

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное агентство по образованию
Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова
Кафедра общей и биорганической химии

Биохимия и молекулярная биология

Методические указания

*Рекомендовано
Научно-методическим советом университета
для студентов специальности Биология*

Ярославль 2005

УДК 577
ББК Е 072я73
Б 63

*Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2005 года*

Рецензент
кафедра общей и биоорганической химии Ярославского
государственного университета им. П.Г. Демидова

Составители: **Г.А. Урванцева, Е.Л. Грачева**

Биохимия и молекулярная биология: Метод. указания.
2-е изд., перераб. и доп. / Сост. Г.А. Урванцева,
Е.Л. Грачева; Яросл. гос. ун-т. - Ярославль: ЯрГУ, 2005. –
Б 63 55 с.

Приведены вопросы к контрольным работам и коллоквиумам, описание лабораторных работ, выполняемых студентами при изучении курса биохимии.

Предназначены для студентов, обучающихся по специальности 011600 Биология (дисциплина «Биохимия и молекулярная биология», блок ОПД), очной и заочной форм обучения.

УДК 577
ББК Е 072я73

© Ярославский государственный университет, 2005
© Г.А. Урванцева, Е.Л. Грачева, 2005

Раздел I. Белки

Работа 1. Распределительная хроматография аминокислот на бумаге

В настоящее время метод хроматографии является одним из наиболее простых, быстрых и точных методов анализа сложных смесей веществ. Он основан на различиях в скорости переноса растворенных веществ в системе двух фаз, одна из которых подвижна.

При хроматографии на бумаге неподвижной жидкой фазой является сорбированная на поверхности бумаги вода, а подвижной - смесь различных органических растворителей, насыщенных водой. Разделение веществ методом хроматографии на бумаге происходит в том случае, если эти вещества существенно различаются по своей растворимости в обеих жидких фазах. Метод распределительной хроматографии аминокислот на бумаге заключается в том, что каплю смеси аминокислот или гидролизата белка наносят на стартовую линию хроматографической бумаги, конец которой опускают в смесь органических растворителей. Чем меньше растворимость аминокислот в воде и чем больше их растворимость в органическом растворителе, тем быстрее они движутся за фронтом органического растворителя. Положение аминокислот на бумаге можно обнаружить при помощи цветной реакции с нингидрином.

Подвижность веществ при хроматографии на бумаге характеризуют с помощью коэффициента скорости движения (R_f), представляющего собой отношение расстояния (мм), пройденного веществом от линии старта, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя.

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное веществом}}{\text{расстояние, пройденное растворителем}}$$

Расстояние, пройденное аминокислотой, измеряют от места ее нанесения до середины пятна. R_f является характерной величиной для каждой аминокислоты и постоянен при данных условиях.

Оборудование, реактивы: сушильный шкаф; электрическая плитка; капиллярные пипетки; кювета эмалированная; бутанол, уксусная кислота, вода в соотношении 40:10:50; 0,5%-ный раствор нингидрина в ацетоне; 1%-ный раствор меди азотнокислой в ацетоне; смесь аминокислот.

Ход работы

Для проведения анализа берут полоску хроматографической бумаги шириной 1,5 и длиной 12 - 14 см. Смесь аминокислот (фенилаланина и глицина) наносят в виде точки на стартовую линию, проведенную простым карандашом на расстоянии 1 см от короткого края бумаги. Растворы аминокислот наносят специальными капиллярными пипетками, не допуская расплывания нанесенного раствора до пятна диаметром более 0,2 см.

В пробирку, служащую хроматографической камерой, наливают 1 мл верхнего слоя растворителя и закрывают пробирку пробкой. Полоску хроматографической бумаги с нанесенными аминокислотами осторожно помещают в пробирку с растворителем, следя за тем, чтобы растворитель был ниже линии старта. Укрепляют хроматограмму в пробирке, которую ставят в штатив под тягой. Процесс хроматографирования длится 1 - 1,2 часа. По окончании указанного срока отмечают на хроматограмме фронт растворителя и высушивают хроматограмму над плиткой. Затем хроматограмму проявляют 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне. После испарения ацетона при комнатной температуре хроматограммы прогревают в термостате при 60⁰С до появления пятен аминокислот. Для увеличения устойчивости окраски хроматограммы обрабатывают 1%-ным раствором азотнокислой меди в ацетоне. При этом лиловая окраска производных аминокислот переходит в оранжево-красную. Хроматограмму высушивают на воздухе при комнатной температуре, отмечают расположение аминокислот, вычисляют их R_f-индексы.

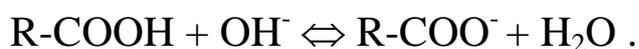
Сделайте рисунок хроматограммы и выводы по результатам опыта.

Работа 2. Определение изоэлектрической точки белков

Вследствие наличия способных к ионизации групп (концевых групп COOH и NH₂, а также боковых групп дикарбоновых и диаминокислот) молекулы белков обладают электрическим зарядом: положительным и отрицательным. В кислой среде белки имеют суммарный положительный заряд:



в щелочной среде - отрицательный:



При определенном значении рН среды величина положительных и отрицательных зарядов становится одинаковой и суммарный заряд белка оказывается равным нулю. Значение рН, при котором белок не имеет суммарного электрического заряда, называют изоэлектрической точкой (ИЭТ). В этом состоянии белки наименее устойчивы и легко выпадают в осадок, имеют наименьшее значение вязкости, растворимости, степени гидратации и электропроводности, не способны передвигаться к электрическим полюсам. Каждый белок имеет свое значение ИЭТ: казеин - 4,6 - 4,7; сывороточный глобулин - 5,4; протамины - 10 - 12; и т.д. Существует целый ряд способов определения ИЭТ белков.

Оборудование, реактивы: пробирки, пипетки на 1, 5 и 10 мл, карандаш по стеклу; 0,1 и 0,01 н. растворы уксусной кислоты.

Материалы: 0,5%-ный раствор желатина (растворяют 0,5 г желатина при подогревании в 10 мл 1 н. раствора уксуснокислого натрия и добавляют воды до 100 мл).

Ход работы

В каждую из 8 пронумерованных пробирок по нижеприведенной таблице 1 вносят соответствующие растворы после перемешивания

+ 1 мл танина. В той пробирке, где обнаружится максимальное помутнение среды (визуально или нефелометрически), рН раствора будет соответствовать ИЭТ белка.

Таблица 1

Прибавление, мл	Номера пробирок							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Вода	8,4	7,75	8,75	8,5	8,0	7,0	5,0	1,0
0,01 н. р-р CH ₃ COOH	0,6	1,25	-	-	-	-	-	-
0,1 н. р-р CH ₃ COOH	-	-	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Раствор белка (0,5%-ный р-р желатина)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Танин	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
РН	5,9	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1	3,8

По результатам опыта сделайте вывод об изоэлектрической точке белка.

Работа 3. Качественные реакции на белки

Методы качественного обнаружения белков основаны на трех типах реакций: а) по пептидным связям белковой молекулы; б) по α-аминогруппе; в) по аминокислотным радикалам.

Примером реакции первого типа служит биуретовая реакция, второго типа - нингидриновая реакция, а к третьему типу относятся многочисленные цветные реакции на радикалы аминокислот. По характеру цветных реакций третьего типа можно судить до некоторой степени о составе белков.

Оборудование, реактивы: баня водяная, пробирки химические, стаканы химические на 100 мл; пипетки, градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл; лакмусовая бумага, хлорид натрия (10%-ный), сульфат аммония (насыщенный), гидроксид натрия (10 и 30%-ном), сульфат меди (1%-ный), нингидрин (1%-ный в ацетоне 95%-ном), α-нафтол (0,2%-ный спиртовой раствор), гипобромид натрия, ледяная уксусная кислота, серная, соляная и азотная кислоты (конц.), нитрит натрия (0,5%-ный), сульфаниловая кислота (5%-ная), карбонат натрия (10%-ный), раствор плюмбита натрия.

Материалы.

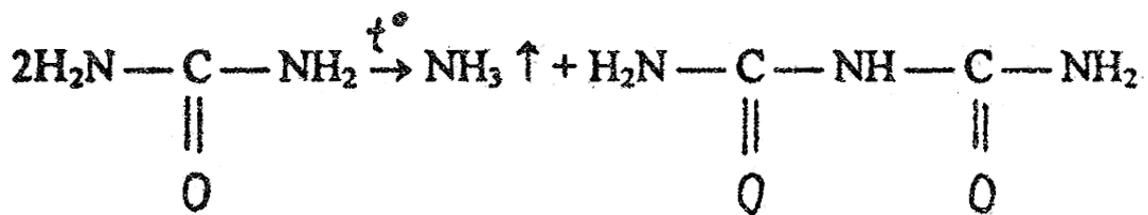
Неразбавленный белок куриного яйца. Отделяют белок трех куриных яиц от желтков. Считая, что масса белка в одном яйце в среднем равна 33 г, получают около 100 мл неразбавленного раствора белков куриного яйца. Этот раствор содержит 88% воды, 1% углеводов и 0,5% минеральных веществ; остальное приходится на белок. Таким образом, полученный неразбавленный белок куриного яйца представляет собой примерно 10%-ный раствор белка.

Разбавленный раствор яичного альбумина. Белок одного куриного яйца после отделения от желтка хорошо взбалтывают и затем смешивают в колбе с десятикратным объемом дистиллированной воды. Раствор фильтруют через двойной слой смоченной водой марли или кусок стираного полотна, помещенные в воронку. Отфильтровывают раствор яичного альбумина; в осадке остается яичный глобулин. Учитывая, что концентрация альбумина в белке куриного яйца составляет около 6%, полученный разбавленный раствор яичного альбумина является примерно 0,5%-ным.

Ход работы

1. *Обнаружение в молекулах белков пептидных связей (биуретовая реакция).* К 1 - 2 мл разбавленного раствора белка прибавляют двойной объем 30%-ного раствора гидроксида натрия, хорошо перемешивают и добавляют 2 - 3 капли 1%-ного раствора сульфата меди. Снова тщательно перемешивают. Развивается синефиолетовое окрашивание. При малом содержании белка чувствительность реакции можно повысить, наслаивая на раствор белка в щелочи 1 мл 1%-ного раствора сульфата меди. При стоянии на границе двух слоев появляется фиолетовое кольцо.

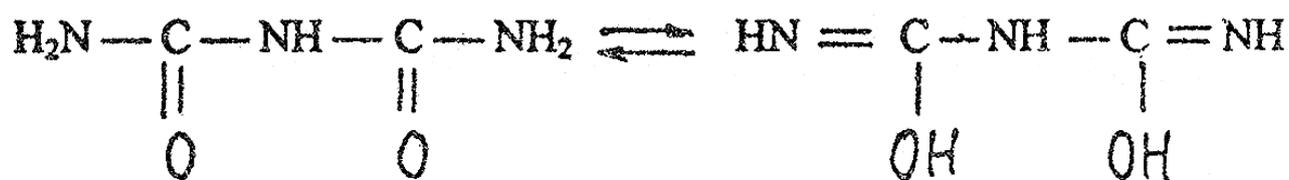
Реакция названа биуретовой потому, что аналогичную цветную реакцию дает биурет, легко получаемый из мочевины при ее нагревании при температуре 150 - 160°C.



