

Д. Отажонова - магистр, ЧГПИ

Рецензенты:

Г. А. Шахмурова – доктор биологических наук, профессор. Зав.каф зоологии и анатомии ТГПУ имени Низами

К. Муталов – кандидат биологических наук, доцент.

Данное учебное пособие рассмотрено методическим советом Чирчикской государственной педагогической института Ташкенской области, обсуждено и рекомендовано к публикации Советом Чирчикского государственного педагогического института, заседание № 9 от 27.02.2021г.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

В биохимической лаборатории проводят анализы по изучению качественного и количественного состава веществ физико-химическими методами. Работы выполняются с применением спектрофотометрических, потенциометрический, микроскопический и других методов исследования. Использование в работах химических реактивов и электрических приборов требует от студентов соблюдения определенных правил техники безопасности.

Меры безопасности при работе с огнеопасными и легковоспламеняющимися жидкостями

Легковоспламеняющиеся вещества должны храниться в специально приспособленном для этого хранилище и использоваться только по мере надобности.

Запрещается хранить в лаборатории петролейный эфир, серный эфир, ацетон, метиловый спирт, бензол, толуол и другие жидкие углеводороды с температурой кипения ниже 150°C в количестве, превышающем суточную потребность.

Общее количество горючих веществ в лабораторной комнате с одним вытяжным шкафом не должно превышать 5 л. Эти вещества следует сохранять специально предназначенных железных ящиках, которые располагают на полу, с удобным подходом к ним, вдали от входной двери и радиаторов отопления.

Категорически запрещается:

- держать горючие вещества на рабочем столе при включенных плитках с открытой спиралью;
- держать горючие вещества в вытяжном шкафу во время работы с плитками с открытой спиралью или включенными приборами.
- хранить горючие жидкости в тонкостенных колбах емкостью более 200 мл, а также легко воспламеняющие жидкости рядом с сильными окислителями (азотной кислотой, бромом, перекисью водорода, перекисью натрия, перекисью магния и ртутного серебра);
- сливать горючие вещества в раковину; остатки загрязненных растворителей из отгонных проб должны сливаться в приспособленную тару, установленную в специально отведенном месте.

Меры безопасности при работе с кислотами и щелочами

При проведении лабораторных работ часто используют концентрированные кислоты и щелочи или их растворы. В случае попадания на кожу они могут вызвать тяжелые ожоги, а в глаза - потерю

зрения. Поэтому концентрированные кислоты и щелочи следует хранить только в толстостенной посуде под вытяжным шкафом.

Разливают концентрированные кислоты только под тягой при максимально прикрытых дверцах шкафа. При этом лаборант (студент) должен иметь средства индивидуальной защиты (резиновые перчатки, халат). Держать склянку следует осторожно, а горловину и дно. Стекающие по горловине капли снимают кусочками асбеста, а затем вытирают насухо бумагой или тряпкой. Такого же осторожного обращения требуют концентрированные растворы щелочей.

При работе с дымящейся азотной кислотой удельного веса 1,52-1,51, а также с олеумом кроме очков и резиновых перчаток следует надевать длинный фартук из прорезиненной ткани или полиэтиленовой пленки.

Разлив концентрированных кислот производится в защитных очках и резиновых перчатках.

При разбавлении серной кислоты следует лить кислоту в воду, а не наоборот. Необходимо строго соблюдать это правило, так как плотность концентрированной серной кислоты выше плотности воды, поэтому при добавлении серной кислоты к воде она будет растекаться по дну сосуда, что предотвратит появление брызг. Если наливать воду в серную кислоту, то произойдет ее растекание по поверхности серной кислоты. В месте контакта воды с серной кислотой резко повышается температура, что является причиной появления брызг, которые при попадании на кожу способны вызвать ожог.

Меры безопасности при работе с электрооборудованием и электроприборами

Лабораторные работы проводятся при наличии исправного электрооборудования. При обнаружении дефектов в изоляции проводов, неисправности пускателей, рубильников, штепселей, розеток, вилок, а также заземления следует немедленно сообщить об этом преподавателю.

Категорически запрещается:

- работать вблизи открытых токопроводящих частей приборов и оборудования;
- загромождать подступы к электрическим устройствам;
- вешать на штепсельные розетки, выключатели и электропровода различные вещи, укреплять провода веревкой или проволокой;
- заменять перегоревшие предохранители пучками проволоки;
- переносить включенные приборы и ремонтировать оборудование под током;
- включать и выключать приборы без разрешения преподавателя.

Первая медицинская помощь

Для оказания первой помощи лаборатории должны быть бинты, гигроскопическая вата, 3%-ный раствор йода, 2% -ный раствор борной кислоты, 3%-ный раствор уксусной кислоты, 3-5%ный раствор двууглекислого натрия (питьевая сода).

При ранениях стеклом нужно удалить из раны осколки, обработать кожу вокруг нее йодом и перевязать пораненное место.

При термических ожогах первой и второй степени обожженное место можно присыпать двууглекислым натрием (питьевой содой). Хорошо помогают примочки из свежеприготовленных растворов 2%-ной питьевой соды или 5%-ного марганцевокислого калия. Лучшим средством для примочек является абсолютный или 96%-ный этиловый спирт, он оказывает одновременно и обеззараживающее действие.

При более тяжелых или обширных ожогах пострадавшего необходимо немедленно отправить к врачу.

При ожогах кислотами и щелочами пораженный сток кожи быстро промывают большим количеством воды. Затем на обожженное место накладывают примочку: при - из 2% -ного раствора питьевой соды, при ожогах щелочью - из слабого (0,5%) раствора уксусной кислоты.

АМИНОКИСЛОТЫ И БЕЛКИ (ПРОТЕИНЫ)

Белки — высокомолекулярные органические соединения. Они играют огромную роль в жизнедеятельности клеток и тканей, являются важнейшей составной частью всего живого. С белками в живом организме связаны важнейшие функции: рост и развитие клеток, пищеварение, размножение, передача наследственных признаков, раздражимость, мышечные сокращения, образование антигенов и антител, обратимое связывание и перенос жизненно важных веществ и др. Биологические катализаторы — ферменты являются белковыми веществами.

Белки — основной материал, из которого строится структура живой клетки.

В состав белков входят (в процентах): углерод (50,6—54,5), кислород (21,5—23,5), азот (15,0—17,6, в среднем 16), водород (6,5—7,3), сера (0,3—2,5), фосфор (0,5-0,6).

Суммарное количество белков в тканях определяют, умножая общее содержание в них азота на коэффициент 6,25.

Все белковые вещества разделяют на две группы: простые (протеины) и сложные белки (протеиды). Простые белки при гидролизе распадаются только на аминокислоты. В состав сложных белков, кроме аминокислот, входят также вещества небелковой природы — нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, пигменты, фосфорная кислота, металлы и т. д.

В построении молекул различных белков участвуют более 20 аминокислот, которые могут быть разделены на две большие группы: ациклические и циклические. В зависимости от числа аминогрупп и карбоксильных групп в молекуле ациклические аминокислоты делят на:

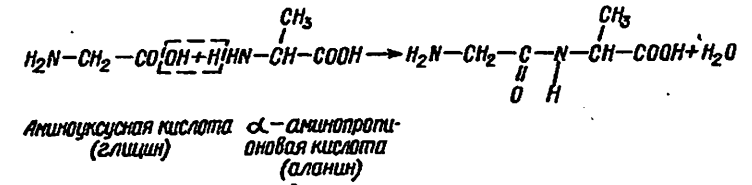
а) моноаминомонокарбоновые, содержащие по одной амино- и карбоксильной группе;

б) моноаминодикарбоновые, в состав молекулы которых входят одна амино- и две карбоксильные группы;

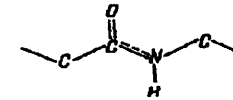
в) диаминомонокарбоновые, для которых характерно наличие в молекуле двух аминогрупп и одной карбоксильной.

Циклические аминокислоты разделяют на карбоциклические и гетероциклические. В группу циклических включают также и иминокислоты.

В белковой молекуле аминокислоты соединены между собой пептидными связями. При образовании пептидной связи карбоксильная группа одной аминокислоты взаимодействует с аминной группой другой, при этом выделяется молекула воды:



Изучение распределения электронов в пептидной связи показало, что здесь имеет место явление мезомерии, или резонанса. Поэтому пептидная связь не является строго ни двойной, ни простой, занимая промежуточное положение, и схематически может быть представлена так:



Это подтверждают также данные, характеризующие расстояние между атомами углерода и азота для разных типов связи. Для двойной связи оно составляет 1,28Å, простой — 1,48Å, тогда как для пептидной — 1,32Å.

Резонанс является фактором, повышающим устойчивость химических соединений, и его наличием объясняется прочность пептидной связи.

Соединение из двух аминокислот носит название дипептид (например, глицил-аланин), из трех — трипептид, из четырех — тетрапептид и т. п., а из многих аминокислот — полипептид.

В образовании пептидной связи у моноаминодикарбоновых и диаминомонокарбоновых кислот принимают участие только аминогруппы и карбоксильные группы, связанные с α-углеродным атомом.

В пространственной конфигурации белковой молекулы имеют место различные типы связей. Чаще всего это водородные связи, но большую роль играют также ди-сульфидные, эфирные (ортофосфатные, пирофосфатные), фосфоамидные, ионные и др.

Аминокислоты и белки обладают амфотерным характером. При диссоциации как свободных аминогрупп, так и свободных карбоксильных групп они приобретают заряды: в кислой среде — положительный, в щелочной — отрицательный.

Регулируя pH среды, можно достигнуть такого состояния, когда диссоциация аминогрупп и карбоксильных групп будет одинаковой, т. е. уравняется количество положительных и отрицательных зарядов, следовательно, общий заряд частицы окажется равным нулю. Значение pH, при котором сумма положительных зарядов равна сумме отрицательных зарядов белковой частицы, называется изоэлектрической точкой. В изоэлектрической точке растворы белка весьма неустойчивы, белок из них

легко выпадает в осадок. Значение изоэлектрической точки характерно для каждого белка и зависит от аминокислотного состава. Таким образом, меняя концентрацию водородных ионов, можно изменить заряд белковых частиц.

Белки отличаются различной растворимостью.

При растворении белков в воде происходит гидратация их молекул. Вокруг каждой из них образуется водная оболочка (гидросфера). Наличие оболочек, состоящих из ориентированных в пространстве молекул воды, является наряду с зарядом белковых частиц фактором устойчивости белковых растворов. Под действием факторов, уменьшающих гидратацию белковых частиц (например, водоотнимающих средств) и нейтрализующих их заряд, растворимость белков понижается и они могут выпасть в осадок.

Качественные реакции на аминокислоты, пептиды и белки можно разделить на две группы:

- цветные реакции, обусловленные аминокислотами и пептидами;
- реакции осаждения, в основе которых лежат изменения физико-химических свойств белковых молекул.

Цветные реакции белков и аминокислот

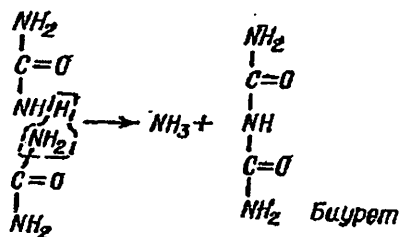
Биуретовая реакция (реакция Пиотровского). В щелочной среде белки, а также продукты их гидролиза полипептиды дают фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание с солями меди. Реакция обусловлена наличием пептидных связей. Положительная биуретовая реакция проявляется у соединений, содержащих не менее двух пептидных групп. Интенсивность окраски зависит от

длины пептида и варьирует от сине-фиолетовой до красно-фиолетовой и красной.

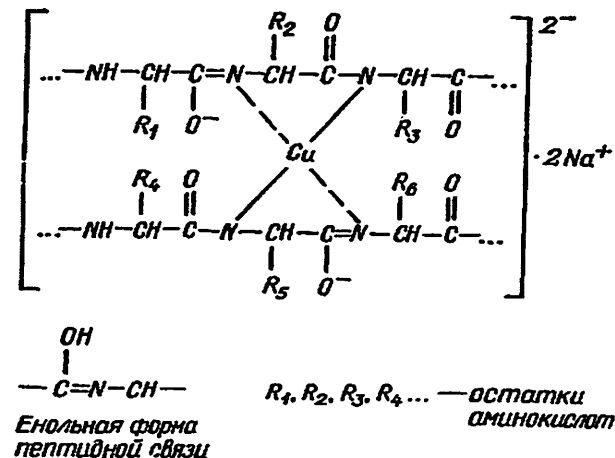
Биуретовую реакцию дают также аспарагин (амид аспарагиновой кислоты) и аминокислоты гистидин, треонин и серин.

Свое название реакция получила от биурета-соединения, которое образуется при нагревании мочевины. Эта реакция сопровождается отщеплением молекулы аммиака

Комплексной медно-натриевой соли пептидов и белков приписывают следующее строение:



Комплексной медно-натриевой соли пептидов и белков приписывают следующее строение:

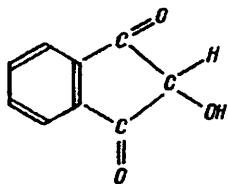
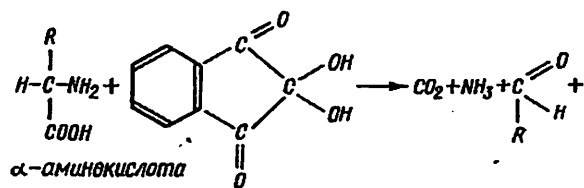


Р е а к т и в ы: а) раствор яичного белка (без добавления хлористого натрия); б) раствор растительного белка; в) едкий натр, 10%-ный раствор; г) сернокислая медь, 1%-ный раствор.

В одну пробирку наливают 2 мл раствора яичного белка, в другую — столько же растительного, затем в каждую из них прибавляют равный объем раствора едкого натра и по 1—2 капли раствора сернокислой меди. Появляется красно-фиолетовое или сине-фиолетовое окрашивание.

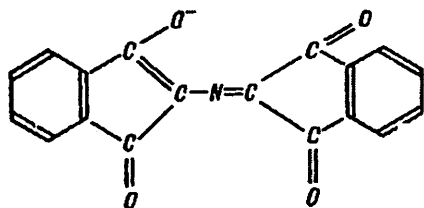
Нингидриновая реакция. Нингидриновая реакция обусловлена наличием аминокислот, имеющих аминогруппы в α-положении. Белки, полипептиды и аминокислоты образуют с нингидрином соединение синего или сине-фиолетового цвета (при нагревании). Нингидриновая реакция является одной из наиболее чувствительных для обнаружения α-аминогрупп.

Сущность реакции заключается в том, что α-амино-кислоты и пептиды, реагируя с нингидрином, подвергаются окислительному дезаминированию и декарбоксилированию:



Восстановленный нингидрин

Восстановленный нингидрин взаимодействует с аммиаком и второй молекулой нингидрина, в результате чего образуется окрашенное соединение (пурпурный Руэмманна)



Р е а к т и в ы: а) раствор белка (без хлористого натрия); б) глицин, 0,1%-ный водный раствор; в) нингидрин, 0,1%-ный спиртовой раствор.

В одну пробирку наливают 1—2 мл раствора глицина в другую — столько же раствора белка. В обе пробирки добавляют раствор нингидрина (в первую 5—6 капель во вторую — 10—12), нагревают около минуты. В пробирке с глицином быстро появляется фиолетово-синее или фиолетовое окрашивание, в пробирке с белком окрашивание развивается медленно и имеет красновато-фиолетовый оттенок (или даже желтовато-фиолетовый в случае наличия аминокислоты пролина).

Реакция Лоури. Это одна из наиболее чувствительных реакций на белки. Ее дают циклические аминокислоты. Реагируя с реактивом Фолина, они образуют комплексы, окрашенные в синий цвет. Интенсивность окраски зависит от концентрации белков, поэтому реакция Лоури может быть использована и для количественного определения.

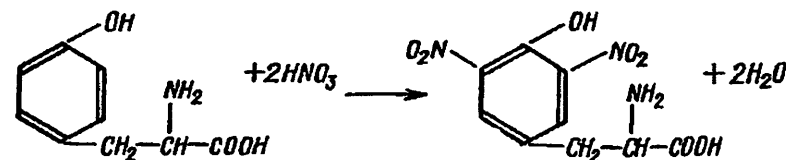
Р е а к т и в ы: а) раствор яичного белка для цветных реакций и реакций осаждения (см. с. 6), разведенный дистиллированной водой в 100 раз; б) глицин, 0,02%-ный раствор; в) фенилаланин, 0,02%-ный раствор; г)

реактив А: 2%-ный раствор углекислого натрия (Na_2CO_3) в 0,1 н растворе едкого натра; д) реактив В: 0,5%-ный раствор сернокислой меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в 1%-ном растворе двузамещенного виннокислого калия ($\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) или натрия ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); е) реактив С: к 50 мл реактива А pipеткой приливают 1 мл реактива В; ж) реактив Фолина: в колбе из термостойчивого стекла в 700 мл дистиллированной воды растворяют 100 г вольфрамовокислого натрия (вольфрамата натрия, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 25 г молибденовокислого натрия (молибдата натрия, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). К раствору приливают 50 мл концентрированной ортофосфорной кислоты (85%-ной) и 100 мл концентрированной соляной кислоты ($p_{20}=1,1885$ — 1,1933), после чего к колбе присоединяют обратный холодильник, переносят ее в вытяжной шкаф и кипятят 10 ч, не допуская бурного кипения жидкости. Затем в колбу добавляют 150 г сернокислого лития ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 50 мл дистиллированной воды, 5 капель брома и кипятят (без холодильника) в течение 15 мин. для освобождения от избытка брома. После того как раствор остынет до комнатной температуры, его доводят дистиллированной водой до объема 1 л, фильтруют и хранят в склянке темного стекла с притертой пробкой. Реактив ярко-желтого цвета, устойчив при хранении. Перед употреблением готовят рабочий раствор реактива, разводя его дистиллированной водой в отношении 1:1. Концентрация кислоты в растворе должна составлять 1 г-экв. Ее проверяют титрованием 1 н раствором едкого натра (индикатор — фенолфталеин).

В три пробирки вносят соответственно растворы яичного белка, глицина и фенилаланина (по 2,5 мл), добавляют по 5 мл раствора С и оставляют на 10 мин., после чего приливают по 0,5 мл рабочего раствора реактива Фолина. Через 30 мин. наблюдают окрашивание жидкости: в пробирках с белком и фенилаланином развивается интенсивная синяя окраска, в пробирке с глицином сохраняется желтый цвет реактива.

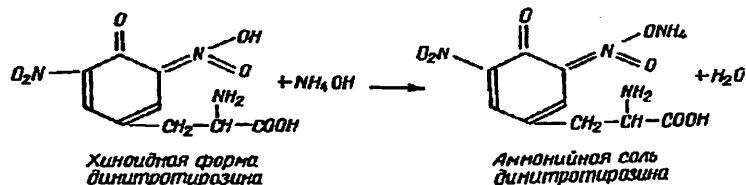
Ксантопротеиновая реакция. Характерна для некоторых ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана). При нагревании белков и полипептидов с концентрированной азотной кислотой образуется нитросоединение желтого цвета.

Реакция протекает в две стадии. На протяжении первой аминокислота, например тирозин, взаимодействуя с концентрированной азотной кислотой, подвергается нитрованию. При этом образуется динитротирозин (желтого цвета).



Примечание. В зависимости от количества прибавленной азотной кислоты может образоваться и смесь динитро- и нитротирозина.

Во второй стадии продукты нитрования тирозина (динитро- и нитротирозин) реагируют с едким натром или гидроокисью аммония с образованием натриевой или аммонийной соли, имеющей желто-оранжевое окрашивание.



Ксантопротеиновую реакцию, кроме белков, пептидов и циклических аминокислот, дают также многие простые ароматические соединения (бензол, фенол и др.).

Р е а к т и в ы: а) раствор яичного или растительного белка б) раствор желатина, 1%-ный; в) азотная кислота, концентрированная; г) натрий едкий, 20%-ный раствор, или аммиак, концентрированный раствор (20—25%-ный); д) фенол, 0,1%-ный раствор.

К 2—3 мл раствора фенола осторожно (по стенке пробирки) приливают 1—2 мл концентрированной азотной кислоты. Осторожно нагревают, появляется желтое окрашивание.

В другую пробирку наливают 1—2 мл раствора яичного или растительного белка, прибавляют 8—10 капель концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. Выпадает осадок, который окрашивается в желтый цвет.

После охлаждения в пробирку осторожно (по стенке) приливают избыток концентрированного раствора аммиака или едкого натра — жидкость принимает оранжевое или желто-оранжевое окрашивание.

Реакцию следует проводить под тягой!

Те же реакции проводят с раствором желатина: желтого окрашивания не наступает, так как желатин не содержит ароматических аминокислот (иногда может появиться очень слабое желтоватое окрашивание, обусловленное примесью других белков).

Реакция Миллона. С помощью реакции Миллона открывают наличие аминокислоты тирозина. Тирозин образует с реактивом Миллона ртутную соль нитротирозина красного цвета. Эта реакция характерна также почти для всех фенолов.



Р е а к т и в ы: а) раствор яичного или растительного белка (см. с. 6); б) раствор желатина, 1%-ный; в) фенол, 0,1%-ный раствор; г) реактив Миллона: 40 г ртути растворяют в 57 мл концентрированной азотной кислоты вначале при комнатной температуре, затем слабо подогревая на водяной бане. Раствор разбавляют двумя объемами воды и после отстаивания сливают с осадка.

Все работы производят под тягой!

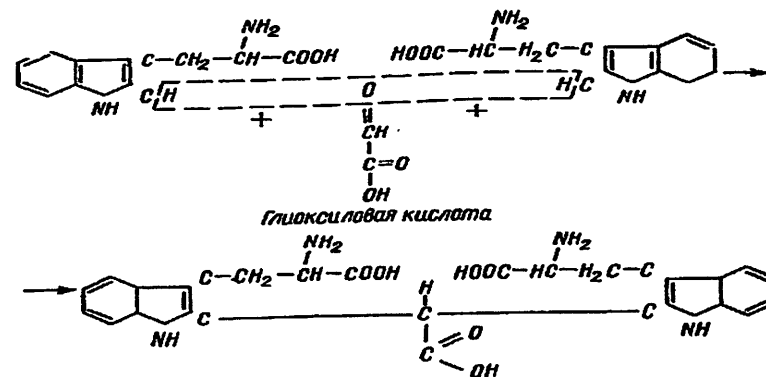
К 1 мл раствора фенола в пробирке приливают 0,5 мл реактива Миллона и осторожно нагревают. Появляется розовое окрашивание.

В пробирку наливают 1—2 мл раствора яичного или растительного белка и 5—6 капель реактива Миллона, осторожно нагревают.

Жидкость окрашивается в красный цвет, и затем выпадает осадок кирпично-красного цвета.

То же проделывают и с раствором желатина: красного окрашивания не наступает или оно проявляется очень слабо (если желатин не очищен от примеси других белков),

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



По аналогичной схеме протекает также реакция триптофана с оксиметилфурфуролом или формальдегидом.

В указанных реакциях принимает участие серная кислота, являющаяся водоотнимающим средством.

Реакция Адамкевича. Реактивы: а) свежий яичный белок (неразбавленный); б) желатин, 1%-ный раствор; в) уксусная кислота, концентрированная; г) серная кислота, концентрированная.

В пробирку наливают несколько капель неразбавленного яичного белка, прибавляют 1—2 мл концентрированной уксусной кислоты (лучше ледяной) и осторожно нагревают до растворения выпавшего осадка, после чего охлаждают и (осторожно!) по стенке пробирки, наклонив ее, наслаивают 1 мл концентрированной серной кислоты, следя, чтобы не произошло смешения жидкостей. На границе двух слоев через некоторое время появляется красно-фиолетовое кольцо.

Эту же реакцию проделывают с раствором желатина - окрашивания не наступает, так как триптофан не входит в состав желатина.

Реакция с оксиметилфурфуролом (Шульце — Распайля). От фруктозы в присутствии концентрированной серной кислоты отщепляется три молекулы воды, она превращается в оксиметилфурфурол, который образует с триптофаном окрашенные продукты конденсации. Реакцию можно производить как с фруктозой, так и с сахарозой, при гидролитическом расщеплении которой освобождаются равные количества глюкозы и фруктозы.

Реактивы: а) раствор яичного или растительного белка (приготовление — см. с. 6); б) сахароза, 5%-ный раствор; в) серная кислота, концентрированная.

К 1—2 мл раствора белка добавляют 2—4 капли раствора сахарозы и по стенке пробирки осторожно наслаивают 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе жидкостей появляется кольцо темно-красного (вишневого) цвета.

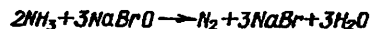
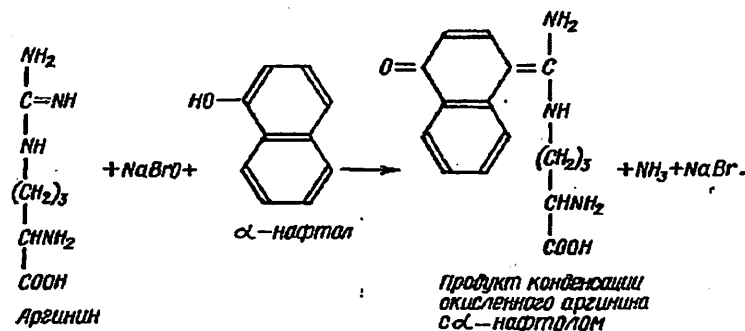
Реакция с формальдегидом.

Реактивы: а) раствор яичного или растительного белка; б) формалин, 5%-ный раствор; в) серная кислота, концентрированная.

К 1 мл раствора белка в пробирке добавляют 2 капли раствора формалина и затем осторожно (по стенке пробирки) наслаивают 1 мл концентрированной серной кислоты, следя, чтобы жидкости не перемешивались. На границе соприкосновения жидкостей появляется кольцо фиолетового или фиолетово-красноватого цвета.

Реакция на аргинин (Сакагучи). Производные гуанидина, как, например, аминокислота аргинин (гуанидина-миновалериановая кислота), метилгуанидин, гликоциамин (гуанидинуксусная кислота), реагируя с гипобромитом натрия (NaBrO) и α-нафтолом, образуют продукт конденсации кирпично-красного или малинового цвета. Метилгуанидин и гликоциамин не входят в состав белковых веществ, и поэтому реакцию Сакагучи можно использовать для открытия аминокислоты аргинина.

Гипобромит является окислителем. Окисленный аргинин, потеряв одну иминогруппу (=NH), реагирует с α-нафтолом с образованием окрашенного соединения.

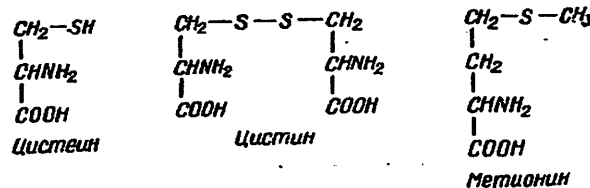


Реактивы: а) раствор яичного или растительного белка; б) α-нафтол. Готовят 1%-ный раствор в 96%-ном этиловом спирте. Перед употреблением 10 мл раствора разбавляют спиртом в мерной колбе емкостью 100 мл; в) едкий натрий, 15%-ный раствор; г) раствор гипобромита натрия. 150 г едкого натра добавляют небольшими порциями к 500 мл воды, перемешивают до полного растворения (осторожно: растворение сопровождается обильным выделением теплоты!). К остывшему раствору осторожно (под тягой!) прибавляют при постоянном перемешивании 8 мл чистого брома. Раствор сохраняют в темной склянке с притертой пробкой (в вытяжном шкафу). Срок годности до трех месяцев.

Примечание. Раствор гипобромита натрия готовится лаборантом.

К 1 мл раствора белка прибавляют 2—3 капли раствора едкого натра, 1—2 капли раствора, α-нафтола и хорошо перемешивают, после чего в пробирку добавляют 1—2 капли раствора гипобромита. Появляется малиново-красное окрашивание.

Реакция на аминокислоты, содержащие серу (цистеин, цистин). Известны три серусодержащие аминокислоты: цистеин, цистин и метионин.

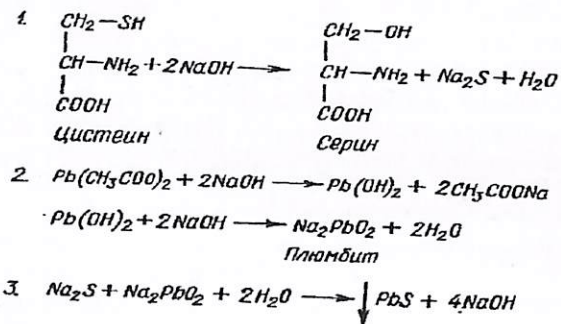


В молекулах цистеина и цистина сера связана относительно слабо и легко отщепляется при щелочном гидролизе в виде сероводорода, который реагирует со щелочью, образуя сульфиды натрия или калия. Сульфиды взаимодействуют с уксуснокислым свинцом (вернее, с плюмбитом) с образованием осадка сернистого свинца черного или буро-черного цвета. Реакции протекают по следующим уравнениям:

Р е а к т и в ы: а) раствор яичного или растительного белка (см. с. 6); б) желатин, 1%-ный раствор; в) едкий натр, 15—20%-ный раствор; г) уксуснокислый свинец, 1 %-ный раствор.

В одну пробирку наливают 2 мл раствора яичного или растительного белка, в другую — столько же раствора желатина. В обе пробирки добавляют по 1—1,5 мл раствора щелочи и осторожно нагревают до кипения, кипятят 1—2 мин., после чего в каждую пробирку прибавляют по 2—3 капли раствора уксуснокислого свинца.

В пробирке с яичным (или растительным) белком появляется буровато-черное или черное окрашивание, интенсивность которого зависит от концентрации раствора белка и содержания в нем цистеина и цистина. Раствор желатина окрашивания не дает. Это свидетельствует о том, что в состав желатина не входят серусодержащие аминокислоты.



Диализ белков

С помощью диализа очищают высокомолекулярные растворы белковых веществ от примеси низкомолекулярных соединений (солей, Сахаров и др.).

Р е а к т и в ы: а) раствор яичного белка с хлористым натрием (приготовление — см. с. 6); б) азотнокислое серебро, 0,5%-ный раствор (в склянке темного стекла); в) азотная кислота, 10%-ный раствор; г) едкий натр, 10%-ный раствор; д) сернокислая медь, 1%-ный раствор.

В мешочек из целлофана или коллодия (или в высушенный пузырь теленка, поросенка) наливают до половины раствор яичного белка (с хлористым натрием). Мешочек подвешивают на стеклянной палочке и

погружают в стакан с дистиллированной водой. Диализ проводят при комнатной температуре. Через 40—60 мин. Из стакана берут в две пробирки по 2 мл воды. В одной пробирке проводят реакцию на ионы хлора, для чего воду подкисляют несколькими каплями 10%-ного раствора азотной кислоты и добавляют 2—3 капли раствора азотнокислого серебра, выпадает белый осадок хлористого серебра. С пробой во второй пробирке производят биуретовую реакцию. Если диализ проводится правильно, биуретовая реакция будет отрицательной.