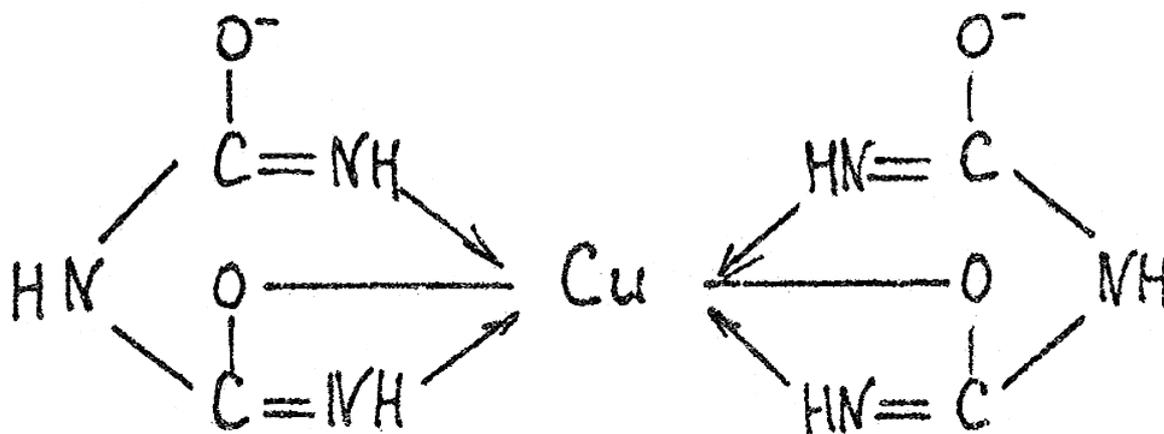
мочевина

биурет

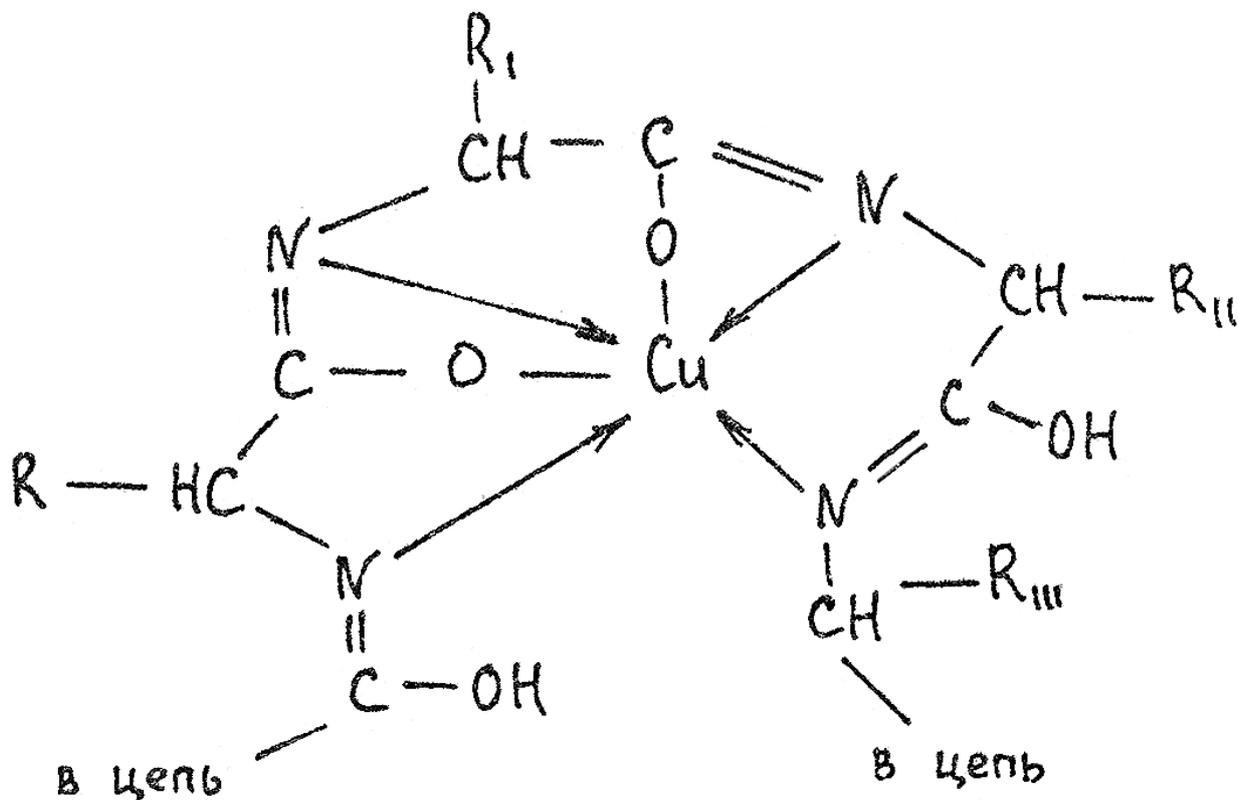
Биурет в щелочной среде претерпевает енолизацию по схеме:



Две молекулы биурета в енольной форме взаимодействуют с гидроксидом меди (II) с образованием комплексного соединения меди:



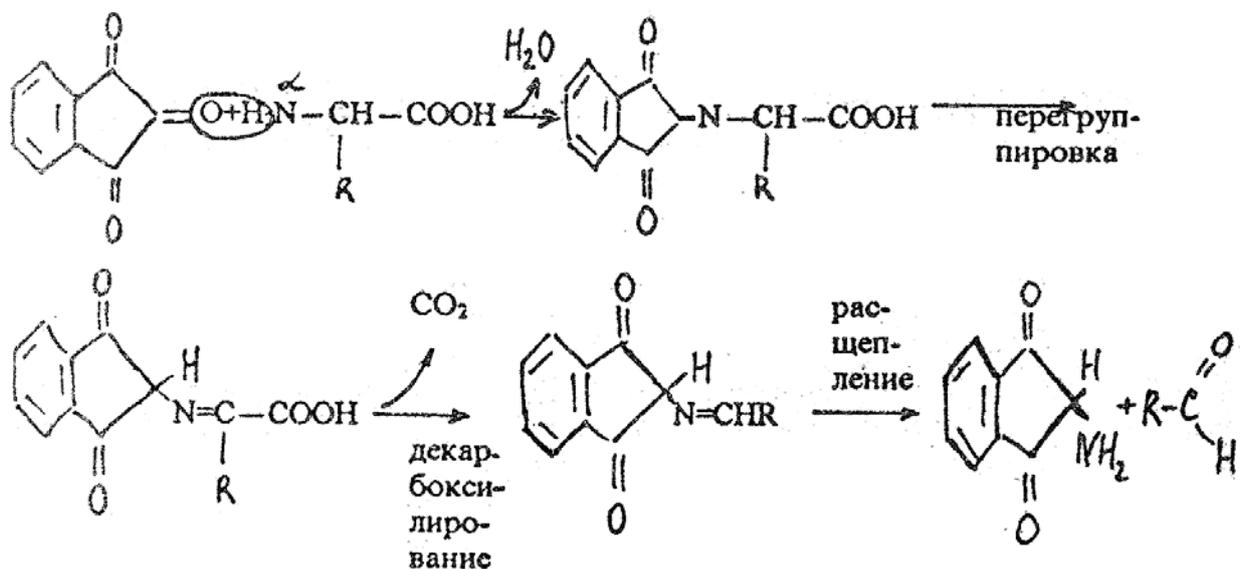
Аналогично построено комплексное соединение меди с енолизированными пептидными группами любого белка:



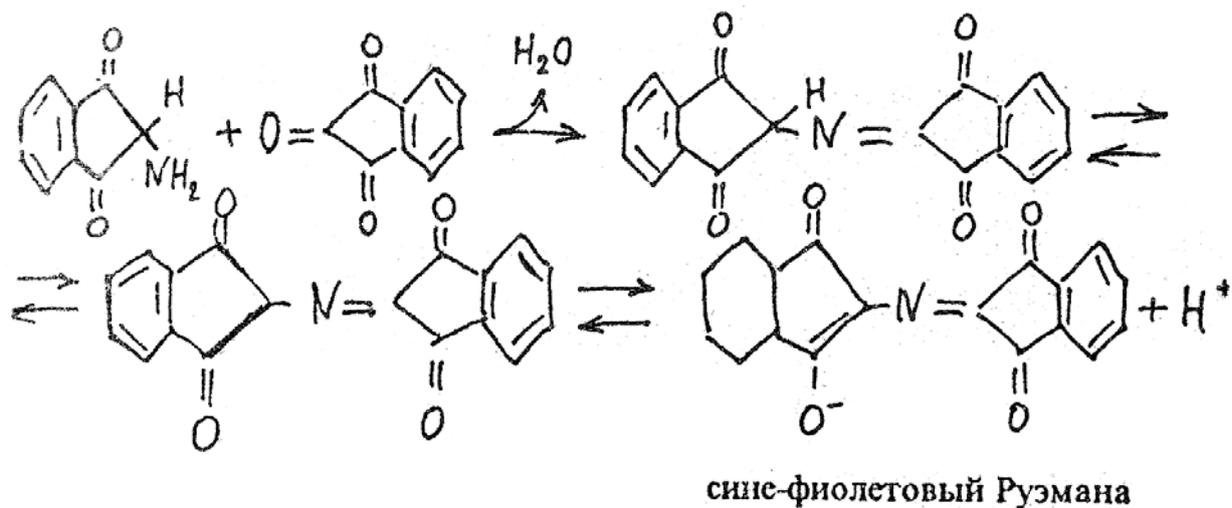
2. Нингидриновая реакция

К 2 - 3 мл разбавленного белка приливают 3 - 4 капли 1%-ного раствора нингидрина в 95%-ном ацетоне. Раствор перемешивают и ставят в водяную баню при $70^{\circ}C$ на несколько минут. Появляется сине-фиолетовое окрашивание.

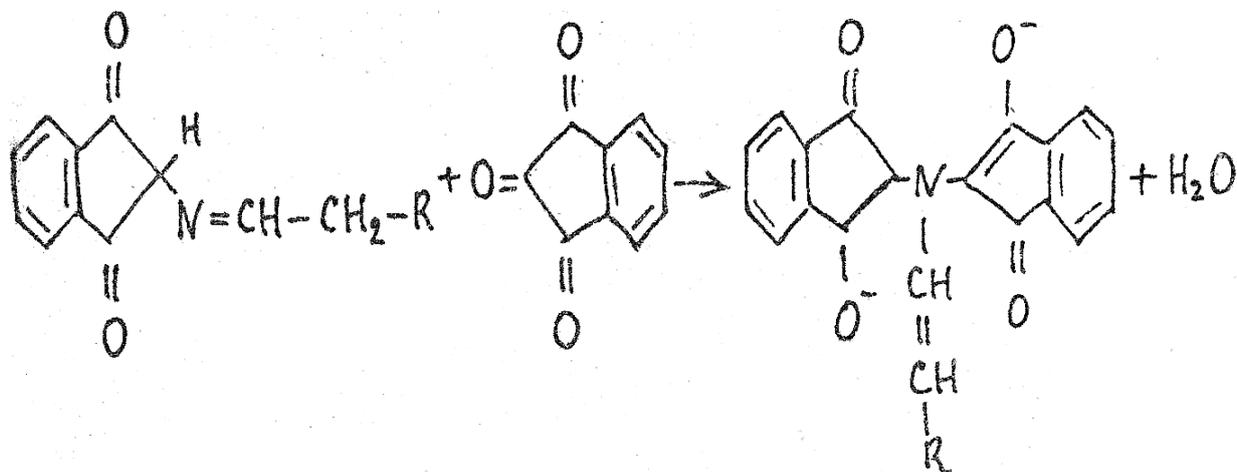
Сначала в результате взаимодействия α -аминогруппы аминокислоты (или белка) с нингидрином возникает Шиффово основание. Затем оно претерпевает перегруппировку, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминокетогидринден.



Аминодикетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина, и образовавшееся соединение, енолизируясь, переходит в окрашенную форму, получившую название "сине-фиолетовый Рузмана" - по имени исследователя, впервые в 1910 г. изучившего эту реакцию.



В присутствии органических растворителей (ацетона, этанола, пиридина и др.), на которых обычно готовят раствор нингидрина, протекает реакция:



Продукт этой реакции содержит в своем составе радикал (R) исходной аминокислоты, который обуславливает различную окраску (голубую, красную и т.п.) соединений, возникших при реакции аминокислот с нингидрином.

В настоящее время нингидриновая реакция широко используется как для открытия отдельных аминокислот, так и для определения их количеств.

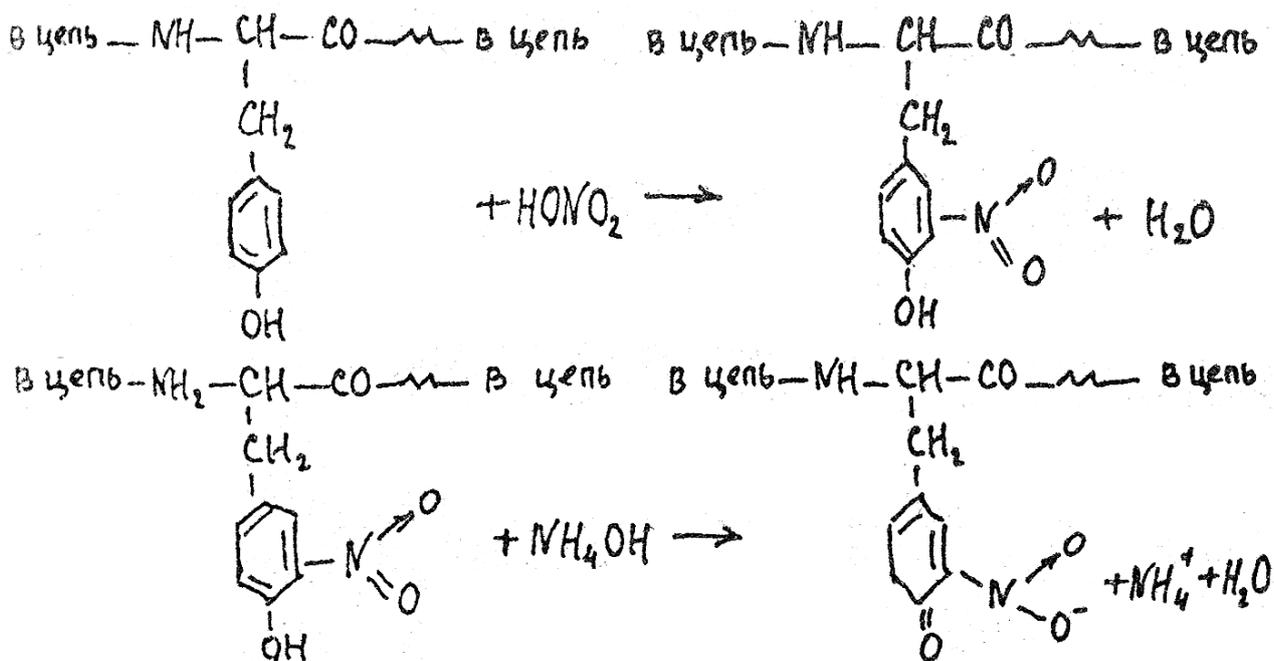
3. Ксантопротеиновая реакция. К 1 мл разбавленного белка добавляют 5 - 6 капель концентрированной азотной кислоты до появления белого осадка или мути от свернувшегося белка. При нагревании раствор и осадок окрашиваются в ярко-желтый цвет. При этом осадок почти полностью растворяется.