Диализ можно ускорить, периодически меняя воду в стакане (через каждые 15—20 мин.) или же используя проточный диализатор.

Диализ проводят до получения отрицательной реакции на ионы хлора.

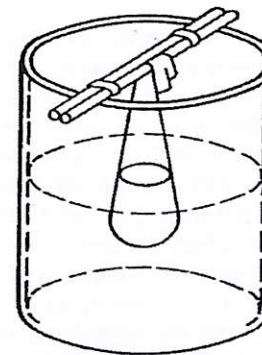


Рис. 1. Простейший диализатор.

Примечания: 1. Для приготовления мешочков рекомендуется разрезать целлофан на куски размером 12,5X 12,5 см.

2. Для приготовления мембраны из коллодия в чисто вымытую и высушенную круглодонную колбу емкостью 50 мл или большую пробирку наливают коллодий (4% -ный раствор нитроклетчатки в смеси эфира со спиртом) и почти сразу же выливают обратно в склянку.

Медленно вращая колбу или пробирку, равномерно распределяют остатки коллодия по ее стенкам. Сосуд оставляют на несколько минут до исчезновения запаха эфира, после чего 2—3 раза ополаскивают небольшими порциями дистиллированной воды (по 5—8 мл) для удаления следов спирта.

Во время ополаскивания пленка начинает отслаиваться от стенок сосуда, тогда ее осторожно отделяют пинцетом. Чтобы ускорить отделение, осторожно наливают воду между отслоившейся пленкой и стенкой сосуда.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ. РЕАКЦИИ ОСОЖДЕНИЕ БЕЛКОВ

Многие факторы влияют на физико-химические свойства белковых веществ, вызывают изменения структуры макромолекул. Данный процесс известен как денатурация. При денатурации нарушается вторичная

-3044-

конформация белковой макромолекулы. Эти изменения касаются в первую очередь вторичной и третичной структуры без нарушения при этом ковалентных (пептидных) связей.

Факторы, вызывающие денатурацию, можно разделить на две группы: физические и химические. К физическим относятся высокая температура, механические воздействия, обработка ультразвуком, действие ионизирующих излучений; к химическим — осаждение ионами тяжелых металлов, минеральными и органическими кислотами, нейтральными солями аммония, щелочных и щелочноземельных металлов; органическими растворителями, алкалоидными реактивами. Аналогичное по результатам действие оказывают детергенты, мочевины, некоторые красители.

Механизм действия некоторых физических факторов следует рассматривать как комбинированный, например, воздействие ультразвуковых волн и ионизирующих излучений приводит также к химическим изменениям белковых макромолекул.

Реакции осаждения белков бывают обратимыми и необратимыми.

При обратимом осаждении макромолекулы белка в основном не подвергаются глубокой денатурации, а осадки могут быть снова растворены в первоначальном растворителе (например, воде). Обратимое осаждение вызывается действием нейтральных солей аммония, щелочных и щелочноземельных металлов (высаливание), спирта, ацетона, эфира и некоторых других органических растворителей.

При необратимом осаждении происходит глубокая денатурация белка, он теряет свойства гидрофильности и становится гидрофобным. Денатурированный белок не способен к восстановлению своих первоначальных физико-химических и биологических свойств. Необратимое осаждение вызывается высокой температурой, действием концентрированных минеральных и некоторых органических кислот, ионов тяжелых металлов, алкалоидных реактивов, детергентов, красителей.

Осаждение белков солями щелочных и щелочноземельных металлов (высаливание). Соли нейтральные аммония, щелочных и щелочноземельных металлов — Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , MgSO_4 и другие нейтрализуют заряд белковых частиц и вызывают их дегидратацию, что ведет к выпадению в осадок. Этот способ осаждения белков называют высаливанием. Высаливание — обратимый процесс. Осадок можно снова растворить в воде, при этом наблюдается значительная степень восстановления свойств белков (например, ферментативной активности, антигенных свойств и т. д.). Высаливанием пользуются для разделения белковых фракций, очистки белков, получения их в кристаллическом виде.

Реактивы: а) раствор яичного белка с хлористым натрием (приготовление — см. с. 6); б) хлористый натрий, кристаллический, тонко растертый порошок (в виде пудры); в) сернокислый аммоний, кристаллический, тонко растертый порошок; г) сернокислый аммоний,

насыщенный раствор; д) сернокислый магний, кристаллический, тонко растертый порошок; е) уксусная кислота, 1%-ный раствор; ж) едкий натр, 10%-ный раствор; з) сернокислая медь, 1%-ный раствор.

Осаждение сернокислым аммонием. В пробирку наливают 2—3 мл раствора белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония и перемешивают. Выпадает осадок глобулинов, альбумины остаются в растворе. Осадок отфильтровывают через бумажный фильтр.

К фильтрату добавляют тонко растертый порошок сернокислого аммония до получения насыщенного раствора (последняя порция соли уже не растворяется). Выпадает осадок альбуминов, который также отфильтровывают.

С фильтратом проводят биуретовую реакцию. Если произошло полное осаждение белков, она должна быть отрицательной.

Осаждение сернокислым магнием или хлористым

натрием. В 2 пробирки наливают по 2—3 мл раствора яичного белка и добавляют (до получения насыщенного раствора) в одну пробирку порошок хлористого натрия, в другую — сернокислого магния. Через 5—6 мин. в пробирках замечается выпадение осадков (глобулины). Альбумины в нейтральных растворах солей щелочных и щелочноземельных металлов не осаждаются.

Содержимое пробирок отфильтровывают через бумажные фильтры. В фильтрах — альбумины. Фильтраты подкисляют 1%-ным раствором уксусной кислоты — появляются осадки альбуминов. Их отфильтровывают, а в фильтрах с помощью биуретовой реакции доказывают отсутствие белка. Осаждение белков путем высаливания применяется в промышленности.

Осаждение белков органическими растворителями. Органические растворители (спирт, эфир, ацетон и др.) вызывают дегидратацию белковых макромолекул, разрушают их водные оболочки (гидросферы), что понижает устойчивость белков в растворе и ведет к выпадению в осадок. Лучше всего происходит осаждение белков из нейтрального или слабокислого раствора, в щелочных растворах осаждение органическими растворителями затормаживается. Способствует осаждению также присутствие электролитов (например, хлористого натрия) в растворе.

Осаждение белков спиртом обратимо при условии, если процесс проводили без нагревания и воздействие реагента было кратковременным. Продолжительный контакт белка со спиртом ведет к необратимому осаждению, денатурации.

Реактивы: а) раствор яичного белка (без добавления хлористого натрия); б) этиловый спирт (или ацетон); в) хлористый натрий, кристаллический.

В пробирку наливают 1—2 мл раствора яичного белка, добавляют немного порошка хлористого натрия (на кончике шпателя) и взбалтывают до растворения. По каплям приливают 4—6 мл этилового спирта, сильно взбалтывают. Через 5—8 мин. выпадает осадок белка.

Сразу же после появления осадка отливают часть содержимого пробирки (с осадком) в другую, добавляют несколько миллилитров дистиллированной воды. Концентрация спирта падает, а белок снова переходит в раствор.

Тепловая денатурация белков. Свертывание большинства белков начинается уже при температуре 50—55°C. Воздействие высокой температуры ведет к тепловой денатурации белков, в результате которой происходят необратимые изменения физико-химических и биологических свойств макромолекул. Нагревание вызывает разрыв дисульфидных связей между полипептидными цепями, что приводит к их раскручиванию и изменению конформации макромолекул. При кратковременном нагревании (при относительно невысоких температурах) денатурация может и не произойти или проявиться в слабой степени, дальнейшее же повышение температуры (а особенно при кипячении) ведет к быстрому свертыванию белка.

На скорость и интенсивность процесса тепловой денатурации оказывают большое влияние pH раствора и добавление электролитов. Быстро и наиболее полно белки свертываются в изоэлектрической точке. Сдвиги pH в кислую и щелочную стороны затормаживают процесс осаждения белков. В сильно кислых и сильно щелочных растворах осаждения белков при кипячении практически не происходит. При добавлении кислот молекулы белка заряжаются положительно, в щелочных растворах они приобретают отрицательные заряды.

Прибавление электролитов (например, хлористого натрия) ускоряет процесс коагуляции даже в кислой среде.

Реактивы: а) раствор яичного белка (без добавления хлористого натрия); б) раствор растительных белков; в) уксусная кислота, 1%-ный раствор; г) уксусная кислота, 10%-ный раствор; д) едкий натр, 10%-ный раствор; е) хлористый натрий, насыщенный раствор.

В пять пробирок наливают по 1—2 мл раствора яичного или растительного белка. Белок в первой пробирке нагревают до кипения: раствор мутнеет (разрушаются гидратные оболочки вокруг белковых частиц), но осадок не выпадает, так как мицеллы сохраняют одноименные заряды, что препятствует их коагуляции.

К раствору белка во второй пробирке добавляют одну каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают: осадок белка выпадает быстро, поскольку заряд мицелл нейтрализован и белок близок к изоэлектрическому состоянию.

К раствору белка в третьей пробирке прибавляют 5—8 капель 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения: осадок не образуется, так как мицеллы

белка приобрели положительные заряды, что является стабилизирующим фактором и препятствует коагуляции.

В четвертую пробирку добавляют 5—8 капель 10%-ного раствора едкого натра и нагревают до кипения: осадок не выпадает, поскольку мицеллы заряжены отрицательно.

В пятую пробирку прибавляют 4—5 капель 10%-ного раствора уксусной кислоты и 5—6 капель насыщенного раствора хлористого натрия, нагревают до кипения — белок выпадает в осадок.

Осаждение белков минеральными кислотами. Концентрированные минеральные кислоты (азотная, серная, соляная) вызывают резкую дегидратацию белковых частиц и нейтрализацию их заряда, при этом происходит образование комплексных соединений. Все это ведет к необратимой денатурации белка. Ортофосфорная кислота не образует осадков с белками.

Осадки, вызванные действием минеральных кислот, растворяются в избытке серной и соляной кислот, но не растворяются в азотной.

Р е а к т и в ы: а) раствор яичного белка; б) раствор растительного белка; в) серная кислота, концентрированная; г) азотная кислота, концентрированная; д) соляная кислота, концентрированная.

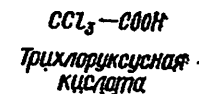
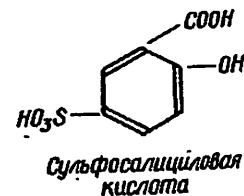
В три пробирки наливают по 1 мл кислот: в первую — серной, во вторую — азотной, в третью — соляной. Пробирки наклоняют под углом 45° и осторожно (из пипетки) наслаивают по стенке раствор белка (пробирку держат отверстием от себя). На границе белка и кислоты появляется белое кольцо.

Пробирки осторожно встряхивают и добавляют в первую — избыток серной, во вторую — азотной, в третью — соляной кислоты. Осадки белка растворяются в серной и соляной кислотах, но не растворяются в азотной.

Реакция находит применение для быстрого ориентировочного определения белка в биологических жидкостях (например, в моче).

Осаждение белков органическими кислотами. Органические кислоты необратимо осаждают белок из растворов. Различные кислоты отличаются по силе действия.

Наиболее эффективно и специфично действие сульфо-салициловой и трихлоруксусной кислот.



Под действием трихлоруксусной кислоты осаждаются только белки, сульфосалициловая же кислота, кроме белков, осаждают также высокомолекулярные продукты их распада — пептоны и полипептиды.

Р е а к т и в ы: а) раствор яичного белка; б) раствор растительного белка; в) сульфосалициловая кислота, 10%-ный раствор; г) трихлоруксусная кислота, 10%-ный раствор.

В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка и добавляют в первую 5—8 капель раствора сульфосалициловой, а во вторую — столько же раствора трихлоруксусной кислоты. В обеих пробирках белок выпадает в осадок.

Осаждение белков солями тяжелых металлов.

Белки осаждаются солями меди, свинца, ртути, цинка, серебра и других тяжелых металлов.

Характер взаимодействия белков с ионами тяжелых металлов сложен и многогранен. Это прежде всего образование комплексных соединений, нерастворимых в воде, но растворяющихся в избытке соли (кроме AgNO_3 и HgCl_2); соли тяжелых металлов, адсорбируясь на белковых мицеллах, изменяют их электрический заряд (вплоть до полной нейтрализации). Денатурация белков солями тяжелых металлов вызывается глубокими нарушениями вторичной и третичной структур макромолекул белка, изменением положения пептидных цепей, которое обуславливается в основном разрывом связей между ними (главным образом дисульфидных). Дисульфидным связям принадлежит видная роль в поддержании вторичной и третичной структур белка. Разрыв их влечет за собой изменение структур — необратимую денатурацию белка.

Растворение осадка белков в избытке соли объясняется явлением адсорбционной пептизации. Ионы металла, адсорбируясь на поверхности белковых мицелл, придают им положительные заряды. Одноименно заряженные мицеллы отталкиваются, что способствует их переходу из осадка в раствор.

Р е а к т и в ы: а) раствор яичного белка; б) раствор растительного белка; в) уксуснокислый свинец, 5%-ный раствор; г) азотнокислое серебро, 2,5%-ный раствор; д) хлорное железо, 5%-ный раствор, е) сернокислая медь, 5%-ный раствор.

В четыре пробирки наливают по 1—2 мл раствора белка и по каплям добавляют растворы солей: в первую — уксуснокислого свинца, во вторую — сернокислой меди, в третью — хлорного железа, в четвертую — азотнокислого серебра (до выпадения осадков). Затем прибавляют избыток указанных реактивов и наблюдают растворение осадков в первых трех пробирках. Осадок, вызванный прибавлением азотнокислого серебра, не растворяется в избытке соли.

Свойство белков связывать ионы тяжелых металлов используется в медицине при оказании первой помощи пострадавшим от отравления солями меди, свинца, ртути и др.

Осаждение белков реактивами на алкалоиды. Алкалоиды — азотсодержащие вещества основного характера, обладающие сильным физиологическим действием. В большинстве своем являются гетероциклическими соединениями, производными пиридина,

пиррола, пирролидина, хинолина, индола, пурина и др. К алкалоидам относятся, например, морфин, папаверин, атропин, кофеин, эфедрин и ряд других соединений, которые находят широкое применение в лечебной практике.

Многие так называемые общие реактивы на алкалоиды вызывают также осаждение белковых веществ. К ним относятся: танин, раствор йода в йодистом калии (реактив Бушарда), раствор йодистого висмута в йодистом калии (реактив Драгендорфа), пикриновая кислота и др.

Осаждение белковых веществ общими реактивами на алкалоиды обусловлено тем, что в состав аминокислот и алкалоидов входят сходные гетероциклические группировки (индольные, имидазольные, пирролидиновые и др.).

Алкалоидные реактивы образуют нерастворимые соединения с белками. Слабое подкисление органической кислотой (например, уксусной) благоприятствует реакции и, наоборот, добавление сильных минеральных кислот затормаживает этот процесс. Осадки растворяются в щелочной среде.

Р е а к т и в ы: а) раствор яичного (или растительного) белка; б) пикриновая кислота, 1%-ный раствор; в) танин, свежеприготовленный 10%-ный раствор; г) реактив Бушарда: 1 г йода, 2 г йодистого калия, 50 мл воды. Йодистый калий (йодид калия) растворяют в нескольких миллилитрах воды. В концентрированном растворе соли растворяют йод и затем доливают остальное количество воды; д) реактив Драгендорфа (раствор йодистого висмута в йодистом калии). 13,5 г йодистого калия (йодида калия) растворяют в 20 мл воды. Отдельно готовят раствор 2,5 г основного азотнокислого висмута в 10 мл азотной кислоты ($\rho_{20}=1,1820$). Смешивают оба раствора и оставляют (в склянке темного стекла) на 2—3 дня. На дно сосуда выпадают кристаллы азотнокислого калия. Прозрачный раствор осторожно сливают с осадка и доводят его объем водой до 50 мл. Хранят в склянке темного стекла; е) уксусная кислота, 1%-ный раствор.

В четыре пробирки наливают по 1—2 мл раствора белка. В каждую пробирку добавляют по 3 капли 1%-ного раствора уксусной кислоты, после чего в первую пробирку приливают 4—5 капель раствора пикриновой кислоты, во вторую — 2—3 капли раствора танина, в третью — 2—3 капли реактива Бушарда, в четвертую — столько же реактива Драгендорфа.

Наблюдают выпадение осадков.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ БЕЛКА

В изоэлектрической точке растворы белков неустойчивы. Молекулы белка с одинаковым количеством положительных и отрицательных зарядов легко выпадают в осадок. Значение рН, соответствующее изоэлектрической точке, является характерным для каждого белка. Например, для казеина рН равно 4,7, для яичного альбумина — 4,8,

желатина — 4,9, зеина (кукурузного белка) — 6,2; у протаминов и гистонов изоэлектрическая точка лежит в слабощелочной среде.

Выпадение белка в осадок в изоэлектрической точке можно ускорить добавлением водоотнимающих веществ (спирта, ацетона, эфира) или танина. Одни из них (органические растворители) уменьшают степень гидратации белковых макромолекул, разрушают их водные оболочки, другие, как, например, танин, образуют нерастворимые в воде соединения с азотистыми гетероциклическими группировками.

Р е а к т и в ы: а) желатин, 0,5%-ный раствор; б) уксусная кислота, 0,1 н раствор; в) уксуснокислый натрий, 0,1 н раствор; г) этиловый спирт, 96%-ный; д) танин, 0,1%-ный раствор.

В пять пробирок наливают растворы уксусной кислоты и уксуснокислого натрия в количествах, указанных в табл. 1, после чего в каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора желатина и хорошо перемешивают, затем прибавляют по 4 мл этилового спирта (или по 1 мл раствора танина) и снова перемешивают. Через 5—10 мин. просматривают все пробирки и оценивают степень мутности смеси в каждой из них. pH наиболее мутной смеси соответствует изоэлектрической точке желатина. Результаты опыта записывают в таблицу, которую составляют по образцу табл. 1.

Табл. 1. Определение изоэлектрической точки белка

№ пробирки	Состав буферной смеси, мл		pH смеси	0,5%-ный раствор желатина, мл	Этиловый спирт, мл	Степень мутности (по пятибалльной системе)
	0,1 н CH_3COOH	0,1 н CH_3COONa				
1	1,8	0,2	3,8	1	4	1
2	1,4	0,6	4,4	1	4	3
3	1,0	1,0	4,7	1	4	5
4	0,6	1,4	5,1	1	4	4
5	0,2	1,8	5,7	1	4	3

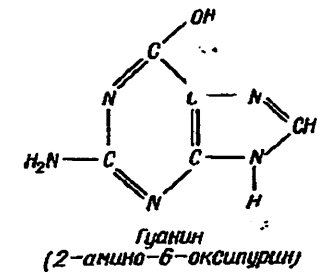
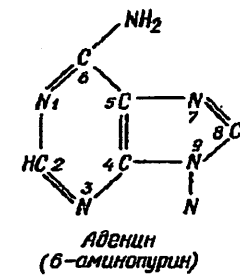
НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды играют огромную и разностороннюю роль в сохранении и передаче генетической информации и регулировании важнейших биосинтетических процессов в организме. Нуклеопротеиды — сложные белки, молекулы которых построены из простых белков (гистонов, протаминов, реже альбуминов и глобулинов), связанных с нуклеиновыми кислотами.

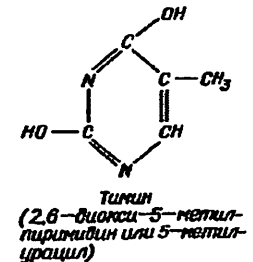
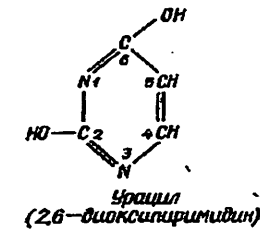
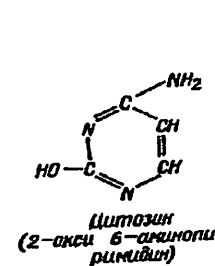
Нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды) — полимеры, построенные из нуклеотидов. В состав нуклеотидов входят азотистые основания (производные пурина или пиримидина), углеводный компонент — пентоза (рибоза или дезоксирибоза) и остатки фосфорной кислоты. В зависимости от пентозы, входящей в их состав, нуклеиновые кислоты делят на две большие группы: рибонуклеиновые (РНК) и дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК). Молекулы РНК содержат рибозу, в состав молекул ДНК входит дезоксирибоза.

Структурными звеньями нуклеиновых кислот являются нуклеотиды. При гидролизе нуклеотидов освобождаются: азотистые основания пуринового или пиримидинового ряда, пентоза и фосфорная кислота.

Пуриновые основания



Пиримидиновые основания



В состав РНК входят аденин, гуанин, цитозин и урацил, в молекулах ДНК находим те же азотистые основания, но место урацила занимает тимин. У ДНК молярная сумма пуриновых оснований равна молярной сумме пиримидиновых

$$\frac{\text{Гуанин} + \text{аденин}}{\text{Цитозин} + \text{тимин}} = 1.$$

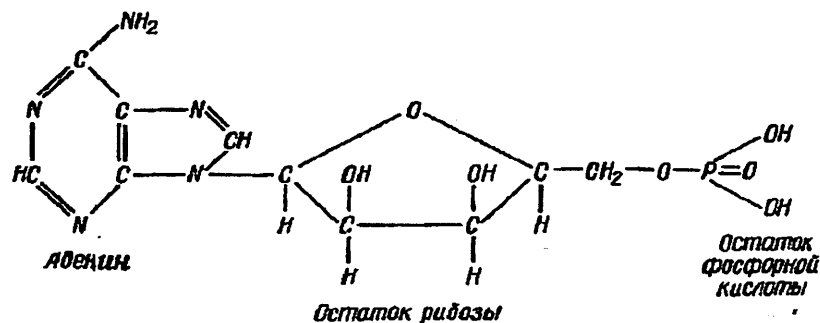
У РНК нет такой отчетливой закономерности, и отношение пуриновых и пиримидиновых оснований в значительной степени изменчиво.

Для молекул ДНК характерен коэффициент видовой специфичности, который определяется соотношением азотистых оснований

$$\frac{\text{Гуанин} + \text{цитозин}}{\text{Аденин} + \text{тимин}}$$

Молекулы ДНК отличаются отчетливо выраженной видовой специфичностью, тогда как у РНК это свойство выражено значительно слабее.

Названия нуклеотидов образуются по азотистым основаниям, которые входят в их состав. Так, нуклеотиды, содержащие аденин, называются адениловыми кислотами, гуанин — гуаниловыми, цитозин — цитидиловыми, тимин — тимидиловыми, урацил — уридиловыми. Например, адениловая (аденозин-монофосфорная кислота)



РНК преимущественно содержатся в органоидах клеток (митохондриях, рибосомах и т. д.), меньше — в ядре и ядрышке. ДНК главным образом находятся в ядре. ДНК является основным веществом, из которого состоят гены.

Нуклеотиды соединены между собой в линейном порядке через фосфорные и пентозные группировки.

Основу строения молекул ДНК и РНК составляют полинуклеотидные цепи. Различают первичную, вторичную и третичную структуры нуклеиновых кислот.

Под первичной структурой понимают порядок чередования нуклеотидных остатков в полинуклеотидных цепях.

Вторичной структурой нуклеиновых кислот называют конфигурацию полинуклеотидных цепей, т. е. их спирализацию. Вторичная структура молекулы ДНК представляет собой двойную спираль, состоящую из двух поли-дезоксирибонуклеотидных цепей, одновременно спирализованных друг около друга. В молекулах РНК спирализация происходит в пределах одной полирибонуклеотидной цепи, причем свернуто в спираль лишь около 40—60% ее.

Устойчивость вторичной структуры нуклеиновых кислот обеспечивается главным образом водородными связями, образующимися между двумя парами азотистых оснований: в молекулах ДНК — аденин — тимин и гуанин — цитозин, в молекулах РНК — аденин — урацил и гуанин — цитозин. Такие пары азотистых оснований, в которых они соединены водородными связями, называют комплементарными.

Третичной структурой считают конфигурации, которые могут принимать спирализованные полинуклеотидные цепи в пространстве. Особенно полиморфна третичная структура РНК (развернутая полирибонуклеотидная цепь, компактная структура-палочка, клубок и т. д.). Третичная структура ДНК проявляется в виде спирализации второго порядка (например, в хромосомах) либо клубков двойных спиралей.

Выделение дезоксирибонуклеопротеидов из печени или селезенки
Нуклеопротеидами богаты печень, селезенка, поджелудочная железа, почки, дрожжи. Они растворяются в разбавленных растворах щелочей и выпадают в осадок при подкислении раствора. Дезоксирибонуклеопротеиды хорошо растворяются также в солевых растворах.

Реактивы и материалы: а) печень или селезенка крупного рогатого скота или свиньи, свежие или замороженные; б) хлористый натрий, 5% ный раствор; в) деревянная палочка с насечками.

2—2,5 г печени или селезенки нарезают на маленькие кусочки и затем растирают в ступке с 5%-ным раствором хлористого натрия, добавив немного стеклянного порошка. Раствор соли добавляют небольшими порциями (по 10—15 мл), всего расходуют его около 80 мл.

Растирают 12—15 мин. до получения гомогенной массы. Содержимое ступки разливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 10—15 мин. (при 2500 оборотах в минуту), после чего измеряют объем центрифугата (сливая его в стеклянный цилиндр).

В стакан наливают дистиллированную воду (объем которой должен быть в шесть раз больше объема центрифугата) и, медленно помешивая в стакане деревянной палочкой, вливают в воду центрифугат. Дезоксирибонуклеопротеиды выпадают в виде нитей, которые наматывают на палочку.

Выделение нуклеопротеидов из дрожжей

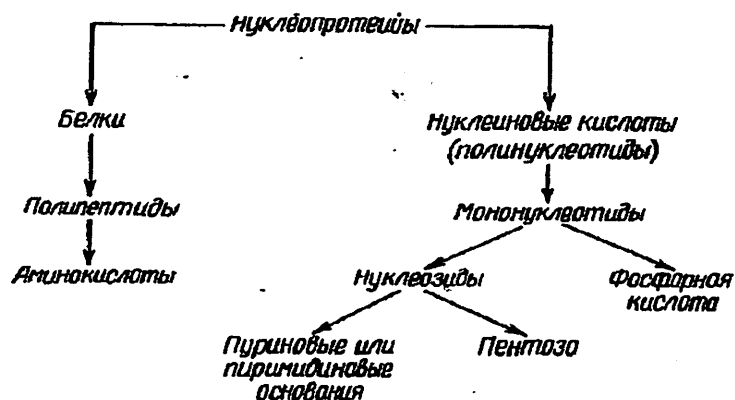
Реактивы и материалы: а) дрожжи пекарские, прессованные; б) диэтиловый эфир; в) едкий натр, 0,4%-ный раствор; г) уксусная кислота, 5%-ный раствор; д) стеклянный порошок или речной песок, тщательно промытый и прокаленный.

5 г дрожжей увлажняют в ступке 1 мл диэтилового эфира и 1 мл воды, добавляют немного стеклянного порошка или песка и растирают с 0,4%-ным раствором едкого натра, приливая его небольшими порциями (по 5—10 мл). Всего расходуют до 50 мл раствора щелочи; растирание продолжают в течение 15—20 мин. Содержимое ступки фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют в течение 10 мин. (при 2500 оборотах в минуту). Фильтрат или центрифугат переливают в стакан и к нему по каплям добавляют 5%-ный раствор уксусной кислоты до полного осаждения нуклеопротеида (обычно расходуют 10—15 мл раствора).

Осадок отделяют центрифугированием.

Гидролиз нуклеопротеидов

Гидролиз нуклеопротеидов происходит при кипячении с разбавленной серной кислотой. Этот процесс можно представить следующей схемой:



Реактивы и материалы: а) осадок нуклеопротеидов (см. предыдущую работу); б) серная кислота, 5%-ный раствор; в) серная кислота, концентрированная; г) едкий натрий, 10%-ный раствор; д) аммиак, концентрированный раствор (20—25%-ный); е) сернокислая медь, 1%-ный раствор; ж) тимол, 1%-ный спиртовой раствор; з) аммиачный

раствор окиси серебра: к 1—2%-ному раствору азотнокислого серебра добавляют концентрированный раствор аммиака до растворения образующегося вначале осадка; и) молибденовый реактив: 3,75 г молибденовокислого аммония растворяют в 50 мл воды и добавляют 50 мл 32%-ной азотной кислоты ($\rho_{20} = 1,200$). Полное растворение соли происходит только после прибавления азотной кислоты.

Осадок нуклеопротеидов переносят в круглодонную колбу, смывая его 5%-ной серной кислотой. Остаток кислоты вливают в колбу с осадком. Всего расходуют не более 20—25 мл раствора. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником, ставят на асбестовую сетку, нагревают на малом огне до кипения и кипятят 1—1,5 ч, после чего охлаждают и гидролизат фильтруют через бумажный фильтр. С фильтратом прodelьвают реакции на полипептиды, пуриновые основания, пентозы и фосфорную кислоту.

Примечание. Гидролитическое расщепление нуклеопротеидов можно производить и без выделения их из дрожжей.

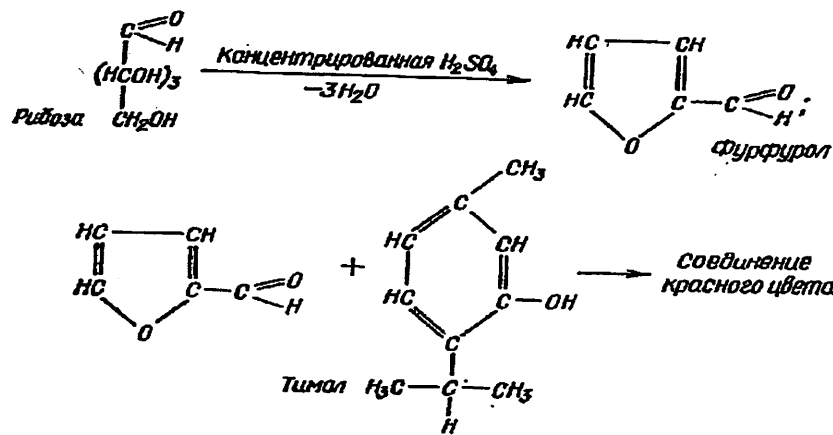
Отвешивают 1 г прессованных дрожжей, переносят навеску в круглодонную колбу, вливают 30—40 мл 5%-ного раствора серной кислоты, закрывают колбу пробкой с воздушным холодильником, нагревают на малом огне до кипения, подложив под колбу асбестовую сетку. Кипятят 1—1,5 ч, после чего колбу охлаждают, содержимое ее фильтруют через бумажный фильтр. С фильтратом прodelьвают перечисленные ниже реакции.

Исследование продуктов гидролиза нуклеопротеидов

Открытие полипептидов. С частью фильтрата (1—2 мл) прodelьвают биуретовую реакцию.

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

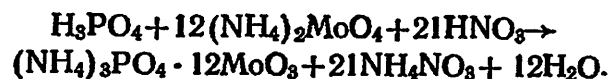
Открытие пентоз. Открытие пентоз основано на реакции с тимолом и концентрированной серной кислотой. Серная кислота вызывает дегидратацию пентоз и образование фурфурола, который с тимолом дает соединения красного цвета (продукты конденсации).