Охлаждают смесь и осторожно добавляют к раствору, имеющему кислую реакцию, не взбалтывая, по каплям избыток щелочи до щелочной реакции. Выпадающий вначале осадок кислотного альбумината растворяется, и жидкость окрашивается в ярко-оранжевый цвет.

Ксантопротеиновая реакция происходит только при наличии в белках остатков ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана). Желатин, не содержащий ароматических аминокислот, не дает ксантопротеиновой пробы. В результате реакции

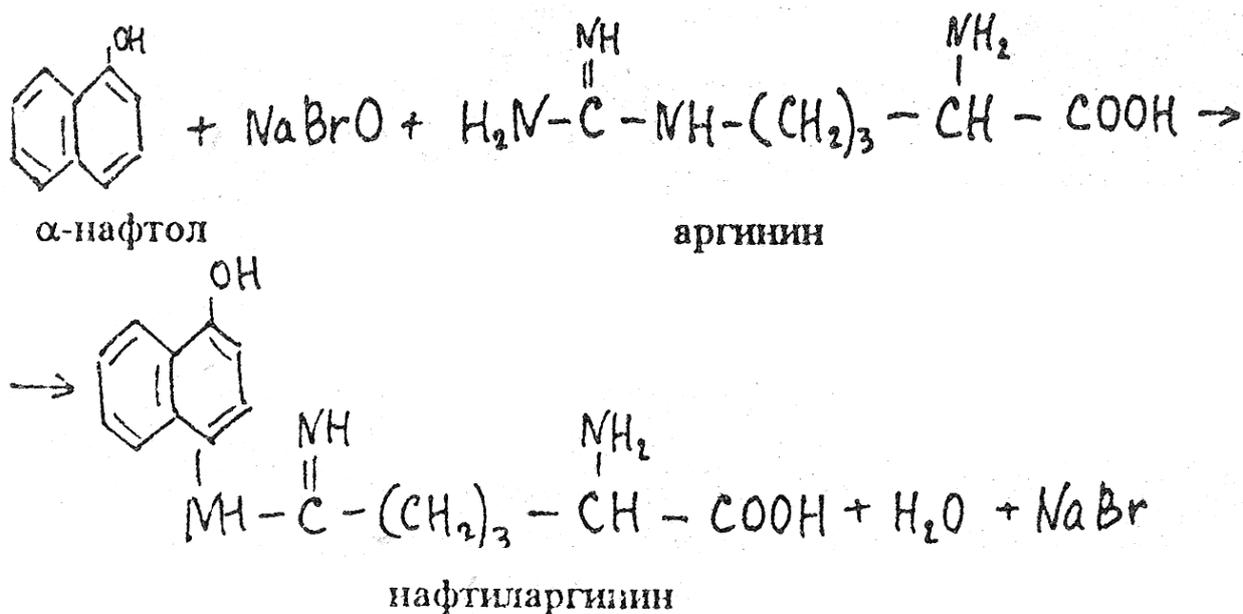
нитрования по радикалам ароматических аминокислот образуются желтоокрашенные нитросоединения. Изменение желтой окраски на оранжевую в щелочной среде обусловлено появлением хромофорной группы.

Рассмотрим в качестве примера механизм ксантопротеиновой реакции по радикалу тирозина:

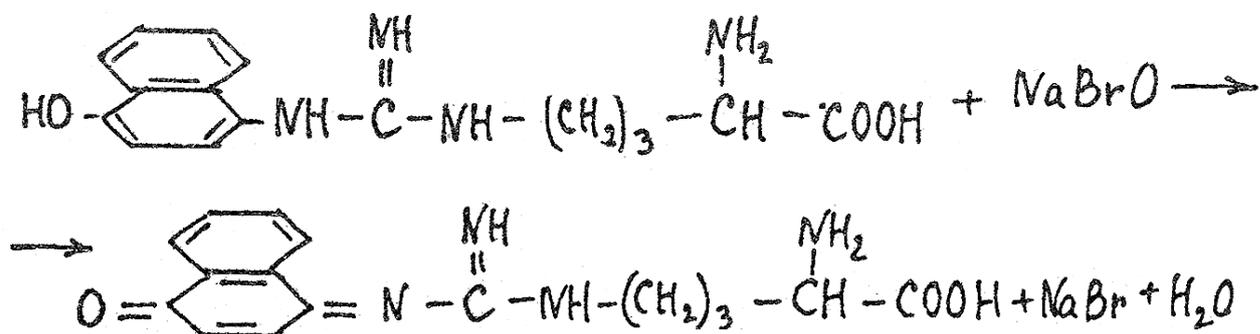


4. *Реакция Сакагучи.* Берут в пробирку 2 мл разбавленного раствора белка, добавляют 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и вслед за этим несколько капель 0,2%-ного спиртового раствора 1-нафтола. Перемешивают, доливая 0,5 мл раствора гипобромида натрия, и вновь перемешивают. Развивается оранжево-красное окрашивание. Появление окраски объясняется взаимодействием 1-нафтола в присутствии окислителя с гуанидиновыми группировками радикалов аргинина.

Хотя механизм реакции еще полностью не выяснен, ряд наблюдений свидетельствует в пользу следующей схемы. Сначала 1-нафтол в присутствии окислителя соединяется с гуанидиновой группировкой аргинина:



Затем при дальнейшем окислении нафтиларгинина образуется соединения типа хинонимина:

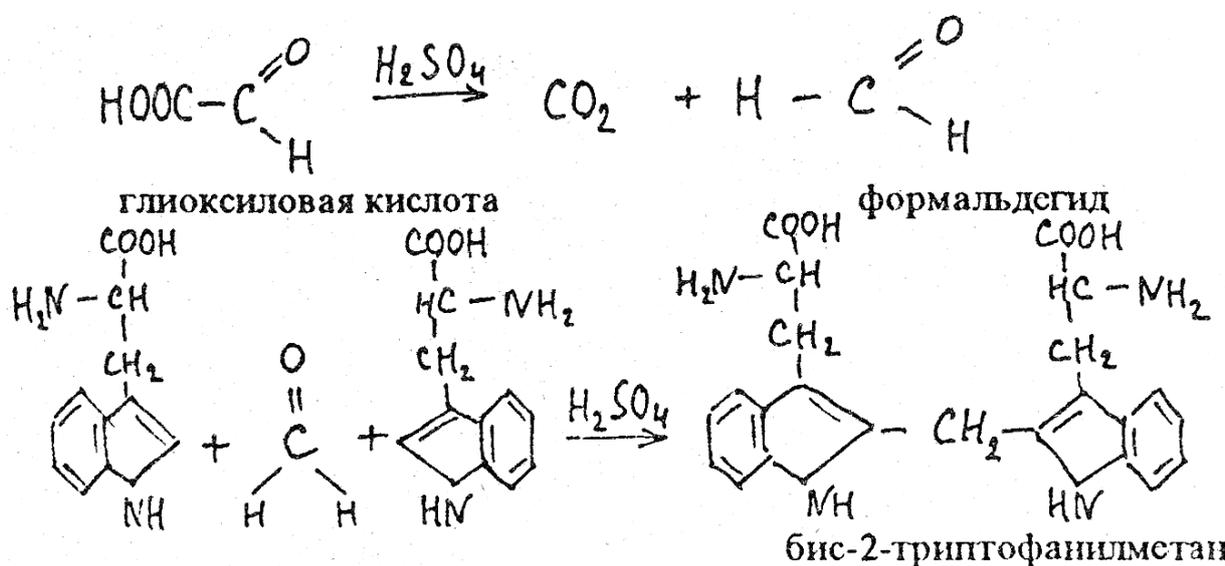


Так как производные хинониминов (в данном случае нафтохинонимина), у которых водород иминогруппы замещен на алкильный или арильный радикал, всегда окрашены в желто-красные тона, то,

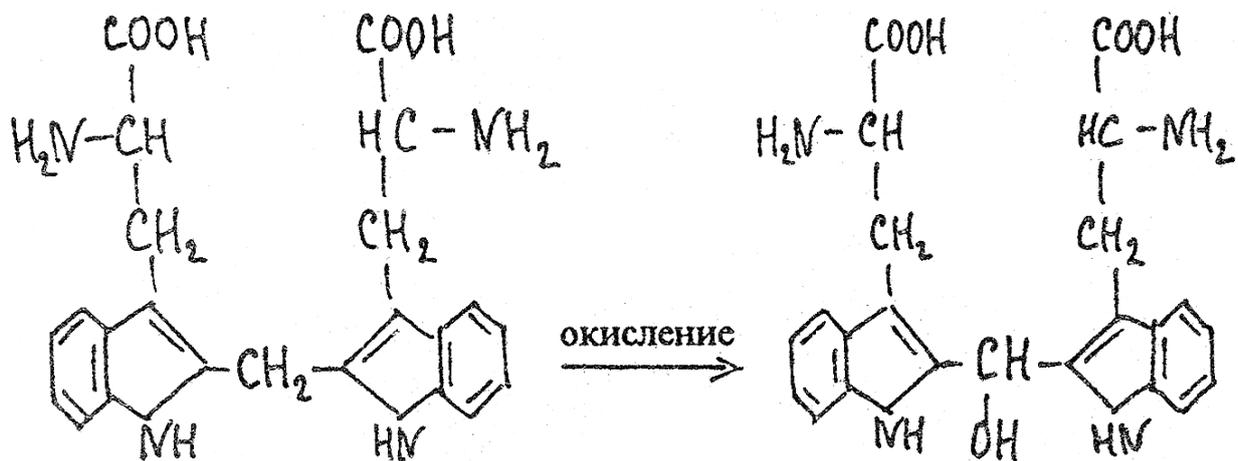
по-видимому, оранжево-красный цвет раствора при проведении реакции Сакагучи объясняется возникновением именно производного нафтохинонимина. Не исключена, однако, вероятность образования еще более сложного соединения за счет дальнейшего окисления NH-групп гуанидинового остатка и бензольного ядра 1-нафтола.

5. *Реакция Адамкевича.* Наливают в пробирку несколько капель неразбавленного белка и прибавляют 2 мл уксусной кислоты, к которой добавляют немного глиоксиловой кислоты. Смесь слегка нагревают до растворения образующегося осадка. Охлаждают пробирку со смесью, а затем, сильно наклонив ее, осторожно, по стенке приливают 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы обе жидкости не смешивались. При стоянии на границе двух жидкостей получается красно-фиолетовое кольцо. Окраска возникает за счет реакции триптофана с глиоксиловой кислотой, всегда присутствующей в уксусной кислоте в виде примеси.

Триптофан в этой реакции конденсируется с формальдегидом, выделяющимся из глиоксиловой кислоты под воздействием концентрированной серной кислоты:



Продукт конденсации окисляется до бис-2-триптофанилкарбинола:

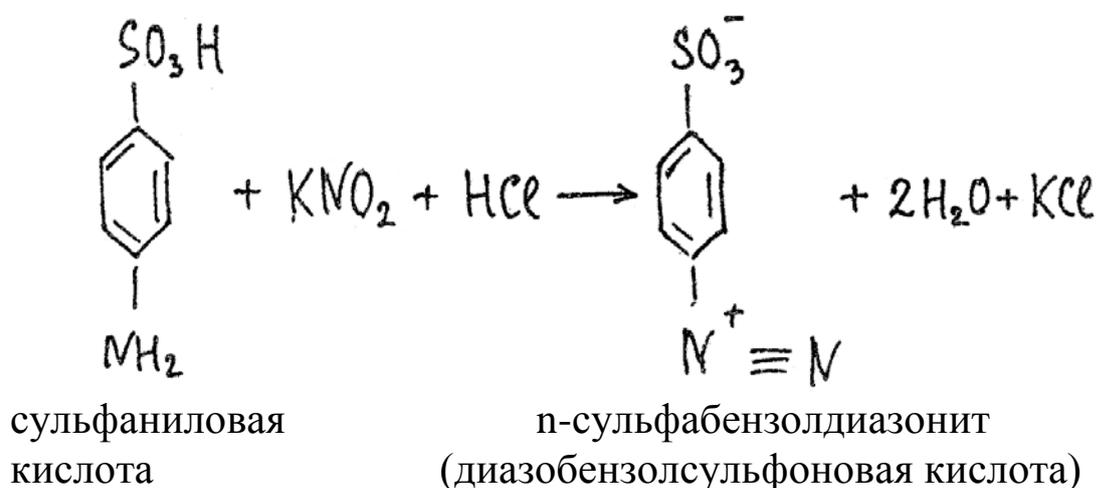


Последний в присутствии минеральных кислот образует окрашенные в сине-фиолетовый цвет соли (явление галохромии).