К 1 мл фильтрата добавляют 2—3 капли 1%-ного спиртового раствора тимола и по стенке пробирки осторожно настилают 1 мл концентрированной серной кислоты. Жидкость окрашивается в красный цвет. Окраска более выражена на границе раздела слоев.

Пентозы можно обнаружить также с помощью реакций с орцином, флороглюцином или фелинговой жидкостью.

Открытие фосфорной кислоты. Фосфорная кислота образует с молибденовым реактивом желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония:



К 1—2 мл фильтрата приливают равный объем молибденового реактива, нагревают до кипения и кипятят 2—3 мин. Появляется желтое окрашивание, обусловленное образованием фосфорномолибденовокислого аммония. При стоянии выпадает желтый осадок.

ВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ СВОЙСТВА МОНОСАХАРИДОВ И ДИСАХАРИДОВ

Значение углеводов в жизни животных и растений весьма велико. Оно сводится не только к энергетической и структурным функциям.

Углеводы выполняют в живых организмах и ряд специализированных ролей. Так, пентозы рибоза и дезоксирибоза входят в состав важнейших биологически активных веществ — нуклеиновых кислот, нуклеотидов и нуклеозидов. Углеводы являются важными составными частями молекул многих антибиотиков (стрептомицинов, неомицинов, линкомицина, новобиоцина и др.). Они играют большую роль в явлениях иммунитета: многие микробные антигены, вызывающие образование антител, относятся к углеводам (полисахаридам). В качестве антител выступают гликопротеиды — комплексные соединения углеводов с белками.

Наличие групп крови также связано с гликопротеидами, особенно с их углеводными (олигосахаридными) остатками. Наконец следует подчеркнуть, что вещества, обладающие исключительно важным физиологическим значением, как антикоагулянт гепарин, гиалуроновая кислота, играющая значительную роль в защите от проникновения болезнетворных микроорганизмов, и другие, также относятся к углеводам.

Некоторые производные углеводов обладают витаминным действием, например витамин С (аскорбиновая кислота), витамин В₁₅ (пангамовая кислота).

Углеводы классифицируют по их способности к гидролизу. Простые углеводы — моносахариды или монозы — гидролизу не подвергаются. Сложные углеводы способны гидролитический расщепляться до моносахаридов.

Углеводы делят на три группы:

- 1) моносахариды, или монозы;
- 2) олигосахариды, или кристаллические полисахариды, молекулы которых состоят из 2—10 остатков моноз;
- 3) высшие, или коллоидные, полисахариды (полиозы), в состав которых входят более 10 остатков моносахаридов. Моно- и олигосахариды образуют в воде истинные растворы, из которых способны кристаллизоваться. Они обладают сладким вкусом. Высшие полисахариды относятся к высокомолекулярным веществам. В отличие от моно- и олигосахаридов их называют коллоидными или некристаллизующимися углеводами.

Моносахариды — альдегиды или кетоны многоатомных спиртов с числом углеродных атомов от 2 до 9. В соответствии с характером функциональных групп моносахариды делят на альдегидоспирты, или альдозы, и кетоноспирты, или кетозы.

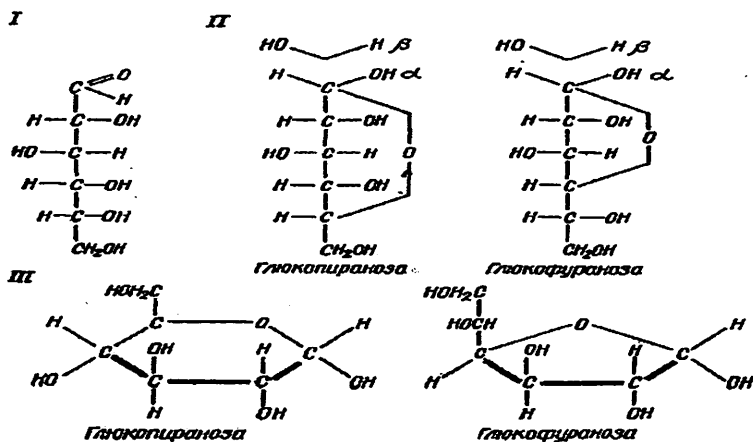
В зависимости от числа атомов углерода в молекуле моносахариды подразделяют на биозы (2 атома углерода), триозы (3), тетразы (4), пентозы (5), гексозы (6), гептозы (7), октозы (8), нонозы (9 атомов углерода).

Из олигосахаридов наибольшее значение имеют дисахариды — сахароза, лактоза и мальтоза. Молекула сахаразы (свекловичный сахар) при гидролизе распадается на молекулу глюкозы и молекулу фруктозы. При расщеплении лактозы (молочного сахара) освобождаются молекула глюкозы и молекула галактозы, а при гидролитическом распаде молекулы мальтозы образуются две молекулы глюкозы.

Функции полисахаридов весьма разнообразны. Некоторые из них (крахмал, гликоген, инулин) являются энергетическими резервами организма, другие же (клетчатка, гемицеллюлоза, хитин) имеют структурные, опорные функции.

Свойства углеводов связаны с их строением. Представления о строении углеводов со временем претерпели ряд изменений. Так, наиболее распространенная формула; α -глюкозы, по Фишеру, не объясняет многообразия её свойств, прежде всего явления мутаротации, т.е. постепенного изменения угла вращения поляризованного луча света свежеприготовленными растворами, обусловленного наличием двух аномеров — α -глюкозы и β -глюкозы. Более рациональными оказались формулы, отражающие полуацетальную циклическую структуру молекул моносахаридов.

Формулы глюкозы: I — по Фишеру; II — по Колли и Толленсу; III — по Хеурсу:



В последнее время уделяется большое внимание изучению конформаций моносахаридов, т. е. тех форм, которые возникают в результате изменения взаимного положения отдельных частей молекулы. При конформациях не нарушаются связи, соединяющие атомы, чем

образование конформационных форм (конформеров) отличается от процесса изомеризации.

В конформационных формах различают два вида расположения связанных с углеродами атомов — экваториальные и аксиальные. Экваториальные атомы располагаются в одной, «усредненной», плоскости шестичленного углеродного кольца, а аксиальные занимают перпендикулярное положение к плоскости молекулы. Преобладание экваториальных атомов наблюдается у глюкозы, в молекуле которой все основные объемные группы занимают экваториальные положения. У других гексоз не менее одной объемной группы находится в аксиальном положении. Вот почему глюкоза является наиболее стабильным по структуре моносахаридом.

Исследование восстанавливающих свойств дисахаридов

Реактивы: а) мальтоза, 2%-ный раствор; б) лактоза, 2%-ный раствор; в) сахароза, 2%-ный раствор; г) реактивы Бенедикта, Ниландера, фелингова жидкость; реактивы для реакции Троммера.

В пробирки вносят по 3—4 мл растворов мальтозы, лактозы, сахаразы и производят с ними реакции Бенедикта, Ниландера, Троммера, с фелинговой жидкостью. Мальтоза и лактоза обладают восстанавливающими свойствами, сахараза, как уже было указано, лишена этой способности.

ЛИПИДЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА ЛИПИДОВ

Под общим названием «липиды» объединяют большую группу нейтральных жиров и жироподобных веществ (или липоидов). Свойством, общим для всех этих соединений, является их растворимость в органических растворителях (бензоле, петролейном эфире, бензине, хлороформе, ацетоне, диэтиловом эфире, сероуглероде и др.) и нерастворимость в воде.

По химической природе липиды делят на следующие группы: а) жиры (нейтральные жиры), или триглицериды; б) высокомолекулярные жирные кислоты; в) фосфатиды (или фосфолипиды); г) цереброзиды; д) стерины и стериды; е) ганглиозиды; ж) воска и воскоподобные вещества.

Жиры и липоиды играют огромную роль в жизнедеятельности человека и животных.

Жиры — важный энергетический резерв организма (так называемый запасной или резервный жир). Они входят также в состав протоплазмы клеток, являясь структурными компонентами. Содержание резервного жира в организме зависит от уровня и характера питания, количество же протоплазм этического (или структурного) жира не убывает даже при сильном голодании и не увеличивается при патологическом ожирении.

Липоидам принадлежит весьма важная роль в процессах жизнедеятельности. Они встречаются во всех клетках и тканях организма, обычно сопутствуя жирам; особенно много их в нервной системе. Липоиды концентрируются на периферии клеток, образуя полупроницаемые мембраны, избирательно регулирующие поступление веществ в клетку и их отток.

Липиды в организме животных образуют комплексные соединения с белками — липопроотеиды.

Стерины входят в состав белого вещества головного мозга, участвуют в образовании ряда биологически активных веществ — витаминов, гормонов, желчных кислот и т. д.

Общие понятия. Жиры — сложные эфиры глицерина и высокомолекулярных жирных кислот.

В состав жиров входят многочисленные предельные (или насыщенные) и непредельные (или ненасыщенные) жирные кислоты. Среди предельных кислот чаще встречаются стеариновая ($C_{17}H_{35}COOH$) и пальмитиновая ($C_{15}H_{31}COOH$). Из непредельных жирных кислот основная роль принадлежит олеиновой ($C_{17}H_{33}COOH$), линолевой ($C_{17}H_{31}COOH$) и линоленовой ($C_{17}H_{29}COOH$), большое физиологическое значение имеет также арахидоновая ($C_{19}H_{31}COOH$) кислота. Непредельные жирные кислоты характеризуются наличием двойных связей: в молекуле

олеиновой кислоты содержится одна двойная связь, в молекуле линолевой — две, линоленовой — три, арахидоновой — четыре. Благодаря наличию двойных связей непредельные кислоты отличаются высокой реакционной способностью. Линолевая, линоленовая и арахидоновая (так называемые полиненасыщенные) кислоты не синтезируются в организме человека и должны поступать с пищей. Недостаток этих кислот в пище вызывает серьезные нарушения обмена веществ, исчезающие при потреблении продуктов, в состав которых входят непредельные жирные кислоты. Поэтому указанные соединения относят к веществам, обладающим витаминным действием (витамин F). Линолевая и линоленовая кислоты содержатся в растительных маслах (льняном, подсолнечном и др.), арахидоновая кислота — в печеночных жирах рыб, сливочном масле и некоторых видах маргарина.

В состав масел некоторых тропических растений входят также циклические жирные кислоты (хаульмугровая, гиднокарповая и др.).

Кислотное число

Кислотным числом называется количество миллиграммов едкого кали, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Р е а к т и в ы: а) едкое кали, 0,1 н спиртовой раствор; б) смесь этилового спирта с диэтиловым эфиром (1:1); в) фенолфталеин, 1%-ный спиртовой раствор; г) тимол-фталеин, 1 %-ный спиртовой раствор.

В сухую коническую колбу (емкостью 250 мл) отвешивают 3—5 г жира. Навеску растворяют в 50 мл предварительно нейтрализованной смеси спирта с эфиром.

Примечание. Смесь спирта с эфиром нейтрализуют 0,1 н спиртовым раствором едкого кали (в присутствии 3—4 капель раствора фенолфталеина) до слабозеленого окрашивания и лишь после этого вливают в колбу с навеской жира.

Раствор жира титруют 0,1 н спиртовым раствором едкого кали (индикатор — фенолфталеин) до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 0,5—1 мин.

При определении кислотного числа темноокрашенных жиров вместо фенолфталеина пользуются 1%-ным спиртовым раствором тимолфталеина (в кислой среде — бесцветен, в щелочной — голубое окрашивание). Кислотное число к. ч. вычисляют по формуле

$$К. ч. = \frac{в \cdot 5,611}{к}$$

где в — количество 0,1 н спиртового раствора едкого кали, израсходованное на титрование навески жира, мл; к — поправочный

коэффициент к титру 0,1 н раствора КОН; 5,611 — титр точно 0,1 н раствора КОН; n — навеска жира, г.

Для характеристики кислотности растительных масел, кроме кислотного числа, часто рассчитывают процентное содержание свободной олеиновой кислоты O по формуле

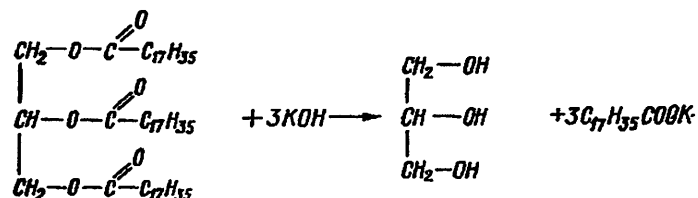
$$O = \text{к. ч.} \cdot 0,53,$$

где к. ч. — кислотное число масла, мг.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ЛИПИДНОГО НАСЫЩЕНИЯ

Определение количества глицерина в жире

Химическое определение содержания глицерина в жирах является довольно трудоемким и продолжительным. Сравнительно неплохие результаты дает расчетный метод. Зная эфирное число жира, можно вычислить содержание глицерина, приняв во внимание, что для высвобождения одной молекулы глицерина надо израсходовать три молекулы едкого кали



Процентное содержание глицерина в жире g рассчитывают по формуле

$$g = \frac{92,06 \cdot \text{э. ч.} \cdot 100}{56,11 \cdot 3 \cdot 1000},$$

где 92,06 — молекулярный вес глицерина; э. ч. — эфирное число жира; 56,11 — молекулярный вес едкого калия.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДНОГО ЧИСЛА ЛИПИДОВ

Йодное число

Общие сведения. Йодное число показывает количество граммов йода, которое присоединяется к 100 г жира. Оно свидетельствует о количественном содержании непредельных кислот в жире, что позволяет судить о его устойчивости к окислению, полимеризации и другим превращениям. Йодное число является показателем, характерным для каждого вида свежего жира.

Химизм процесса присоединения галоидов описан выше (см. «Проба на непредельные жирные кислоты»). Следует подчеркнуть, что йод присоединяется главным образом к двойным связям, тогда как более реакционно-способные галоиды — хлор и бром — могут также замещать атомы водорода в углеводородном радикале кислоты.

Наиболее точным является определение йодного числа по Гюблю, однако оно связано с применением весьма ядовитого реактива — сулемы (HgCb) и поэтому не может быть рекомендовано для студенческого практикума. Описываем более простой и быстрый метод определения йодного числа, применение которого не связано с использованием сулемы. Метод обладает вполне удовлетворительной точностью.

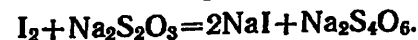
Определение йодного числа с бромистым йодом (по Ганусу). Бромистый йод образуется при взаимодействии йода с бромом в уксуснокислой среде.

Бромистый йод количественно присоединяется к непредельным жирным кислотам по месту двойных связей.

Избыток бромистого йода, не вошедший в реакцию, реагирует с йодистым калием по уравнению

$$z = \frac{92,06 \cdot \text{э. ч.} \cdot 100}{56,11 \cdot 3 \cdot 1000},$$

Выделившийся йод оттитровывают тиосульфатом



Р е а к т и в ы: а) растительное масло; б) реактив Гануса: 13 г кристаллического йода растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты (в мерной колбе емкостью 1 л). К раствору добавляют 8,2 г брома и доводят ледяной уксусной кислотой до 1 л. Хранят в склянке оранжевого стекла с притертой пробкой. Раствор готовится лаборантом (в вытяжном шкафу!); в) йодистый калий, 20%-ный раствор. Готовится непосредственно перед определением; г) тиосульфат натрия (гипосульфит, серноа-

тистокислый натрий), 0,1 н раствор; д) крахмал, 1%-ный раствор; е) хлороформ.

В сухую коническую колбу или склянку с притертой пробкой емкостью 250—300 мл отвешивают на аналитических весах 0,2—0,3 г масла и растворяют его в 10 мл хлороформа. В другую такую же колбу или склянку вносят 10 мл хлороформа без масла («слепой опыт»). В обе колбы из бюретки (со стеклянным краном) добавляют по 25 мл реактива Гануса. Сосуды плотно закрывают пробками, смоченными в растворе йодистого калия. Содержимое сосудов осторожно взбалтывают, после чего сосуды ставят в темное место на 1—1,5 ч. По истечении указанного времени в оба сосуда добавляют по 10 мл 20%-ного раствора йодистого калия и 50 мл воды и выделившийся йод оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата натрия до слабо-желтой окраски, потом добавляют 10—12 капель раствора крахмала и продолжают титрование до полного обесцвечивания раствора.

При расчетах принимают во внимание, что 1 мл 0,1 н раствора тиосульфата натрия соответствует 1 мл 0,1 н раствора йода. Йодное число и. ч. вычисляют по формуле где s — количество 0,1 н раствора тиосульфата, израсходованное на титрование контрольной пробы («слепой опыт»), мл; o — количество 0,1 н раствора тиосульфата, израсходованное при титровании опытного образца, мл; k — поправочный коэффициент к титру приблизительно 0,1 н раствора тиосульфата; 0,01269 — титр раствора тиосульфата по йоду; n — навеска масла, г.

ФЕРМЕНТЫ (ЭНЗИМЫ)

Ферменты (энзимы) — биологические катализаторы процессов обмена веществ. Они представляют собой высокомолекулярные соединения и относятся к простым или сложным белкам. По характеру своего действия ферментативный катализ чаще всего является гетерогенным (микрогетерогенным).

Обладая многими свойствами, сходными со свойствами неорганических катализаторов, ферменты характеризуются рядом особенностей, к которым следует отнести термоллабильность, большую зависимость их активности от pH среды, высокую специфичность (как групповую, так и индивидуальную, включая стереохимическую), огромную эффективность каталитического действия и др. Протекает ферментативный катализ с большой скоростью и в мягких условиях.

Активность ферментов в значительной мере зависит от состава среды. Многие химические вещества способны усиливать (активаторы) или затормаживать (ингибиторы) каталитическую активность ферментов.

Ферменты можно разделить на две большие группы: ферменты-протеины (простые белки) и ферменты-протеиды (сложные белки). К протеинам относятся многочисленные ферменты, катализирующие процессы гидролитического расщепления сложных соединений на более простые (например, пепсин, амилазы, уреазы и др.).

Ферменты-протеиды состоят из белковой части — апофермента и термостабильной небелковой — кофермента, или простетической группы. В большинстве своем коферменты — это сопряженные (резонансные) органические молекулы.

Многие простетические группы представляют собой производные витаминов (главным образом группы В). Часто роль кофермента играют металлы (железо, магний, медь, кобальт, цинк, марганец, молибден). Существуют, наконец, ферменты, у которых имеются две или несколько простетических групп. Например, у карбоксилазы, фермента, катализирующего реакцию декарбоксилирования пировиноградной кислоты, простетическими группами являются производное витамина В₁ (тиаминпирофосфат) и металл магний, который служит связующим звеном между белковой частью фермента и тиаминпирофосфатом (кокарбоксилазой). Схему строения фермента можно представить следующим образом:

тиаминпирофосфат — Mg — белок.

В названиях ферментов отражается не только характеристика катализируемой реакции, но и наименование субстрата, который подвергается превращению. Как правило, они состоят из двух частей. Первая указывает название субстрата или (при бимолекулярных реакциях) двух субстратов. Вторая часть названия с окончанием «аза»

характеризует природу реакции. Например, ферменты, катализирующие реакцию отщепления атомов водорода в молекулах органических соединений и их перенос на молекулы других веществ, называются дегидрогеназами (дегидрогенизация — отщепление водорода). Фермент, катализирующий указанный процесс у первичных и вторичных спиртов, носит название алкогольдегидрогеназы.

Наряду с рациональными названиями для ряда ферментов сохранились старые исторически сложившиеся названия, например пепсин, трипсин, папаин и др.

В соответствии с рекомендациями Международного биологического союза (1961 г.) все ферменты разделены на 6 классов.

1. Оксидоредуктазы. Катализируют окислительно-восстановительные реакции. Оксидоредуктазы подразделяются на две большие группы: а) дегидрогеназы, катализирующие процесс окисления органических веществ путем отнятия водорода и переноса его на другой субстрат; б) оксидазы, катализирующие перенос водорода с субстрата, подвергающегося окислению, на кислород.

2. Трансферазы. Эти ферменты катализируют реакции переноса атомных групп (аминогрупп, остатков фосфорной кислоты, металльных групп и т. д.).

3. Гидролазы. Катализируют реакции гидролитического распада сложных соединений на более простые. К этому классу относятся многочисленные ферменты, действующие на сложно-эфирные связи (эстеразы, например, липазы, катализирующие процесс гидролитического расщепления липидов), гликозильные соединения (например, гликозидазы, катализирующие гидролитический распад поли- и олигосахаридов), пептидные связи (пептидазы или пептидгидролазы), кислотноангидридные (полифосфатазы) и др.

4. Лиазы. Катализируют негидролитическое отщепление от субстратов определенных групп с образованием двойной связи.

5. Изомеразы. Ферменты, отнесенные к этому классу, катализируют разнообразные реакции изомеризации, например превращение цисформы в трансформу, взаимопревращение альдоз и кетоз, внутримолекулярный перенос групп (в последнем случае ферменты называют м-тазами) и т. д.

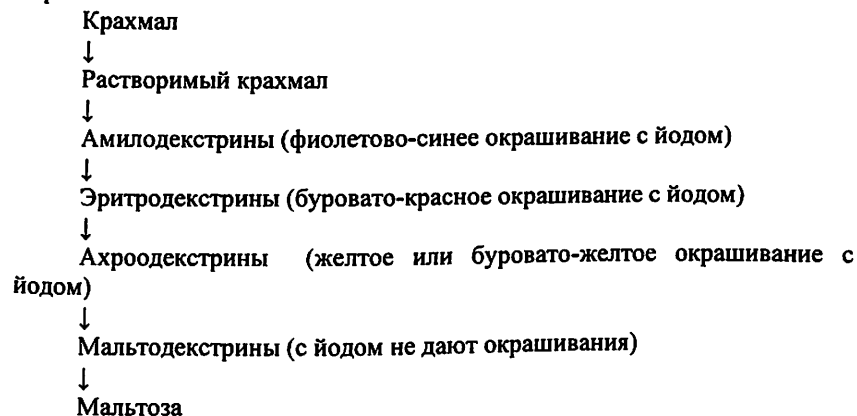
6. Лигазы (синтетазы). Катализируют присоединение друг к другу двух молекул, сопряженное с разрывом пиррофосфорной связи в молекуле АТФ (или аналогичных трифосфатов). Сюда относятся ферменты, образующие связи между молекулами углерода и кислорода, серы, азота или между двумя молекулами углерода.

ВЛИЯНИЕ АМИЛАЗЫ НА КРАХМАЛ

Ферментативный гидролиз крахмала

Ферментативный гидролиз крахмала протекает под влиянием ферментов амилаз, которые содержатся в слюне, соке поджелудочной железы, крови, печени, мозга. Источниками амилаз в промышленности служат проросшие зерна злаков (солод) и культуры плесневых грибов.

Известны α - и β -амилазы, которые несколько различаются по характеру действия. Под влиянием α -амилазы процесс гидролитического расщепления крахмала задерживается главным образом на стадии декстринов, а мальтозы образуется немного, тогда как под действием β -амилазы расщепление идет в сторону преимущественного образования мальтозы. Последовательно этот процесс можно представить следующим образом.



Мальтоза под действием фермента мальтазы (α -глюкозидазы) распадается на две молекулы α -D-глюкозы. Встречается также фермент глюкоамилаза, катализирующий распад крахмала до глюкозы.

Ход процесса гидролитического расщепления крахмала можно проследить с помощью реакций Троммера, Бенедикта или Ниландера (см. раздел VII), характеризующих восстанавливающие свойства углеводов.

При ферментативном гидролизе крахмала увеличивается количество свободных гликозидных гидроксиллов, обуславливающих восстанавливающие свойства, и поэтому мальтоза и глюкоза способны восстанавливать окись меди до закиси, гидрат окиси висмута или окись серебра до металлов.

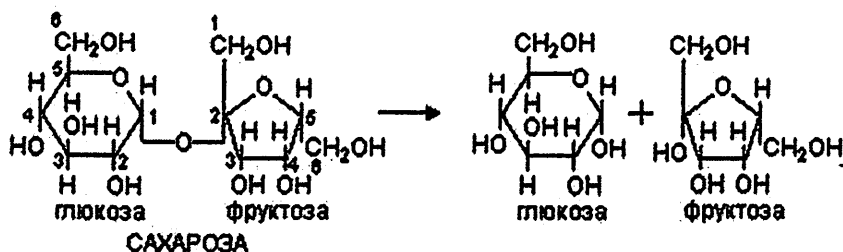
Р е а к т и в ы: а) слюна. Свежую слюну разводят в 10 раз дистиллированной водой; б) крахмал, 1%-ный раствор; в) раствор йода в йодистом калии (раствор Люголя): в нескольких миллилитрах воды растворяют 1 г йодистого калия, в концентрированном растворе соли

растворяют 1 г йода и доливают водой до 300 мл; г) едкий натр, 5%-ный раствор; д) сернистая медь ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 5%-ный раствор.

В две пробирки наливают по 2 мл 1%-ного раствора крахмала, в одну из них добавляют 1 мл разведенной слюны (1 : 10), в другую — 1 мл воды и ставят на 10 мин. в водяную баню, нагретую до 37—38°C (внимательно следят за температурой, не допуская ее повышения), или, еще лучше, в ультратермостат, после чего охлаждают пробирки под краном. Прodelьвают реакции Троммера и с йодом, для чего содержимое каждой пробирки делят пополам.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ САХАРАЗЫ

Фермент Сахароза (инвертаза) гидролизует сахарозу и расщепляет ее до глюкозы и фруктозы.



Фермент сахароза встречается во многих растениях, особенно когда он содержит много источников в дрожжевых грибах. Ряд методов используется для определения активности фермента. Один из них основан на свойствах реакции указанных выше продуктов реакции и окисляется до соответствующих кислот глюкозы и фруктозы, а ионы меди восстанавливаются.

Р е а к т и в ы: а) ферментный сок сахаразы, сок получают из дрожжевых грибов. Для этого 5 гр дрожжей измельчают в фарфоровой ступке, затем добавляют 5 мл дистиллированной воды и процесс продолжается. В ступку добавляют еще 10мл горячей (60° С) воды и измельчают в течении 10минут. Фермент сахаразы переходит к раствору. Смесь отфильтруют, фильтрат используется как ферментный сок. б) 0,5%-ный раствор сахарозы, в) 20%- ный раствор гидроксида натрия, г) 2%- ный раствор сульфата меди

В две пробирки наливают по 1 мл раствора сахарозы, затем в одну из них добавляют 1 мл воды, а в другую — столько же ферментный сок сахаразы. Обе пробирки ставят в инкубацию 35°C в течении 15 мин. Затем в обе пробирки добавляют по 2 мл 20% - ного раствора гидроксида натрия и 5-6 капли 2% - ного раствора сульфата меди и нагревают.

Убеждаются, что в пробирке, в которой фермент окрашивается в красный цвет и выпадает в осадок

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Это одно из важнейших свойств ферментов. Каждый фермент воздействует лишь на определенное вещество или группу веществ, близких по своей структуре. Различают следующие виды специфичности: а) абсолютную, когда ферменты катализируют лишь одну реакцию превращения какого-либо вещества. Например, уреазы (карбамид — амидогидролаза) катализируют только реакцию гидролитического расщепления мочевины до аммиака и двуокиси углерода; б) групповую, когда ферментом катализируются реакции превращения близких по своей структуре веществ, построенных по одному типу. Так, сахароза (β -фруктофуранозидаза) катализирует реакцию гидролитического расщепления сахарозы с освобождением молекул глюкозы и фруктозы, но тот же фермент катализирует также реакцию частичного гидролиза трисахарида рафинозы (α -галактозидо α -глюкозидо β -фруктозида), при которой освобождается лишь молекула фруктозы, а связь между галактозой и глюкозой остается ненарушенной; в) стереохимическую, которая проявляется в том, что фермент катализирует реакцию расщепления или синтеза только одного из стереоизомеров, не воздействуя на другой. Окисление L-молочной кислоты до пировиноградной катализируется ферментом лактатдегидрогеназой, тогда как тот же процесс у D-молочной кислоты катализируется другим ферментом — D-лактатде-гидрогеназой.

Специфичность действия амилазы (α -1,4-глюкан -4-глюканогидролаза; КФ 3.2.1.1) и сахаразы (β -D-фруктофуранозид — фруктогидролаза; КФ 3.2.1.26)

Р е а к т и в ы. Термометр лабораторный; баня водяная; пипетки с одной меткой на 2 мл (4 шт); раствор слюны разбавленный; препарат дрожжевой сахаразы 1%-ный; тростникоовый сахар, (2% ный); сульфат меди (1%-ный); гидроксид натрия (10%- ный); йод (0,3ный) в йодиде калия (3%-ном). фелингова жидкость

Нумеруют четыре пробирки. В пробирки 1 и 2 наливают о раствора крахмала: в пробирки 3 и 4-по 2 мл раствора сахарозы. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 0,5 мл раствора слюны, а в пробирки 2 и 4-по 0,5 мл 1%-ного раствора препарата дрожжевой сахаразы. Перемешивают содержимое и ста- на 10 мин в водяную баню, нагретую до 38-40°C. После охлаждения прodelьвают реакции с йодом на присутствие крахмала в пробах 1 и 2 и глюкозы - в пробах 3 в 4. Делают заключение о специфичности изученных ферментов.

Р е а к т и в ы: а) слюна, разведенная в 10 раз дистиллированной водой; б) сахароза, 1%-ный раствор; в) крахмал, 1%-ный раствор; г) реактивы для реакции Троммера.

В две пробирки наливают по 1 мл разведенной слюны, затем в одну из них добавляют 1 мл раствора сахарозы, а в другую — столько же раствора крахмала. Обе пробирки прогревают 10 мин. в водяной бане при температуре 38°C, после чего охлаждают и с содержимым каждой из них продельвают реакцию Троммера. Убеждаются, что амилаза катализировала лишь процесс гидролитического расщепления крахмала и не оказала действия на сахарозу

ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Инактивация ферментов высокой температурой. Являясь белковыми веществами, ферменты весьма чувствительны к температуре, при которой протекает реакция. Температурный оптимум действия ферментов теплокровных животных составляет 37—38°C. При небольшом повышении температуры (например, 40—45°C) скорость ферментативных реакций вначале повышается, но уже при дальнейшем нагревании (выше 50°C) падает, а при 70—80°C утрачивается. Кипячение влечет за собой полную потерю каталитической активности ферментов вследствие денатурации их белковой части (апоферментов). При температурах ниже нуля скорость ферментативных реакций значительно понижается, но сами ферменты не разрушаются и при осторожном оттаивании восстанавливают свою активность.

Р е а к т и в ы: а) слюна, разведенная в 5 раз дистиллированной водой; б) крахмал, 1%-ный раствор; в) раствор йода в йодистом калии (см. предыдущую работу); г) реактивы для реакции Троммера (см. предыдущую работу).

В две пробирки наливают по 1 мл разведенной слюны. Содержимое одной из них нагревают до кипения и кипятят 2—3 мин. Затем в обе пробирки добавляют по 1 мл раствора крахмала и ставят на 10 мин. в водяную баню, нагретую до 38°C, после чего продельвают реакции Троммера и с йодом. Убеждаются, что в пробирке, в которой фермент был инактивирован кипячением, расщепления крахмала не произошло.