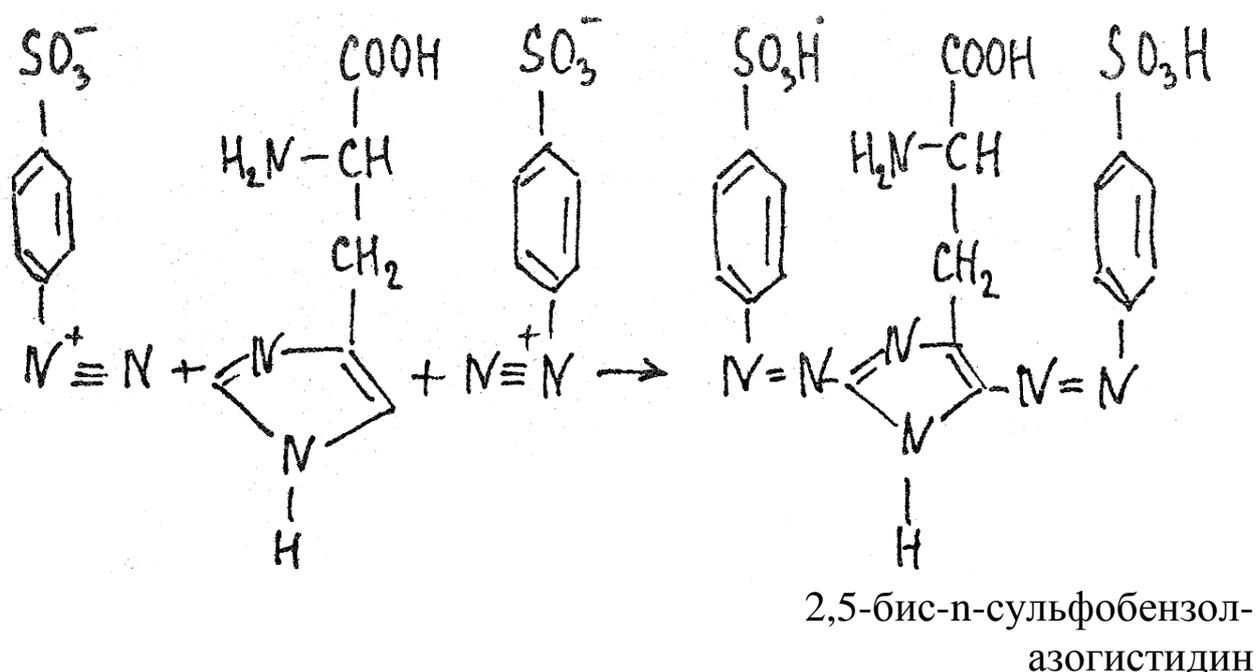
6. *Реакция Паули.* К 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты в 5%-ном растворе соляной кислоты приливают 2 мл 0,5%-ного раствора нитрита натрия. Сильно встряхнув, быстро добавляют сначала 2 мл разбавленного раствора белка, а затем, после перемешивания содержимого, 6 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. После смешивания растворов развивается вишнево-красное окрашивание.

Возникновение окраски обусловлено наличием в белковой молекуле остатков гистидина и тирозина.

При взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитритом натрия осуществляется реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоная кислота:



При реакции последней с гистидином образуется соединение вишнево-красного цвета:



7. Реакция “на слабосвязанную серу”. В пробирку наливают 0,5 - 1,0 мл неразбавленного белка, добавляют двойной объем концентрированного раствора щелочи, кладут несколько “кипятильников” и кипятят смесь (*осторожно, жидкость может выбросить!*). При этом выделяется аммиак, который может быть обнаружен по запаху и посинению лакмусовой бумажки, поднесенной к отверстию пробирки (*не касаться стенки!*). Образующийся незначительный осадок растворяется при кипячении.

К горячей щелочной жидкости приливают раствор плюмбита натрия, образуется черный осадок.

Под действием щелочи наблюдается отщепление части аминокрупп (реакция дезаминирования) в виде аммиака. В щелочной среде происходит также постепенное отщепление ионов серы со степенью

окисления +2 от радикалов аминокислот, содержащих серу. Образование ионов серы можно обнаружить с помощью ионов свинца, образующих с ионами серы черный нерастворимый осадок сульфида свинца:



плюмбит

натрия

Раздел II. Ферменты

Работа 4. Качественные реакции на присутствие ферментов

Оборудование и реактивы: ступка с пестиком, пробирки химические, баня водяная, пипетки на 1, 2 и 5 мл, воронка Бюхнера, терка, пероксид водорода (0,5%-ный и 2%-ный), пирогаллол (1%-ный), тирозин (насыщенный), марля, пластинка стеклянная, колба коническая на 100 мл, цилиндр мерный на 50 мл, 1%-ный раствор мочевины и тиомочевины, 0,02%-ный раствор спиртовой фенолфталина, клейстер крахмальный (1%-ный), йод (1%-ный) в йодиде калия (3%-ном), фелингова жидкость.

Материалы: картофель сырой, арбузные семечки, разбавленная слюна (рот ополаскивают 2-3 раза водой для удаления остатков пищи, отмеряют цилиндром 50 мл дистиллированной воды и ополаскивают ею рот в течение 3 - 5 мин. в несколько приемов. Собранную жидкость - примерно 50 - 60 мл - фильтруют через вату и фильтрат используют для работы).

Ход работы

1. *Открытие уреазы в арбузных семечках.* Два арбузных семечка очищают от кожуры и растирают в ступке с 5 мл воды. В опыте затем используют полученную суспензию уреазы.

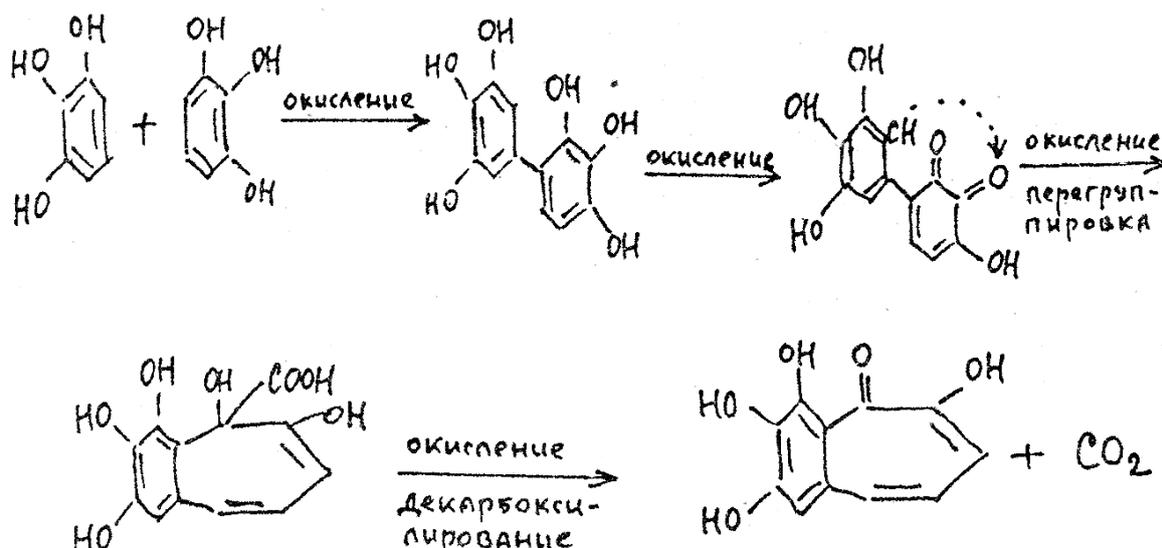
В две пробирки наливают по 2 мл суспензии уреазы. Затем в одну пробирку приливают 2 мл раствора мочевины, а в другую - 2 мл

раствора тиомочевины. В обе пробирки добавляют по 3 - 4 капли раствора фенолфталеина. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре на 10 - 15 минут. Наблюдайте, что происходит в пробирках. Запишите уравнение реакции, сделайте вывод.

2. *Открытие амилазы в слюне.* В две пробирки наливают по 5 мл картофельного клейстера и в одну из них - 5 мл воды, а в другую - 5 мл раствора слюны. Обе пробирки со стеклянными палочками, погруженными в них, одновременно помещают в водяную баню при 40⁰С. Через 1 минуту от каждой смеси отбирают с помощью стеклянной палочки по капле жидкости и смешивают их по отдельности с каплей йода, заранее нанесенной на пластинку. Повторяют взятие проб через 2, 4, 6 и 8 минут. Окраска с йодом проб из пробирки, содержащей слюну, меняется от синей к сине-фиолетовой, бурокрасной, красной и, наконец, желтой.

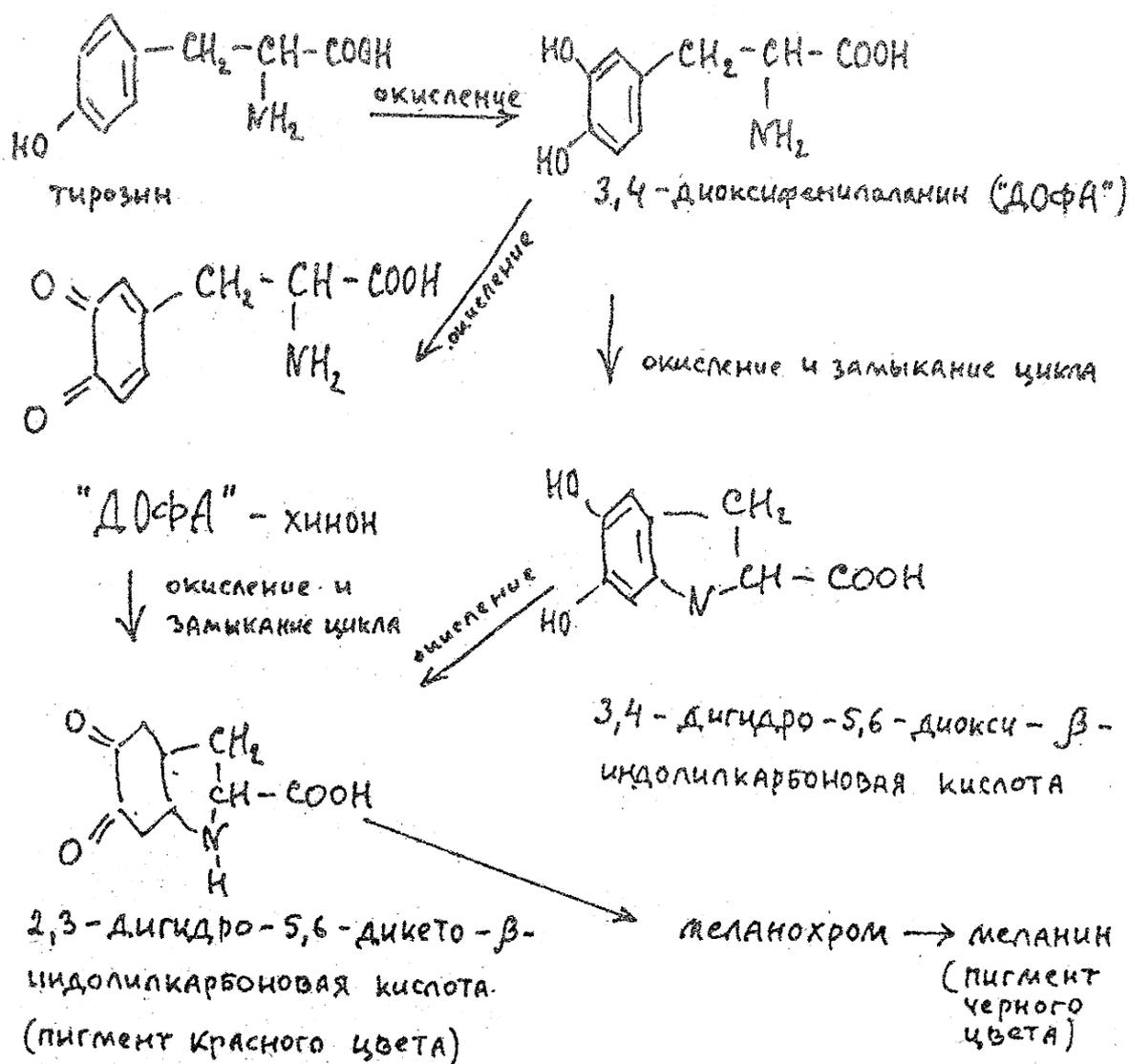
К содержимому пробирки со слюной добавляют 1 - 2 мл фелинговой жидкости и смесь нагревают до начала кипения. Образуется красный осадок оксида меди (I) за счет восстановления гидроксида меди (II) образовавшимися мальтозой и низкомолекулярными декстринами. Контрольная проба в тех же условиях не восстанавливает гидроксид меди (II) в оксид меди (I).

3. *Открытие пероксидазы (донор: H₂O₂ - оксидоредуктаза; КФ 1.11.1.7) в картофеле.* Картофель натирают на терке. Небольшое его количество, не отжимая, переносят в пробирку, добавляют 1 - 2 мл 1%-ного раствора пирогаллола и 2 - 3 капли 2%-ного раствора пероксида водорода. При стоянии выпадает желто-бурый осадок пурпурогаллина. Образование пурпурогаллина выражает следующая схема:



Многokратное дегидрирование (окисление) пирогаллола и ряда промежуточных продуктов на пути к пурпурогаллину осуществляется с участием пероксидазы, каждый раз передающей снятые атомы водорода на пероксид водорода.

4. *Открытие тирозиназы (o-дифенол: оксидоредуктаза; КФ 1.10.3.1.) в картофеле.* Картофель натирают на терке, отжимают через несколько слоев марли и полученный экстракт немедленно фильтруют на воронке Бюхнера. В пробирку наливают 1 мл экстракта, 2 - 3 капли раствора тирозина, перемешивают и помещают пробирку в водяную баню, нагретую до 40⁰С. Время от времени пробирку встряхивают для лучшего соприкосновения жидкости в пробирке с воздухом. Окраска смеси становится розово-красной, затем бурой и через 1 - 2 часа - черной, так как под действием тирозиназы (монофенолоксидазы) тирозин превращается через окрашенные в красный цвет промежуточные продукты в черный азот, содержащий пигмент - меланин:



Сделайте вывод о классе, подклассе обнаруженных ферментов, субстратах и продуктах реакций.

Работа 5. Свойства ферментов

Оборудование, реактивы: баня водяная, пробирки химические, пипетки на 1, 2 и 5 мл; палочки стеклянные, пластинки стеклянные, бюретки прямые с краном на 50 мл, крахмал (1%-ный, 0,5%-ный, 1%-ный в хлориде натрия 0,3%-ном), соляная кислота (10%-ная), йод (0,3%-ный в йодиде калия 3%-ном), гидроксид натрия (10%-ный), сульфат меди (1%-ный и 3%-ный), тростниковый сахар (2%-ный), препарат дрожжевой сахарозы (1%-ный), фелингова жидкость, дигидрофосфат калия (1/15 М), гидрофосфат натрия (1/15 М).

Материалы: слюна разбавленная (см. Работу 4), слюна неразбавленная профильтрованная.

Ход работы

1. Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов. В три пробирки наливают по 5 мл 1%-ного раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую - 1 мл 10%-ной соляной кислоты, а в третью - 1 мл неразбавленной слюны. Пробирки 1 и 3 после перемешивания помещают в водяную баню при 38⁰С, а пробирку 2 - в кипящую водяную баню. Через 15 - 20 мин. все пробирки вынимают из водяной бани и из каждой берут пробы для определения в них крахмала и глюкозы: первой - по реакции с йодом, второй - по реакции Троммера. Стеклопалочкой наносят по капле раствора из каждой пробирки на стеклянную пластинку рядом с ранее нанесенной каплей раствора йода в йодиде калия, после чего капли соединяют и перемешивают. По интенсивности окраски пробы делают заключение о степени гидролиза крахмала. Для определения глюкозы из каждой пробирки берут по 3 мл раствора, добавляют 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и несколько капель 1%-ного раствора сульфата меди. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появление желтого осадка оксида меди (I) или красного металлической меди указывает на наличие глюкозы. Результаты опыта заносят в таблицу:

Таблица 2

<i>№ пробирки</i>	<i>Субстрат</i>	<i>Катализатор</i>	<i>После инкубации</i>	
			<i>проба с йодом</i>	<i>проба Троммера</i>
1	Крахмал	-		
2	Крахмал	Соляная кислота		
3	Крахмал	Амилаза слюны		

2. Специфичность действия амилазы (α -1,4-глюкан-4-глюкано-гидролаза; КФ 3.2.1.1.) и сахаразы (β -D-фруктофуранозид-фрукто-гидролаза; КФ 3.2.1.26). Нумеруют четыре пробирки. В пробирки 1 и 2 наливают по 2 мл раствора крахмала, в пробирки 3 и 4 - по 2 мл раствора сахарозы. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 0,5 мл разбавленного раствора слюны, в пробирки 2 и 4 - по 0,5 мл раствора препарата дрожжевой сахаразы. Перемешивают содержимое и ставят на 10 минут в водяную баню, нагретую до 38 - 40⁰С. После охлаждения проводят реакции (см. Работу 4) с йодом на присутствие крахмала в пробах 1 и 2 и глюкозы - в пробах 3 и 4. Делают заключение о специфичности изученных ферментов.

3. Влияние температуры на активность амилазы слюны. В четыре пронумерованные пробирки наливают по 2 мл 1%-ного р-ра крахмала. Пробирку 1 помещают в кипящую водяную баню, пробирку 2 - в водяную баню при 40⁰С, пробирку 3 оставляют при комнатной температуре и пробирку 4 помещают в лед. Через 10 мин., когда содержимое пробирок примет заданную температуру, во все пробирки добавляют по 0,5 мл разбавленной слюны, перемешивают с помощью стеклянной палочки и оставляют в тех же условиях. Наблюдение за ходом гидролиза ведется по реакции с йодом. Для этого наносят на стеклянную пластинку несколько капель раствора йода и смешивают их с каплями гидролизуемой смеси, беря пробы через 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 мин. По изменению окраски крахмала с йодом судят о степени гидролиза крахмала в каждой пробирке. Результаты наблюдений заносят в таблицу, помечая буквой с (синяя окраска) положительную пробу с йодом на крахмал, буквой к - положительную пробу на декстрины (окраска красных тонов) и буквой ж - отрицательную пробу (желтая окраска йода).

Таблица 3

№ про- бирки	Температу- ра в про- бирке, ⁰ С	Реакция с йодом по истечении времени, мин						
		1	2	4	6	8	10	12
1	100							
2	40							
3	15 - 20							

4	0							
---	---	--	--	--	--	--	--	--

На основании полученных данных делают вывод о величине температурного оптимума для амилазы слюны.

4. Влияние pH на активность ферментов. Серии растворов с определенными значениями pH получают, используя фосфатный буфер. Две бюретки заполняют 1/15 М раствором гидрофосфата натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) и 1/15 М раствором дигидрофосфата калия (KH_2PO_4). Растворы смешивают в определенных соотношениях таким образом, что в каждой пробирке получают по 5 мл буферной смеси с величинами pH: 5,59; 6,98; 7,38; 8,04.

Для получения 5 мл фосфатной буферной смеси с pH 5,59 из бюреток к 0,25 мл Na_2HPO_4 добавляют 4,75 мл раствора KH_2PO_4 ; pH 6,98 - к 3,2 мл раствора Na_2HPO_4 добавляют 1 мл раствора KH_2PO_4 ; pH 7,38 - к 4 мл раствора Na_2HPO_4 добавляют 1 мл раствора KH_2PO_4 и pH 8,04 - к 4,75 мл Na_2HPO_4 добавляют 0,25 мл раствора KH_2PO_4 .

В каждую из четырех пробирок добавляют по 1 мл 0,5%-ного раствора крахмала, 1 мл разбавленной слюны и тщательно перемешивают содержимое с помощью стеклянной палочки. Далее все пробирки, не вынимая из них стеклянных палочек, помещают в водяную баню, нагретую до 40⁰С. Спустя 3 - 5 мин. из всех пробирок палочками наносят на стеклянную пластинку по капле смеси рядом с предварительно уже нанесенными на нее каплями раствора йода. Капли соединяются, и, если наблюдается различие окраски с йодом в испытуемых пробах, пробирки вынимают из бани, охлаждают и добавляют в каждую по 3 - 4 капли раствора йода. При отсутствии заметного различия в окраске проб с йодом на стеклянной пластинке продолжают нагревание пробирок в водяной бане еще несколько минут, а затем вновь испытывают на пластинке пробы на степень расщепления крахмала. Эту операцию повторяют до тех пор, пока не произойдет заметных сдвигов в окраске проб с йодом.

Продолжают инкубацию всех проб в присутствии добавленного йода и для каждой из них отмечают время, когда исчезнет синее окрашивание (конец амилолитического расщепления). Полученные результаты отражают графически: по оси абсцисс наносят pH опы-

тов, а по оси ординат - время расщепления крахмала при соответствующих значениях рН. Соединяя точки линией, получают кривую, характеризующую зависимость активности фермента от значения рН среды.

5. Действие активаторов и парализаторов на амилазу слюны. В штативе 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 так 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 р-ра хлорида натрия и в пробирки третьего ряда - по 1 мл р-ра сульфата меди. Далее во все пробирки наливают из бюретки по 2 мл р-ра крахмала в следующем порядке: сначала в первые номера всех рядов, потом во вторые, и т.д. Содержимое перемешивают и ставят штатив в термостат при 40⁰С на 15 мин. По охлаждении в каждую из них добавляют по капле р-ра йода и отмечают в каждом ряду номер пробирки, в которой реакция с йодом 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) или ингибитор (CuSO₄) стимулирует или тормозит действие амилазы слюны.

Раздел III. Нуклеиновые кислоты

Работа 6. Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей и качественное определение продуктов их гидролиза (белка, рибозы, пуриновых оснований и фосфорной кислоты)

Нуклеопротеины – сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты – ДНК или РНК. В дезоксирибонуклеопротеинах (ДРНП) и рибонуклеопротеинах (РНП) нуклеиновые кислоты и белки связаны друг с другом в основном солевыми связями, которые могут легко диссоциировать, что и происходит достаточно часто в процессе выделения ДРНП и РНП, особенно в момент воздействия крепких растворов солей.

Выделение нуклеопротеинов можно осуществить различными методами: 1) извлечением дистиллированной водой с последующим осаждением нуклеопротеина уксусной кислотой; 2) экстракцией слабым раствором (0,2 - 0,4%) щелочи с последующим действием уксусной кислоты; 3) экстракцией растворами хлорида натрия средних концентраций, из которых нуклеопротеины выпадают при разбавлении раствора; 4) последовательным извлечением различных нуклеопротеинов сначала 0,15 М раствором хлорида натрия, затем 1 М его раствором и, наконец, 0,27%-ным раствором гидроксида натрия; 5) ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы или хлорида цезия; 6) фильтрованием через гель сефадекса.

Оборудование, реактивы: центрифуга, колба круглодонная на 100 мл с обратным прямым воздушным холодильником, ступка (диаметр 110 мм), стакан стеклянный на 200 мл, цилиндр мерный на 50 мл, воронка стеклянная, пробирки химические, песок промытый и прокаленный, гидроксид натрия (0,4%-ный), уксусная кислота (10%-ная), соляная кислота (конц.), сульфат меди (1%-ный), орциновый реактив, аммиак (конц.), аммиачный раствор оксида серебра, молибдат аммония, диэтиловый эфир, серная кислота (10%-ная).

Материал: дрожжи пекарские (высушенные).

Ход работы

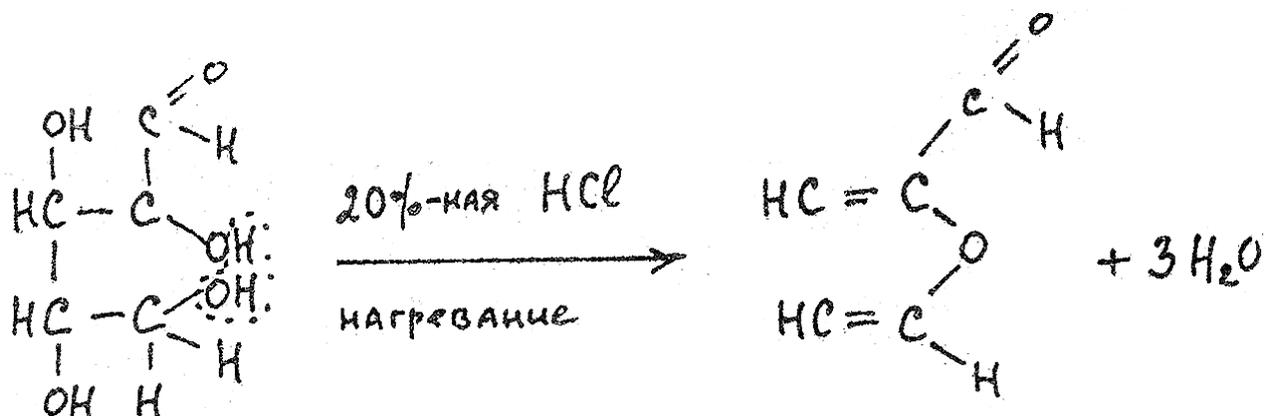
10 г дрожжей смешивают в ступке со смесью (1 мл эфира и 1 мл воды), добавляют 5 г песка и тщательно растирают, приливая к растертой массе небольшими порциями (20 мл) 0,4%-ный раствор гидроксида натрия. Растирание продолжают в течение 15 - 20 мин. После этого осадок отделяют путем центрифугирования (3 мин при 3 000 об/мин). Центрифугат сливают в стакан и к нему добавляют небольшими порциями (по 0,5 мл) 10%-ную уксусную кислоту до слабокислой реакции по лакмусу (5 - 6 мл). Полученный осадок нуклеопротеинов отделяют центрифугированием.