ВЛИЯНИЕ pH ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА

Влияние pH среды на активность амилазы слюны.

Каждый фермент проявляет максимум своего каталитического действия при строго определенном pH среды. Наивысшую активность многие ферменты проявляют в изоэлектрической точке.

Оптимальное значение pH для пепсина составляет 1,5—2,0, амилазы слюны — 6,8—7,0, трипсина — 7,8, липазы поджелудочной железы —

7,0—7,8. Было, однако, показано, что ферменты, катализирующие одни и те же реакции, но выделенные из различных субстратов, проявляют оптимум действия при неодинаковых значениях pH. Так, оптимум действия кишечной сахаразы наблюдается при pH 6,2, а сахаразы, выделенной из дрожжей, — при pH 4,6—5,0. Оптимум pH амилазы слюны составляет 6,8—7,0, а амилаза солода проявляет максимум каталитической активности при pH 4,4—4,5.

Р е а к т и в ы: а) слюна, разведенная дистиллированной водой в 100 раз; б) крахмал, 0,5%-ный раствор; в) лимонная кислота, 0,1 М раствор (19,212 г кислоты в 1 л); г) фосфорнокислый натрий двузамещенный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,2 М раствор (содержит 36,62 г соли в 1 л); д) раствор Люголя (раствор йода в йодистом калии); е) хлористый натрий, 1%-ный раствор.

В 7 однотипных пробирок пипетками наливают растворы лимонной кислоты и фосфорнокислого натрия в количествах, указанных в табл. 4, получая таким образом буферные смеси со значениями pH от 5,6 до 8,0. В каждую пробирку добавляют по 10 капель 1%-ного раствора хлористого натрия, 0,5% ного раствора крахмала, разведенной в 100 раз слюны и перемешивают.

Табл. 4. Фосфатно-цитратные буферные смеси

Номер пробирки	Количество 0,2 М раствора двузамещенного фосфата натрия, мл	Количество 0,1 М раствора лимонной кислоты, мл	pH буферной смеси
1	0,58	0,42	5,6
2	0,63	0,37	6,0
3	0,69	0,31	6,4
4	0,77	0,23	6,8
5	0,87	0,13	7,2
6	0,94	0,06	7,6
7	0,97	0,03	8,0

Пробирки ставят на 10 мин. в водяную баню при температуре 38°C, после чего быстро охлаждают, добавляют во все пробирки по 1 капле раствора Люголя, перемешивают и наблюдают окраску. Устанавливают, при каком pH произошло наиболее полное расщепление крахмала (желтая или буровато-желтая окраска с йодом). Реакция весьма специфична и показательна.

Номер пробирки	Количество 0,2 М раствора двузамещенного фосфата натрия, мл	Количество 0,1 М раствора лимонной кислоты, мл	рН буферной смеси
1	0,58	0,42	5,6
2	0,63	0,37	6,0
3	0,69	0,31	6,4
4	0,77	0,23	6,8
5	0,87	0,13	7,2
6	0,94	0,06	7,6
7	0,97	0,03	8,0

Пробирки ставят на 10 мин. в водяную баню при температуре 38°C, после чего быстро охлаждают, добавляют во все пробирки по 1 капле раствора Люголя, перемешивают и наблюдают окраску. Устанавливают, при каком рН произошло наиболее полное расщепление крахмала (желтая или буровато-желтая окраска с йодом). Реакция весьма специфична и показательна.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА УРЕАЗА

Открытие уреазы.

(Карбамид-амидогидролаза; КФ 3.5.1.5) в соевой муке.

Р е а к т и в ы: термостат; пипетка одной меткой на 2 мл. (2 шт.); соевая мука, мочевины (1%-ная): фенолфталеин (1%-ный спиртовой раствор).

К 2 мл 1%-ного раствора мочевины добавляют две капли фенолфталеина и 2 мл раствора уреазы (1:10). Смесь хорошо перемешивают и ставят в термостат при 38°C на 30 мин. Параллельно ставят такой же опыт с прокипяченным раствором уреазы. Содержимое первой пробирки становится малиново-красным вследствие смешения рН раствора в щелочную зону за счет образовавшегося аммиака

ДЕЙСТВИЕ АКТИВАТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Помимо температуры и рН, большое влияние на активность ферментов оказывает присутствие в растворе ряда химических соединений. Одни из них повышают активность ферментов (активаторы), другие, напротив, действуют угнетающе (ингибиторы или парализаторы). К химическим соединениям, действующим как активаторы ферментов, относятся многие соли Na^+ , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} и др. Из ингибиторов ферментов известны соли синильной кислоты (цианиды), угнетающие некоторые «геминовые» ферменты, моноиодуксусная кислота приостанавливающая спиртовой и молочнокислый брожение, фосфоорганические соединения, необратимо и инактивирующие ряд экстераз, и др.

Действие активаторов и парализаторов на амилазу слюны

Р е а к т и в ы: термостат на 40°C; бюретки прямые с краном на 50 мл (2 шт.); пипетки с одной меткой на 1 мл (4 шт.); 2 штатива лабораторных с пробирками; слюна неразбавленная профильтрованная; крахмал (0,5%-ный); хлорид натрия (1%-ный); сульфат меди (1%-ный); йод (3%-ный) в йодиде калия (3%-ном)

В штативах располагают тремя рядами 36 пробирок и нумеруют их в каждом ряду. Во все пробирки вливают из бюретки по 1 мл воды, а затем в первые пробирки каждого ряда - по 1 мл профильтрованной неразбавленной слюны. Содержимое пробирок хорошо перемешивают. Далее в каждом ряду 1 мл смеси из пробирки 1 переносят в пробирку 2, перемешивают снова набирают 1 мл смеси и переносят в пробирку 3 и т. д. вплоть до пробирки 12, из которой после перемешивания выливают 1 мл

жидкости. Во все пробирки первого ряда наливают по 1 мл воды (контрольный ряд): в пробирки второго ряда - по 1 мл раствора хлорида натрия и в пробирки третьего ряда - по 1 мл раствора сульфата мед. Далее во все пробирки приливают из бюретки по 2 мл раствора крахмала сначала первые номера всех рядов, затем содержимое пробирок перемешивают и ставят штативы с пробирками в термостат при 40°C на 15 мин. По охлаждению в каждую из них добавляют по капле раствора йода в йодиде калия и отмечают в каждом ряду номер пробирки, которое реакция на крахмал отрицательна. Деля степень разведения контрольной пробы, в которой реакция с йодом отрицательна, на степень разведения соответствующих проб с исследуемыми эффекторами, вычисляют, во сколько раз активатор (NaCl) ингибитор (CuSO_4) стимулирует или тормозит действие амилазы слюны.

Ингибирующее действие фенилтиомочевин на фенолоксидазу (о-дифенол O_2 - оксидоредуктаза; КФ 1.10.3.1) картофеля

Р е а к т и в ы: сырой картофель; гваяковая смола (5%-ный спиртовой раствор); фенилтиомочевина (порошок)

Клубень картофеля разрезают пополам. На обе половинки наносит 1-2 капли 5% -ного спиртового раствора гваяковой смолы и одну из них немедленно посыпают порошком фенилтиомочевин. На контрольной половине клубня картофеля появляется яркое синее окрашивание, обусловленное образованием окрашенных продуктов окисления гваяковой смолы. На другой половине окрашивания не происходит вследствие инактивации фермента фенилтиомочевин.

Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной (сукцинат: акцептор - оксидоредуктаза КФ 1.3.99.1) активности;

Р е а к т и в ы: Баня водяная; пипетка градуированные 1 мл (5 шт.); кашица мышечная; масло вазелиновое; малоновая кислота (1%-ная нейтрализованная); янтарная кислота (1%-ная нейтрализованная); метиленовый синий (1%-ный).

В три пронумерованные пробирки помещают по 3-4 г мышечной кашицы и добавляют: в первую - 0,4 мл воды, во вторую - 0,2 мл 1%-ного раствора малоновой кислоты и 0,2 мл воды и в третью - 0,4 мл 1%-ного раствора малоновой кислоты. Во все три пробирки добавляют по 1 мл 1%-ного раствора янтарной кислоты, по 2-3 капли 1%-ного раствора метиленового синего и после перемешивания, по 3-4 капли вазелинового масла. Пробирки ставят в водяную баню нагретую до 40°. Через 3-5 мин наблюдается почти полное исчезновение голубой окраски в пробирке 1, некоторое уменьшение интенсивности окраски в пробирке 2 и полное сохранение ее в пробирке 3. Сукцинатдегидрогеназная активность малоновой кислоты вследствие близости ее структуры к таковой янтарной кислоты и происходящей вследствие этого

конкуренции за фермент.

Ингибирующее действие хлорид-ионов на дегидрогеназный комплекс картофеля

Р е а к т и в ы. сырой картофель; хлорид натрия; йодид натрия хлорат калия $KClO_3$,

Две картофелины разрезают пополам. Первую половину оставляют для контроля, вторую – посыпают хлоридом натрия, третью – йодидом натрия, четвертую – хлоратом калия. Через 15-20 мин срезы трех половинок темнеют, а срез с хлоридом натрия остается без изменения

Ингибирующее действие ионов меди на арилэстеразу (гидролаза арилэфиров; КФ 3. 1. 1. 2) грены тутового шелкопряда

Р е а к т и в ы: Приборы в реактивы для фракционирования белков методом электрофореза в полиакриламидном теле: термостат на $40^{\circ}C$: пипетки градуированные на 1 мл (3 шт.), 10 мл (2 шт.): экстракт из грены тутового шелкопряда: α -нафтилацетат (1ный) ацетоне (50% ном): трис- HCl буфер (0,2 М рН-7,1): прочный синий В (2мг в 1 мл воды): сульфат меди (1ный).

После проведения электрофоретического фракционирования белков грены тутового шелкопряда, две гелевые колонки ополаскивают дистиллированной водой и помещают в пробирки, которые наливают по 9 мл 0,2 М трис- HCl буферного раствора (рН -7,1) и 1%-ного раствора α -нафтилацетата. Затем в одну из них 0,5 мл приливают 1 М 1%-ного раствора сульфата меди. Пробирки с помещенными в них гелевыми колонками выдерживают 10 мин в термостате при $37^{\circ}C$, после чего в каждую из них приливают по 1мл раствора прочного синего В. Через 10 мин в контрольно гелевой колонке отчетливо обозначаются окрашенные в коричневый цвет зоны локализации эстеразной активности. Напротив, на гелевой колонке, помещенной в среду с ингибитором ($CuSO_4$) никаких следов окраски не обнаруживается.

Активирующее действие ионов Mn^{+2} и Mg^{+2} на малатдегидрогеназу (L-малат: НАД - оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.37) грены тутового шелкопряда

Р е а к т и в ы. Приборы и реактивы для фракционирования белков методом электрофореза в полнакриламидном геле: термостат на $40^{\circ}C$: пипетки с одной меткой на 1 мл (5 шт.), 10 мл (1 шт.), экстракт из грены тутового шелкопряда; малат натрия 1%-ный; НАД (4 мг); HCl (4 мг); хлорид марганца (1%-ный); фосфатный буферный раствор (0,2 М; рН-7,4); раствор ФМС (0,2 мг в 1 мл воды).

Фракционируют белки грены тутового шелкопряда методом электрофореза. Готовят 18 мл инкубационной смеси, смешивая 16 мл

фосфатного буфера и 2 ма 1%-ного раствора малата натрия и растворяя в ней 4 мг НАД 4 мг НСТ. Инкубационную смесь разливают в две пробирки поровну, в одну из них добавляют 1 мл 1%-ного раствора хлорида марганца (или хлорида магния), а в другую-1 мл воды. Обе пробирки выдерживают 10 мин в термостате при $37^{\circ}C$, после чего в них добавляют по 1 мл раствора ФМС. Отмечают время появления окраски в зонах локализации малатдегидрогеназы на обеих гелевых колонках и убеждаются в том, что она намного меньше в пробе с ионами Mn^{+2} (или Mg^{+2}) по сравнению с контролем

ВИТАМИНЫ

Витамины — низкомолекулярные вещества, относящиеся к различным классам органических соединений. Они условно объединены в одну группу по признаку жизненной необходимости для организма. Витамины — неперменные участники важнейших физиологических и биохимических процессов у животных, растений и микроорганизмов. Многие из них входят в состав простетических групп двухкомпонентных ферментов или являются веществами, служащими для синтеза указанных соединений, активируют некоторые ферментные системы.

В основном витамины синтезируются растениями, с которыми главным образом и поступают в организм человека и животных. Некоторые из них образуются симбиотической микрофлорой пищеварительного тракта.

Недостаточное содержание витаминов в пище и кормах, а также нарушение их всасывания в организме ведут к развитию тяжелых нарушений обмена веществ, известных под названием гиповитаминозов и авитаминозов. Заболевание, возникающее в результате отсутствия того или иного витамина в пище, называют авитаминозом. При относительной недостаточности какого-нибудь витамина наблюдается гиповитаминоз.

Функции витаминов тесно связаны между собой, поэтому обычно наблюдаются полиавитаминозы или полигиповитаминозы. Авитаминозы встречаются весьма редко, чаще же наблюдаются гиповитаминозы как результат нерационального питания или перенесенных заболеваний. Гиповитаминозы могут иметь место и вследствие длительного приема некоторых лекарственных препаратов (сульфонамидов, антибиотиков).

Избыточный прием ряда витаминов ведет к нарушениям обменных функций, известных под названием гипервитаминозов.

В основу классификации витаминов положена их растворимость. По этому признаку витамины делят на две группы:

- а) витамины, растворимые в жирах и органических растворителях;
- б) витамины, растворимые в воде.

Растворимыми в жирах и органических растворителях являются:

- 1) витамины группы А; 2) витамины группы D;
- 3) витамины группы Е; 4) витамины группы К;
- 5) неопределенные (полиненасыщенные) жирные кислоты, имеющие

две и больше двойных связей.

Растворимыми в воде являются:

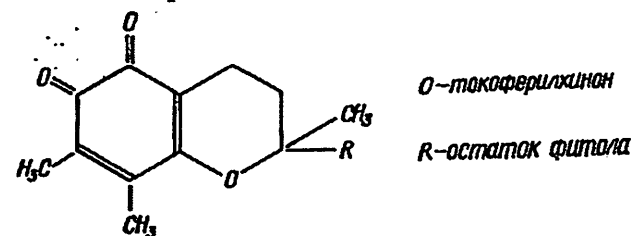
- 1) витамины группы В: В₁ — тиамин, В₂ — рибофлавин, РР — никотинамид, В₆ — пиридоксин, Н — биотин, пантотеновая и парааминобензойная кислоты, холин, инозит, фолиевая кислота, В₁₂ — цианкобаламин, В₁₅ — пангамовая кислота;

- 2) витамин С (аскорбиновая кислота);

3) витамин Р (биофлавоноиды).

Качественные реакции на (витамин Е) токоферолы

Реакция с азотной кислотой. Реагируя с сильными окислителями, например с концентрированной азотной кислотой, α-токоферол превращается в о-токоферилхинон, который затем образует соединение, окрашенное в красный или желтовато-красный цвет.



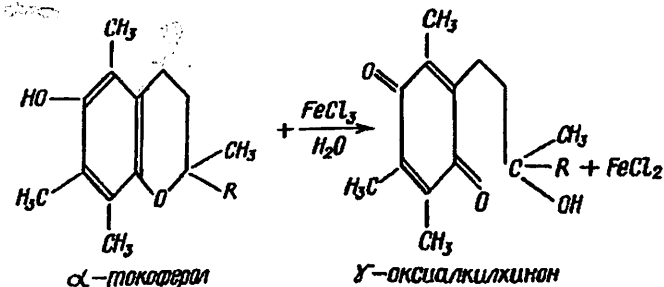
Р е а к т и в ы: а) масляный концентрат витамина Е, 0,15%-ный раствор в абсолютном этиловом или бутиловом спирте; б) азотная кислота, концентрированная.