Гидролиз нуклеопротеинов. В колбу для гидролиза (с обратным воздушным холодильником) помещают осадок нуклеопротеинов и 10 мл 10%-ного раствора серной кислоты. Колбу закрывают пробкой с проходящим через нее воздушным холодильником (трубка длиной 70 см и диаметром 0,7 - 0,8 см) и смесь кипятят на сетке в течение 1 часа, поддерживая слабое кипение. Гидролизат отфильтровывают и в прозрачном растворе определяют наличие белков, пентозы, пуриновых оснований и фосфорной кислоты.

Белки обнаруживают по биуретовой реакции.

Пентозу – по реакции с орцином. К 1 мл орцинового реактива добавляют половинный объем гидролизата, 1 мл соляной кислоты и нагревают до кипения. Появляется зеленое окрашивание.

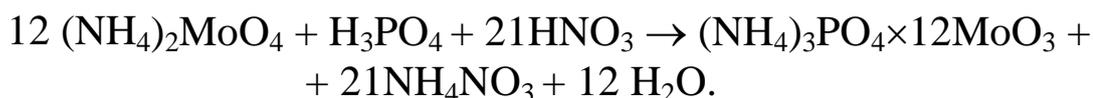
При нагревании с 20%-ной соляной кислотой рибоза дегидратируется и превращается в фурфурол:



Последний конденсируется с орцином с образованием окрашенных соединений. Дезоксирибоза не дает этой реакции.

Пуриновые основания обнаруживают по их реакции с аммиачным раствором оксида серебра. К 2 мл гидролизата приливают по каплям крепкий раствор аммиака до щелочной реакции по лакмусу и добавляют равный объем аммиачного раствора оксида серебра. Постепенно образуется осадок серебрянных солей пуриновых оснований.

Фосфорную кислоту обнаруживают с помощью молибдата аммония. К 2 мл раствора молибдата аммония в азотной кислоте прибавляют 1 мл испытуемого раствора. Смесь слегка нагревают. Образуется желто-зеленый осадок молибдата аммония:



Раздел IV. Углеводы

Работа 7. Качественные реакции на углеводы

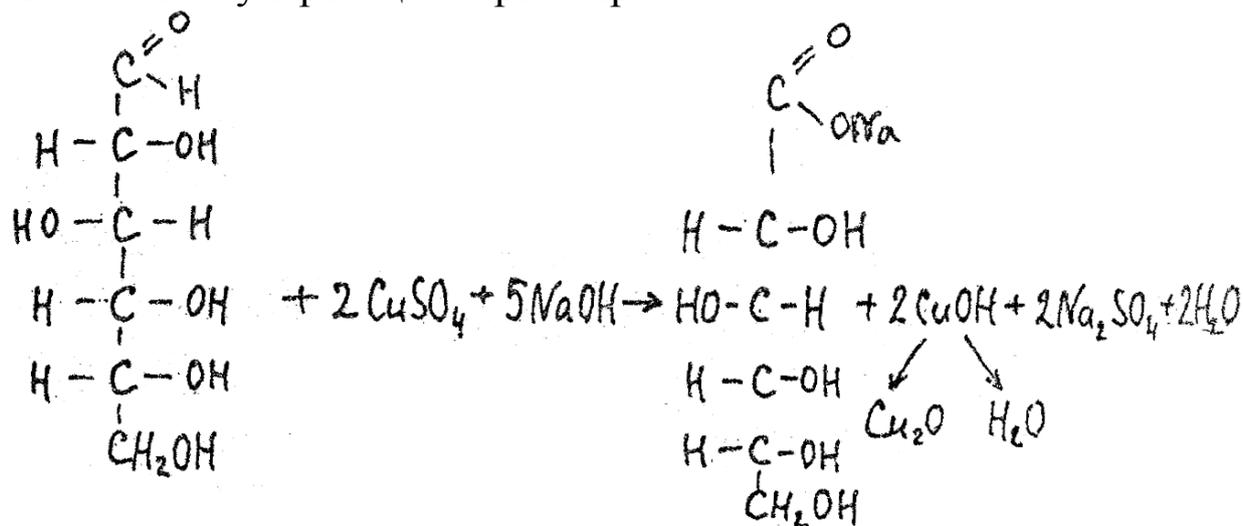
Оборудование, реактивы: пипетки на 1, 2 и 5 мл; пробирки химические; баня водяная; 1-нафтол (10%-ный спиртовой); серная кислота (конц.); гидроксид натрия (10%-ный); сульфат меди (5%-ный); реактив Фелинга; реактив Селиванова; орциновый реактив; раствор Люголя; этиловый спирт; хлорид натрия (крист.).

Материалы: глюкоза, мальтоза, сахароза, арабиноза, фруктоза, крахмал, гликоген (1%-ные растворы).

Ход работы

1. *Реакция Подобедова - Молиша с 1-нафтолом (на углеводы).* В пробирку берут 1 мл испытуемого раствора или крупинку твердого вещества, растворенного в 1 мл воды, добавляют 2 капли 10%-ного спиртового раствора 1-нафтола и по стенке пробирки приливают осторожно, без встряхивания, 2 мл конц. серной кислоты. Серная кислота опускается на дно пробирки, на границе двух жидкостей образуется кольцо красно-фиолетового цвета. Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, образующиеся из углеводов под действием серной кислоты, конденсируясь с двумя молями сульфенированного 1-нафтола, дают триарилметановый хромоген, который окисляется серной кислотой в окрашенное хиноидное соединение.

2. *Реакция Троммера.* В пробирку наливают 1 - 2 мл раствора глюкозы и равный объем 10%-ного раствора гидроксида натрия. К смеси прибавляют при встряхивании по каплям 5%-ный раствор сульфата меди (II). Осторожно нагревают верхнюю часть содержимого пробирки. Появляется желтое окрашивание - гидроксид меди (I), переходящее в красное - оксид меди (I), что указывает на положительную реакцию Троммера:

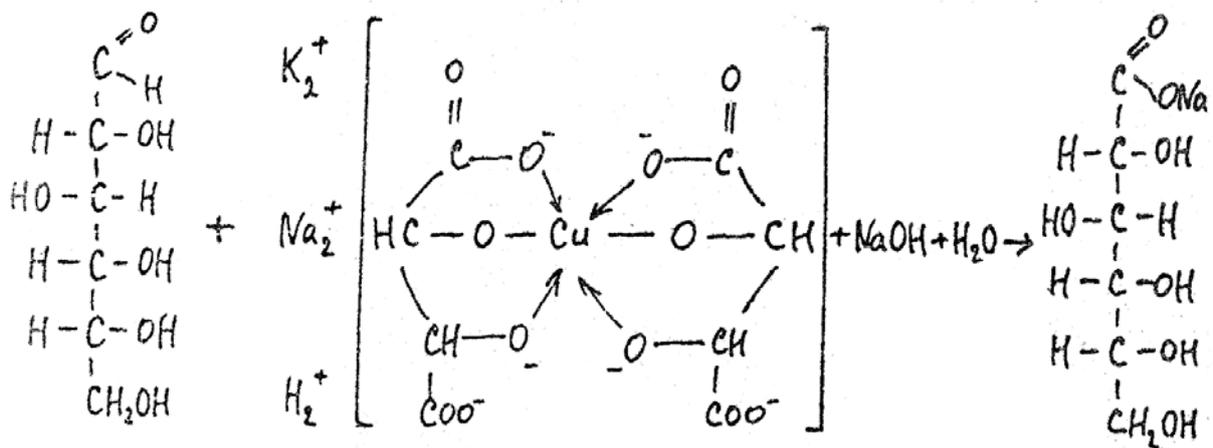


Реакцию Троммера проделывают с растворами мальтозы, сахарозы и крахмала.

Избыток медной соли маскирует реакцию, так как гидроксид меди (II) при нагревании теряет воду и дает черный осадок оксида меди (II).

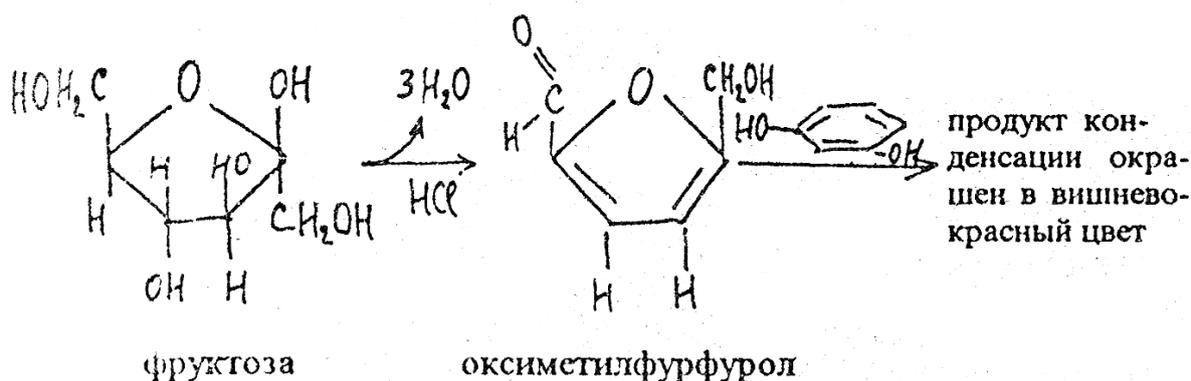
3. *Реакция с фелинговой жидкостью.* Нередко пользуются так называемой фелинговой жидкостью, в которой ион меди в степени окисления +2 находится в виде комплексного соединения с тартратами. Механизм реакции редуцирующих углеводов с фелинговой жидкостью такой же, как и реакции троммера. Преимущество фелинговой жидкости: медь при избытке реактива не выпадает в виде оксида меди (II).

К 1 - 2 мл раствора глюкозы приливают равный объем фелинговой жидкости и смесь нагревают до начинающегося кипения. Образуется красный осадок оксида меди (I).



Продельывают реакцию фелинговой жидкости с растворами мальтозы, сахарозы и крахмала.

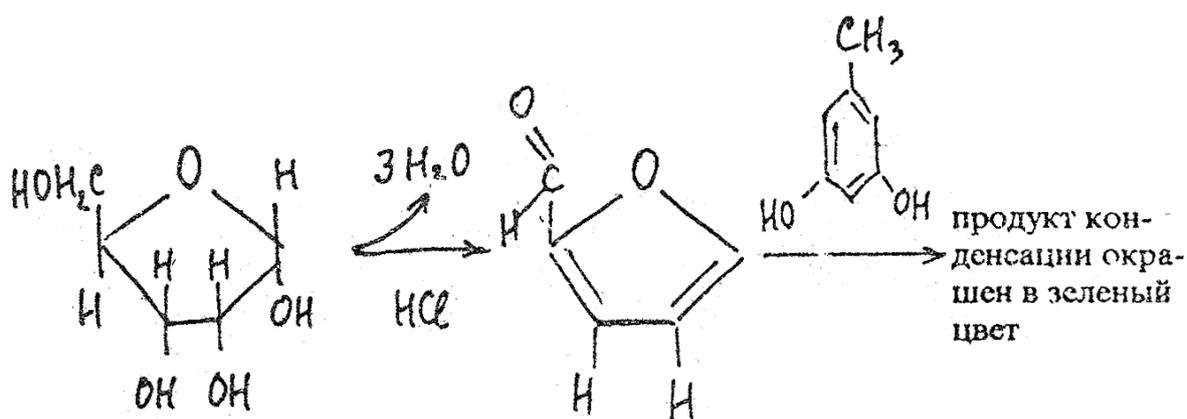
4. Реакция Селиванова на кетозы. При нагревании фруктозы (и других кетогексоз) с соляной кислотой образуется оксиметилфурфурол, который с резорцином образует соединение, окрашенное в вишнево-красный цвет.



Альдозы также дают эту реакцию, но она протекает медленнее и в особых условиях (температура и кислотность среды).

В две пробирки наливают по 3 мл раствора Селиванова, в одну из них прибавляют 3 капли раствора глюкозы, в другую 3 капли раствора фруктозы. Обе пробирки помещают в водяную баню, нагретую до 80⁰С, и держат в ней 8 мин. За это время в пробирке с фруктозой появляется красное окрашивание.

5. Реакция на пентозы с орцином (реакция Биалля). Пентозы в кислой среде образуют фурфурол, который конденсируется с орцином в присутствии следов хлорида железа (III).