К нескольким каплям спиртового раствора витамина Е осторожно добавляют 8—10 капель концентрированной азотной кислоты и пробирку слегка встряхивают. Через 1—2 мин. содержимое пробирки приобретает красное или желтовато-красное окрашивание.

Реакция протекает бурно, поэтому рекомендуется азотную кислоту прибавлять медленно, по стенке пробирки и проводить реакцию в вытяжном шкафу.

Реакция с хлорным железом. Токоферолы окисляются хлорным железом, которое при этом восстанавливается до FeCl₂. Ион Fe²⁺, реагируя с ортофенантролином, образует комплексный ион Fe(C₁₂H₈N₂)₃²⁺, благодаря которому раствор окрашивается в красный цвет.

При окислении токоферолов хлорным железом происходит разрыв пиранового кольца с образованием γ-оксиалкилхинона:

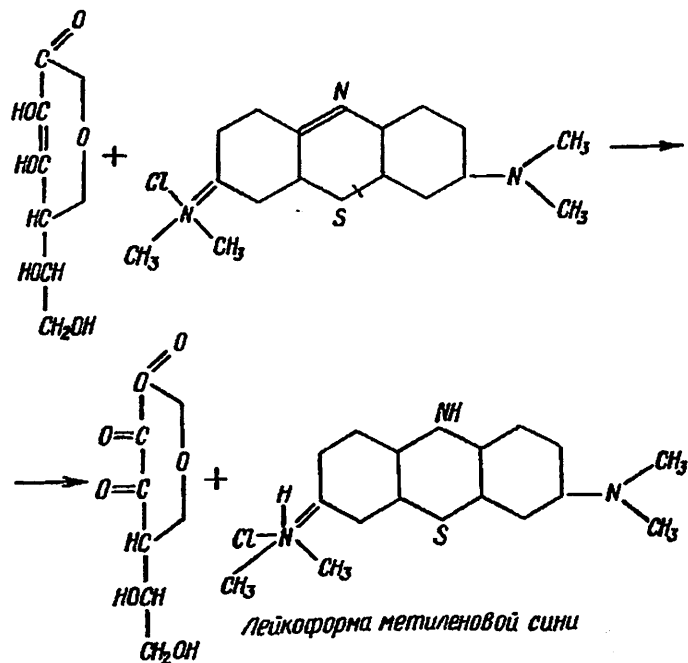


Р е а к т и в ы: а) масляный концентрат витамина Е, 0,15%-ный раствор в абсолютном этиловом спирте; б) хлорное железо, 0,2%-ный спиртовой раствор (хранят в темном месте); в) ортофенантролин, 0,5%-ный спиртовой раствор.

К 1—2 мл спиртового раствора концентрата витамина Е добавляют 1 мл раствора ортофенантролина и по каплям раствор хлорного железа до появления красного окрашивания.

Качественные реакции на витамин С (Аскорбиновая кислота)

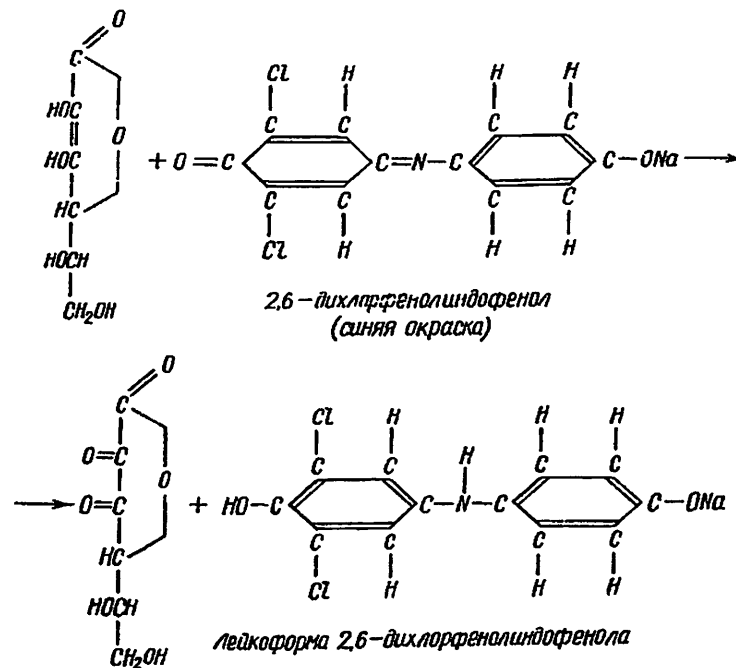
Реакция с метиленовой синью. Аскорбиновая кислота на свету восстанавливает метиленовую синь в бесцветное соединение (лейкоформу), окисляясь в дегидроаскорбиновую кислоту



Р е а к т и в ы: а) сок картофеля или капусты. Клубень картофеля или часть кочана капусты натирают на терке из нержавеющей стали. Растертую массу отжимают через марлю, сложенную в два слоя; б) метиленовая синь, 0,01%-ный раствор; в) натрий углекислый, 5%-ный раствор.

К 1 мл свежееотжатого сока картофеля или капусты добавляют 1—2 капли раствора метиленовой сини и 2—3 капли раствора соды. Пробирку слегка подогревают. Наблюдают обесцвечивание синей окраски.

Реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом. Аскорбиновая кислота окисляется 2,6-дихлорфено-линдофенолом в дегидроаскорбиновую кислоту, а сам реактив восстанавливается при этом в бесцветное соединение (лейкоформу):

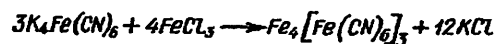
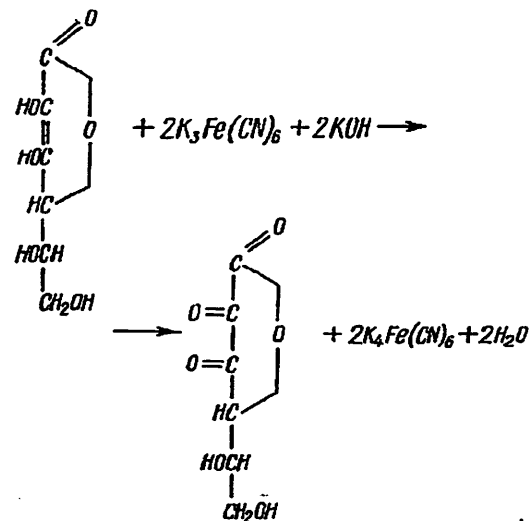


Р е а к т и в ы: а) сок капусты или картофеля (приготовление — см. предыдущую работу); б) 2,6-дихлорфенолиндофенол, натриевая соль, 0,001 н раствор (см. «Количественное определение витамина С в растительном сырье»); в) соляная кислота, 2%-ный раствор.

В пробирку наливают 1 мл сока капусты или картофеля, прибавляют 3—4 капли 2%-ного раствора соляной кислоты и по каплям раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола. Реактив будет обесцвечиваться до тех пор, пока вся аскорбиновая кислота не окислится в дегидроаскорбиновую, после чего первая же капля раствора окрасит жидкость в розовый цвет, так как 2,6-дихлорфенолиндофенол уже не восстанавливается.

Реакция с железосинеродистым калием. Аскорбиновая кислота, окисляясь, восстанавливает железосинеродистый калий $K_3Fe(CN)_6$ до железистосинеродистого $K_4Fe(CN)_6$, который с ионом трехвалентного железа образует в кислой среде берлинскую лазурь $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$:

ГОРМОНЫ



Берлинская лазурь

Р е а к т и в ы: а) сок капусты или картофеля (см. выше); б) железосинеродистый калий, 5%-ный раствор; в) едкое кали, 5%-ный раствор; г) соляная кислота, 10%-ный раствор; д) хлорное железо, 1%-ный раствор.

К 1 мл сока капусты или картофеля прибавляют 2 капли раствора едкого кали, столько же раствора железосинеродистого калия и встряхивают пробирку, после чего добавляют 6—8 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и 1—2 капли раствора хлорного железа. Выпадает синий или зеленовато-синий осадок берлинской лазури.

Гормоны — специфические регуляторы биохимических процессов в организме, вырабатываемые железами внутренней секреции. Они играют большую роль в обеспечении замечательной способности живых организмов — саморегулировании (авторегуляции) биохимических и физиологических процессов, поддержании их на относительно стабильном уровне.

В организме человека и животных гормоны вырабатываются щитовидной и паращитовидными железами, надпочечниками, поджелудочной железой, гипофизом, половыми железами, эпифизом. Некоторые гормоны (или гормоноподобные вещества) вырабатываются в желудочно-кишечном тракте, системе кровообращения, околоушной слюнной железе, почках и других органах и тканях.

По химической природе гормоны можно разделить на три группы.

1. Производные аминокислот (гормоны щитовидной железы и мозгового слоя надпочечников).
2. Полипептиды и белки (гормоны гипофиза, поджелудочной железы).
3. Стероидные соединения (гормоны коркового слоя надпочечников и половых желез).

Характер влияния гормонов на обмен веществ отличен от механизма действия ферментов и витаминов. Они не входят в состав молекул биологических катализаторов, ферментов, отличаясь этим от витаминов.

Гормоны в отличие от ферментов не принимают непосредственного, видимого участия в химических реакциях и их не удастся включить в химические уравнения, выражающие основные процессы обмена белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов, минеральных соединений. Считают, что роль гормонов сводится к так называемому аллостерическому регулированию, т. е. изменению пространственной конфигурации молекул.

Ряд гормонов, главным образом белковой и пептидной природы, влияет на проницаемость клеточных и субклеточных мембран, некоторым из них свойственны функции активаторов или ингибиторов ферментных систем (в первую очередь — окислительно-восстановительных), другие (в основном стероидные) принимают участие в процессах биосинтеза белковых веществ.

Роль ряда гормонов сводится к преимущественному регулированию процессов работы других желез внутренней секреции.

Гормоны поджелудочной железы

Общие сведения. В поджелудочной железе вырабатывается несколько веществ, обладающих гормональным действием.

β -Клетки островков Лангерганса синтезируют инсулин, являющийся одним из важнейших регуляторов обмена углеводов в организме. Роль островковых клеток в выработке инсулина была доказана Л. В. Соболевым.

В α -клетках островков Лангерганса образуется гормон глюкагон. Он также влияет на углеводный обмен, но его действие оказывается противоположным инсулину.

Клетки эпителия мелких протоков железы вырабатывают гормон липокаин, участвующий в обмене жиров.

Гормон ваготонин повышает тонус парасимпатической нервной системы, а центропнеин влияет на дыхательный центр. Эти гормоны изучены еще недостаточно.

Инсулин — белковое вещество. Его синтез был осуществлен в 1963—1964 гг. Макромолекула инсулина состоит из мономеров, каждый из которых построен из двух полипептидных цепей: цепи А, состоящей из 21 остатка аминокислотой цепи В, в состав которой входят 30 аминокислотных остатков. Полипептидные цепи соединены между собой дисульфидными мостиками. Мономеры инсулина связываются в димеры посредством цинка, содержание которого составляет 0,3%. Димеры соединяются друг с другом с помощью сил Ван-дер-Ваальса и электростатических связей. Макромолекула инсулина состоит из четырех димеров. Физиологической активностью обладают не только макромолекулы, но и мономеры, димеры и соединения, состоящие из двух-четырёх димеров.

Глюкагон — полипептид, состоит из 29 аминокислотных остатков.

Реакции на инсулин. Реакция с разбавленным раствором едкой щелочи. При добавлении к раствору инсулина очень разбавленного раствора едкого натра или едкого кали выпадает хлопьевидный осадок, растворяющийся при подкислении.

Реактивы: а) раствор инсулина (в ампулах);

б) едкий натр или едкое кали, 0,1%-ный раствор;

в) уксусная кислота, 0,5%-ный раствор.

К Ю—15 каплям раствора инсулина добавляют по каплям 0,1%-ный раствор едкой щелочи до выпадения хлопьевидного осадка (рН 5,0—5,2), который растворяется при подкислении 0,5%-ным раствором уксусной кислоты до рН 2,5—3,5.

Реакции, свидетельствующие о белковой природе инсулина. С раствором инсулина проводят реакции, доказывающие его белковую природу, — биуретовую, Миллона

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров Л. Н. Техника безопасности химических лабораториях. Л.: Химия, 1991.
2. Mirxamidova P. va boshqalar. "Biokimyo, amaliy mashg'ulotlar" —Т.: "Universitet" 2002y
3. Филиппович Ю. Б 2-е изд. Перераб. —М: Просвещение, 1982- 311ст
4. Шлейкин А. Г, Скворцова Н.Н, Бландов А.Н Лабораторный практикум. Учебное пособие. —СП: Университет ИТМО; ИХиБТ, 2015. -106ср
5. Рогожин В.В, Рогожина В.Т Практикум по биохимии сельскохозяйственной продукции. —СП: ГИОРД, 2016.-480ст
6. Коннова С.А, Галицкая А.А, Плешакова Е.В, Каневский М.В, Федоненко Ю.П Методическое пособие к малому практикуму по биохимии. — С:2017. -75ст
7. Матвеева И.В, Марсянова Ю.А Практикум по биохимии: учебное пособие 2-е изд, исп. И доп., Р: 2018. -169ст
8. Борисова, Г.Г., Чукина, Н.В., Киселева, И.С., Малаева, М. Г., Биохимия. Практикум. —У:2017. -116ст

СОДЕРЖАНИЕ

Правила техники безопасности в биохимической лаборатории.....	3
Глава 1 АМИНОКИСЛОТЫ И БЕЛКИ (ПРОТЕИНЫ).....	6
Цветные реакции белков и аминокислот.....	8
Диализ белков.....	16
Исследование физико-химических свойств белковых веществ.	
Реакции осаждение белков.....	17
Определение изоэлектрической точки белка.....	23
Глава 2 НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ.....	25
Выделение дезоксирибонуклеопротеидов из печени или селезенки....	27
Выделение нуклеопротеидов из дрожжей.....	28
Гидролиз нуклеопротеидов.....	28
Исследование продуктов гидролиза нуклеопротеидов.....	29
Глава 3 УГЛЕВОДЫ.....	31
Исследование восстанавливающих свойств дисахаридов.....	33
Глава 4 ЛИПИДЫ.....	34
Кислотное число.....	35
Определение количества глицерина в жире.....	36
Йодное число.....	37
Глава 5 ФЕРМЕНТЫ (ЭНЗИМЫ).....	39
Ферментативный гидролиз крахмала.....	41
Определение активности сахаразы.....	42
Специфичность ферментов.....	43
ТермолABILITY ферментов.....	44
Влияние pH среды на активность амилазы слюны.....	44
Определение активности фермента уреазы.....	46
Действие активаторов и ингибиторов на активность ферментов.....	46
Глава 6 ВИТАМИНЫ.....	50
Качественные реакции на (витамин E) токоферолы.....	51
Качественные реакции на витамин C (Аскорбиновая кислота).....	52
Глава 7 ГОРМОНЫ.....	55
Реакции на инсулин.....	56
Список литератур.....	57

П. МИРХАМИДОВА, Д. ОТАЖОНОВА

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ
ПО ПРЕДМЕТУ

БИОХИМИЯ

Тираж 100 экз. печ.л 3,7. Формат 60x84 ¹/₁₆
Гарнитура "Times New Roman" Печать офсетная.
Отпечатано в типографии ООО "AKTIV PRINT".
г.Ташкент, Чиланзар 25, 1А.