К 1 мл испытуемого раствора прибавляют равный объем орцинового реактива. Смесь нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин. При наличии пентоз или метилпентоз появляется зеленое окрашивание раствора.

6. Реакция крахмала и гликогена с йодом. К 1 - 2 мл раствора крахмала прибавляют 1 - 2 капли раствора Люголя. Раствор окрашивается в синий цвет. Содержимое пробирки делят на 3 части, к первой прибавляют 1 - 2 мл этилового спирта, ко второй – 1 - 2 мл 10%-ного р-ра гидроксида натрия, третью часть нагревают. Во всех случаях окраска исчезает, причем в третьей пробирке окраска вновь появляется при охлаждении. Реакция основана на образовании нестойкого адсорбционного соединения йода с амилозой.

В пробирку наливают 2 - 3 мл раствора гликогена, добавляют 1 - 2 капли раствора Люголя, перемешивают, появляется красное окрашивание. Окраска усиливается при добавлении нескольких кристалликов хлорида натрия, но исчезает при добавлении гидроксида натрия или нагревании.

Различия в цвете комплексов йод-крахмала и йод-гликогена свидетельствует о различии структур крахмала и гликогена.

Раздел V. Липиды

Работа 8. Характерные реакции на липиды

Оборудование, реактивы: баня водяная; пробирки; пипетки на 1, 2 и 5 мл; фарфоровые чашки; пробирки широкие с пробками, в которые вставлены воздушные холодильники; петролейный эфир; бензин; хлороформ; четыреххлористый углерод; спирт; эфир; едкий калий (5%-ный); раствор куриного белка; раствор мыла; карбонат натрия (5%-ный); спиртовой раствор едкого калия; соляная кислота (конц.); хлористый кальций (5%-ный раствор); свинец уксуснокислый (10%-ный раствор); бисульфат калия (крист.); натрий хлористый (крист.); фенолфталеин.

Материалы: масло растительное, масло касторовое, масло сливочное.

Ход работы

1. *Растворимость жиров.* В 8 пробирок поместить по 1 - 2 капли подсолнечного масла, после чего прибавить в них последовательно по 2 - 3 мл растворителя: в первую - дистиллированную воду, во вторую - петролейный эфир, в третью - бензин, в четвертую - хлороформ, в пятую - четыреххлористый углерод, в шестую и седьмую - спирт, в восьмую - эфир. Взбалтыванием хорошо перемешать содержимое каждой пробирки, шестую или седьмую нагреть. Записать, какие из испытанных веществ являются растворителями жиров.

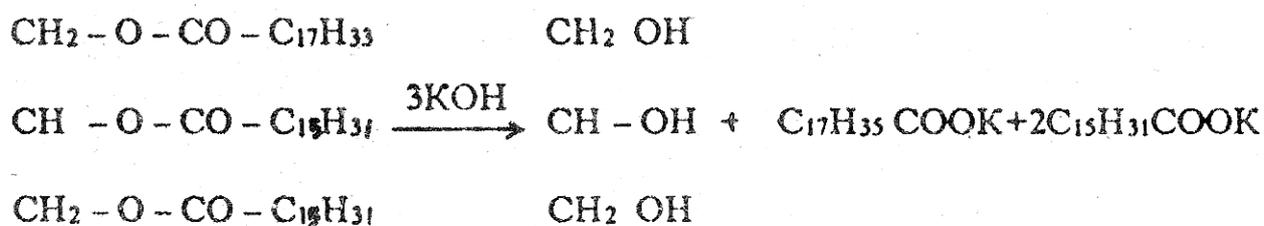
2. *Эмульгирование жиров.* Жиры при взбалтывании с водой образуют эмульсию, представляющую собой дисперсную систему, в которой мелкие капли жира взвешены в воде. Эмульсия масла в воде неустойчива, в спокойном состоянии наступает быстрое расслаивание, мелкие капли жира в процессе столкновения друг с другом соединяются в более крупные, переходящие далее в слой масла на поверхности воды. Чтобы придать стойкость эмульсии в воде, необходимо введение ряда веществ, способных в результате адсорбции на поверхности шарика эмульгированного вещества уменьшить по-

верхностное натяжение масла, в результате чего происходит снижение поверхностной энергии и эмульсия приобретает устойчивость. Вещества, снижающие поверхностную энергию, называются *эмульгаторами*. Склонность некоторых веществ к образованию эмульсий важна как в биологическом, так и народнохозяйственном отношении.

К числу природных эмульсий относятся молоко, лимфа, латекс (каучуки). Вещества, находящиеся в организмах животных и растений, свободно перемещаются совместно с током жидкости. Жиры, находящиеся в кишечнике в виде эмульсий, характеризуются большой поверхностью, способствующей более энергичному воздействию на них ферментов.

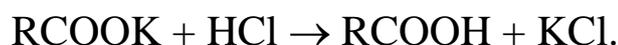
Взять в 5 пробирок по равному количеству подсолнечного масла (4 - 5 капель), прилить в первую из них 5 мл дистиллированной воды, а в остальные прилить по 5 мл: во вторую - 5%-ный раствор КОН, в третью - 5%-ный раствор соды, в четвертую - раствор мыла, в пятую - раствор белка. Содержимое пробирок сильно встряхнуть и наблюдать степень стойкости возникших эмульсий во взятых пробирках. Результаты наблюдений занести в журнал.

3. *Омыление жиров*. Жиры в присутствии щелочи подвергаются гидролизу, при этом образуется мыло и глицерин:



В широкую пробирку с 0,5 - 1 г масла прилить 5 мл спиртового раствора КОН. Содержимое перемешать, закрыть пробирку пробкой, в которую вставлен воздушный холодильник, и нагревать в течение 30 мин. После гидролиза содержимое пробирки перелить в фарфоровую чашку, прибавить 10 мл дистиллированной воды и осторожно нагреть для удаления спирта. Из полученного раствора калийного мыла половину отлить в пробирку.

4. *Реакции свободных жирных кислот.* Оставшийся в фарфоровой чашке раствор мыла подкислить концентрированной соляной кислотой, происходит выделение свободных жирных кислот:



Осадок отфильтровать, отмыть от кислоты так, чтобы промывание не давало кислой реакции на лакмус.

Взять часть жирных кислот в пробирку, растворить в нейтральном эфире, прилить к спирту, содержащему каплю раствора соды и 2 капли фенолфталеина. Жирные кислоты нейтрализуют раствор соды, благодаря чему исчезает малиновая окраска.

Образование нерастворимых кальциевых солей: в пробирку с 2 – 3 каплями калийного мыла (ранее отлитого в пробирку из фарфоровой чашки) прилить 5%-ный раствор хлорида кальция, образуются нерастворимые в воде кальциевые мыла жирных кислот (написать уравнение реакции).

Высаливание мыла: в другую пробирку с 2 - 3 мл раствора мыла прибавить порошок хлористого натрия, происходит осаждение - высаливание мыла.

Образование свинцового пластыря: в третью пробирку с 3 мл раствора мыла прилить несколько капель 10%-ного раствора ацетата свинца. Образуется осадок, который при нагревании делается вязким (свинцовый пластырь).

5. *Акролеиновая реакция.* Эта реакция используется с целью доказательства наличия в жирах глицерина, который при нагревании разлагается с образованием акролеина (акрилового альдегида).

Взять в пробирку 2 - 3 капли масла, прибавить кристаллик бисульфата калия и нагреть, при этом образуется акролеин в виде белого пара с характерным резким запахом горелого сала.

6. *Реакция на лецитин.*

1) *Выделение лецитина из яичного желтка:* взять в сухую пробирку около 2 мл яичного желтка и прилить к нему 5 мл кипящего этанола. Смесь тщательно перемешивать стеклянной палочкой в те-

чение 7 – 10 мин, а затем профильтровать в сухую пробирку. Фильтрование повторить, если фильтрат окажется мутным.

2) *Осаждение лецитина ацетоном*: налить в пробирку 2 - 3 мл ацетона и прилить 5 капель спиртового раствора лецитина. Последний нерастворим в ацетоне, поэтому образуется муть.

3) *Осаждение лецитина хлоридом кадмия*: взять в сухую пробирку 4 - 5 капель спиртового р-ра лецитина и прибавить 2 - 3 капли насыщенного спиртового р-ра хлорида кадмия. Образуется нерастворимое соединение кадмия (4 част.) с лецитином (3 част.).

4) *Получение эмульсии лецитина*: взять в сухую пробирку 5 капель спиртового раствора лецитина и прилить 25 - 30 капель дистиллированной воды. Возникает стойкая эмульсия лецитина.

Работа 9. Определение кислотного числа и числа омыления жира

Кислотное число характеризует кислотность жира и измеряется количеством гидроксида калия (в мг), необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Кислотное число, наряду с другими физико-химическими показателями, характеризует качество масла. Например, если масло получено из зрелых семян, то свободных жирных кислот в нем мало, в масле же незрелых семян содержание свободных жирных кислот незначительно. При хранении масла наблюдается гидролиз глицеридов, который приводит к накоплению свободных жирных кислот, т.е. к возрастанию кислотности. Повышенная кислотность масла указывает на снижение его качества.

Метод определения кислотного числа основан на том, что свободные жирные кислоты, имеющиеся в масле, оттитровываются 0,1 н раствором КОН. Обычно титрование проводят гидроксидом калия, а не гидроксидом натрия, так как образующиеся калиевые мыла лучше растворимы в условиях опыта.

Числом омыления называется количество мг гидроксида калия, необходимое для нейтрализации как свободных, так и связанных (в форме глицеридов) жирных кислот, содержащихся в 1 г масла.

Содержание свободных жирных кислот в масле характеризуется кислотным числом (см. выше), а содержание связанных в виде эфиров - эфирным числом, т.е. количеством гидроксида калия (в мг),

необходимого для нейтрализации освобождающихся при омылении эфирных связей жирных кислот в 1 г масла.

Экспериментально эфирное число определяется по разности между числом омыления и кислотным числом.

Оборудование, реактивы: весы технические, колбы на 50 или 100 мл, цилиндры мерные на 10 и 25 мл, пипетки на 1 и 2 мл, бюретки на 25 или 50 мл, смесь спирта с серным эфиром (1:1), гидроксид калия (спиртовой раствор 0,1 н и 0,5 н), соляная кислота (0,5 н), фенолфталеин (1%-ный).

Материал: масло сливочное, масло растительное.

Ход работы

1. *Определение кислотного числа жира.* Навеску сливочного масла взвешивают на технических весах (2 г), помещают в колбу на 50 - 100 мл и растворяют в 10 - 15 мл нейтральной смеси спирта и эфира (1:1). Для нейтрализации к смеси спирта и эфира прибавляют 3 - 4 капли фенолфталеина и затем 0,1 н спиртовой раствор гидроксида калия по каплям, до появления слабого розового окрашивания. После растворения жира вносят 1 - 2 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н спиртовым раствором гидроксида калия до слабо-розового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать в течение 0,5 - 1 мин.

Кислотное число (к.ч.) вычисляют по формуле:

$$\text{К.ч.} = \frac{V \times T}{a},$$

где V - количество (мл) 0,1 н раствора КОН, израсходованного на титрование взятой навески жира;

T - титр 0,1 н раствора КОН (мг), составляет 5,6 мг КОН в 0,1 мл;
a - навеска жира (г).

2. *Определение числа омыления жира.* В одну колбу емкостью 50 мл вносят 0,5 г сливочного масла, отвешенного на технических весах, а в другую - 0,5 мл воды. Затем в обе колбы добавляют из бюретки по 15 мл 0,5 н спиртового раствора КОН. Колбы закрывают пробками с обратными воздушными холодильниками (длина

70 см) и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 – 40 мин при периодическом встряхивании. Следят, чтобы жидкость в колбе слабо кипела и чтобы верхняя часть трубки не нагревалась.

По окончании омыления в каждую колбу добавляют по 10 - 15 мл воды, по 3 - 4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 н раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания (определяют количество несвязавшейся щелочи). Исходя из того, что 1 мл 0,5 н раствора КОН соответствует 28 мг его, расчет числа омыления (Ч.о.) ведут по формуле:

$$\text{Ч.о.} = \frac{(V_1 - V_2) \times 28}{a},$$

где V_1 - количество (мл) 0,5 н раствора HCl, затраченное на титрование контроля (колба с водой);

V_2 - количество (мл) 0,5 н раствора HCl, затраченное на титрование.

Раздел VI. Электрофорез

Электрофорезом называют движение заряженных коллоидных частиц в постоянном электрическом поле к противоположно заряженному электроду.

Биологические макромолекулы находятся в растворе в виде частиц, которые по своим размерам соответствуют коллоидным частицам. Кроме того, белки и нуклеиновые кислоты содержат ионизирующиеся группы, вследствие чего в растворе они могут существовать в заряженной форме, в виде катионов или анионов. Молекулы с близкими по величине зарядами, но различающиеся молекулярными массами, отличаются друг от друга отношением заряда к массе. На указанных различиях основано разделение ионов при их движении в растворе под действием электрического поля. В этом и состоит принцип электрофореза.

Суммарный электрический заряд белковой молекулы зависит от рН среды и соотношения радикалов аминокислот, обладающих кислотными и основными свойствами. В кислой среде основные группы радикалов аминокислот протонированы, тогда как диссоциация

кислотных групп подавлена, поэтому белки оказываются заряженными положительно. В щелочной среде, наоборот, основные группы не имеют заряда, а кислотные легко диссоциируют, вследствие чего в молекуле белка образуется избыток отрицательно заряженных групп, и белок в целом имеет суммарный отрицательный заряд.

На электрофоретическую подвижность белковых молекул влияют форма и величина белковой молекулы, электрическое поле, характер буфера и его ионная сила, природа носителя.

В качестве опорной среды используют крахмальный, агаровый, полиакриламидный гели. Гели являются не только поддерживающей средой, они функционируют в качестве молекулярного сита. Принцип действия молекулярного сита состоит в том, что крупные молекулы двигаются через него тем медленнее, чем меньше размер пор в геле. Гель-электрофорез особенно ценен для разделения смесей веществ, имеющих одинаковые заряды, но слегка различающиеся по массе.

Самым эффективным из перечисленных выше гелей является полиакриламидный гель (ПААГ). Этот метод обладает большей разрешающей способностью по сравнению с методами, где используются другие гели. Полиакриламидный гель прозрачен, обладает значительной механической прочностью, однороден по составу, химически инертен. Размер пор у ПААГ можно варьировать в широких пределах, его можно применять с самыми различными буферами, удобно использовать для количественного определения разделяемых веществ.

Полиакриламидный гель получают непосредственно перед работой полимеризацией акриламида и метиленбисакриламида.

При этом возникает полимер сетчатой структуры, в котором линейные участки из акриламида “сшиваются” поперечными мостиками из метиленбисакриламида. Чем больше концентрация метиленбисакриламида, тем более плотной получается сетчатая структура геля. Полимеризацию проводят в присутствии тетраметилендиамин (ТЕМЭДа) в качестве инициатора и персульфата аммония или калия как катализатора. Изменяя соотношение мономеров, можно регулировать величину ячеек получаемого полимера трехмерной структуры.

Вариантов проведения электрофореза в полиакриламидном геле много (вертикальный и горизонтальный, в трубках и на пластинах). Чаще других используют метод вертикального электрофореза. В нем сочетаются две системы полиакриламидных гелей: крупнопористая (верхний гель) и мелкопористая (нижний гель). В верхнем геле происходит отделение клеточного материала и уплотнение белков. В нижнем геле происходит разделение белков.

Электрофорез в ПААГе часто называют диск-электрофорезом. Это название происходит от двух английских слов – *discontinuity*, обозначающего в данном случае неоднородность электрофоретической среды, и *discoid* – дискообразный. Дело в том, что по случайному совпадению разделенные зоны имеют форму дисков.

Метод электрофореза в полиакриламидном геле широко используется в различных отраслях биологических, экологических и медицинских исследований:

- в медицине (диагностика заболеваний: изучение белков и ферментов различных органов и тканей в норме и патологии);
- в серологии (разделение белков сыворотки крови для определения родов и видов и их идентификации);
- в генетике (выявление мутаций путем изучения белковых спектров);
- в гистологии и цитологии (анализ компонентов клеточных фрагментов и тканей);
- в ботанике (исследование белков семян растений);
- в микробиологии (изучение белков бактерий, вирусов и фагов, определение принадлежности микроорганизмов к определенному штамму);
- в биохимии (изучение белковых спектров, множественных молекулярных форм ферментов, разделение смесей нуклеиновых кислот в различных органах и тканях организмов);
- в экологии (изучение влияния абиотических и биотических факторов окружающей среды на биохимические показатели обитающих в ней организмов).

Работа 10. Фракционирование белков методом электрофореза в полиакриламидном геле

Разделение белков осуществляют в слабощелочной среде (рН 8.3 - 8.9).

Оборудование, реактивы. Прибор для электрофореза фирмы “Реанал”, универсальный источник питания, рефрактометр, лейкопластырь, ножницы, парафин, набор пипеток и микропипеток, соляная кислота 1 н, триоксиметиламинометан (трис), ТЕМЭД, акриламид, N,N –метиленабисакриламид, персульфат аммония, сахароза 40%-ный раствор, глицин, амидовый черный 10В 1%-ный раствор в смеси этанола, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 10:1:30, уксусная кислота 7%-ный раствор, рибофлавин, дистиллированная вода.

Материалы.

Сыворотка крови. Цельную кровь в широких пробирках оставляют на сутки в холодильнике. Для лучшего отделения сгустка содержимое пробирок обводят вязальной спицей. Через сутки сыворотку отбирают пипеткой с резиновой грушей. Чистая сыворотка имеет соломенно-желтый цвет. Если есть в сыворотке крови примесь форменных элементов (красный оттенок), то ее центрифугируют при 3 000 об/мин в течение 5 минут.

Приготовление колонок полиакриламидного геля

Для приготовления нижнего и верхнего геля используют следующие исходные растворы (их можно хранить месяц в холодильнике):

Раствор А: 1н раствор соляной кислоты – 48 мл; трис - 36.6 г.; ТЕМЭД – 0.23 мл; вода – до 100 мл (рН = 8.6).

Раствор Б: 1н раствор соляной кислоты – 48 мл; трис - 5.98 г; ТЕМЭД – 0.46 мл; вода – до 100 мл (рН = 6.7).

Раствор В: акриламид - 30 г; бисакриламид - 0.735 г; вода - до 100 мл.

Раствор Г: акриламид – 10 г; бисакриламид – 2.5 г; вода – до 100 мл.

Раствор Д: рибофлавин – 4.0 мг; вода – до 100 мл.

Раствор Е: сахароза – 40 г; вода – до 100 мл.

Раствор Ж: персульфат аммония – 0.14 г; вода – до 100 мл.

Процесс полимеризации геля ведут без доступа кислорода. С этой целью нижние концы сухих обезжиренных электрофоретических трубок (диаметр - 0.6 см, длина - 8 см) закрывают водонепроницаемыми доньшками. Готовят смесь для нижнего, разделительного геля. Для этого смешивают 1 часть раствора А, 2 части раствора В, 1 часть воды и 4 части раствора Ж. Эту смесь перемешивают и заливают в электрофоретические трубки (примерно 2 мл). На смесь сразу наслаивают пипеткой по стенке колонки слой свежeproкипяченной дистиллированной воды высотой примерно 8 мм. Полимеризация нижнего геля при комнатной температуре продолжается около часа. Для ускорения процесса полимеризации трубки с гелем помещают в термостат при температуре +37°C. Полимеризация геля в термостате длится около 30 минут. Об окончании процесса полимеризации нижнего геля можно судить по появлению четкой границы между гелем и слоем воды над ним. После окончания процесса полимеризации геля с него удаляют воду и заливают в колонку смесь для верхнего геля. Для этого смешивают 1 часть раствора Б, 2 части раствора Г, 1 часть раствора Д и 4 части раствора Е. Смесь для верхнего геля наносят высотой 0.5 см, что составляет примерно 0.2 мл. На эту смесь снова наслаивают воду и ведут полимеризацию верхнего геля на солнечном свете или под УФ- лампой. Начало полимеризации определяют по переходу флуоресцирующего желто-зеленого цвета смеси в опаловый, а конец – по резкой границе между гелем и водой. Полимеризация верхнего геля длится 10 - 15 минут. После удаления воды колонки готовы для нанесения исследуемого раствора.

Подготовка материала для электрофоретического разделения

Оптимальное количество вносимого однородного белка на одну гелевую колонку – 200 мкг. Для количественного определения содержания белка в биологическом материале чаще всего используют рефрактометрический метод или один из колориметрических методов. После определения содержания белка сыворотку крови разво-

дят 40%-ным раствором сахарозы до концентрации 2000 мкг в мл (на одну гелевую колонку наносят по 0.1 мл раствора, содержащего 200 мкг белка). Так как в сыворотке крови содержится примерно 9% белка, ее разводят раствором сахарозы в 45 раз. На приготовленный гель наносят по 0.1 мл полученного раствора сыворотки крови, затем снимают водонепроницаемые донышки и укрепляют колонки в приборе для электрофореза.

Для приготовления трис-глицинового буфера (pH 8.6) берут 6 г триса и 28.8 г глицина, растворяют их в воде и доводят объем до 1 л дистиллированной водой. Этот же раствор, разбавленный дистиллированной водой в 10 раз, используют для заправки электродных камер прибора для электрофореза. Такой разведенный буферный раствор называют электродным буфером. Его ионная сила равна 0.075.

Монтаж прибора в полиакриламидном геле

Оборудование, необходимое для зонального электрофореза, состоит из двух частей: источника питания и собственно электрофоретического блока. Источник питания генерирует стабилизированный постоянный ток и имеет системы контроля напряжения и силы тока на выходе. В электрофоретический блок входят угольные электроды, буферные камеры, опора для носителя и прозрачная изолирующая крышка.

Угольный электрод закрепляют в центре нижнего буферного резервуара и наливают в последний охлажденный электродный трис-глициновый буфер (pH 8.6). Затем стеклянные трубки с нанесенными образцами ввинчивают в отверстия, просверленные в дне верхнего резервуара. Устанавливают электрод верхнего резервуара, и собранную верхнюю часть прибора присоединяют к нижнему резервуару так, чтобы концы трубок были погружены в буферный раствор нижнего резервуара. Удаляют воздушные пузырьки с концов трубок. Осторожно заполняют верхний резервуар трис-глициновым буфером, разбавленным в 10 раз, следя за тем, чтобы электрод был полностью погружен в раствор. В верхний резервуар добавляют 2 капли раствора бромфенолового синего, служащего индикатором окончания электрофореза.

Проведение электрофореза

Прибор для электрофореза подключают к универсальному источнику питания марки УИП-1. На каждую колонку подают первые 10 - 15 минут силу тока 2 мА, а затем 5 мА, напряжение от 300 до 600 В, длительность электрофореза 60 - 70 минут, температура не выше +4°C (прибор для электрофореза помещают в холодильник). Электрофорез заканчивают, когда индикаторная краска окажется на расстоянии 5 - 6 мм от нижнего края трубки. По окончании электрофореза прибор разбирают, трубки вынимают и извлекают из них гель. Отслаивание геля от стенок стеклянных трубок проводят тонкой металлической иглой. Хорошо использовать с этой целью мандрену от шприцевой иглы или шприц, наполненный водой. Колонку на время извлечения геля с помощью металлической иглы помещают в кристаллизатор с водой. После извлечения гелевую колонку помещают в пробирку и быстро дважды промывают дистиллированной водой. Затем ее заливают 7%-ным раствором уксусной кислоты на 15 - 20 минут для фиксации зон расположения белков и отмывают дистиллированной водой (10 - 15 минут). Замечено, что, чем лучше произошла фиксация, тем быстрее и легче отмывается гель от красителя впоследствии.

Обнаружение белковых фракций

Расположение фиксированных уксусной кислотой белковых фракций на колонках полиакриламидного геля определяют, окрашивая их 1%-ным раствором амидового черного 10 В в смеси этанола, уксусной кислоты, воды (10:1:30). Для этого гелевые колонки опускают в раствор красителя на 1 минуту. В результате вся колонка окрашивается в темный цвет, но только белковые фракции удерживают краситель прочно. От остальной части геля он отмывается смесью этанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 10:1:30, заменяемой многократно.

Электрофореграмму (схему расположения белковых фракций на гелевой колонке) нужно зарисовать в тетради. Каждая белковая фракция может быть охарактеризована по интенсивности окраски и по относительной электрофоретической подвижности (ОЭП). ОЭП белковых фракций рассчитывают, деля длину пути, пройденного

фракцией, на длину пути, пройденного индикаторной краской. Тот и другой путь измеряют с точностью до десятых долей миллиметра, а ОЭП высчитывают с точностью до сотых долей.

При сравнении электрофореграмм на основании статистической обработки данных разницу в 0.01 значения ОЭП у двух фракций с величинами ОЭП вдоль колонки в пределах от 0 до 0.3 считают несущественной. Аналогично этому разницу значения ОЭП 0.02 считают несущественной в пределах от 0.3 до 0.6, а разницу в 0.03 – в пределах от 0.6 до 1.0.

Вопросы к контрольным работам и коллоквиумам

Тема А. Аминокислоты

1. Напишите в виде внутренних солей формулы аминокислот:
 - а) аминоксусной (глицина),
 - б) α -аминопропионовой (аланина).
2. Напишите схемы взаимодействия аланина:
 - а) с водным раствором щелочи,
 - б) с соляной кислотой.
3. Напишите формулы оптических изомеров аланина, цистеина.
4. Напишите формулы серосодержащих аминокислот.
5. Какие аминокислоты содержат гетероциклы в радикале?
Напишите их формулы и названия.
6. Напишите формулы аминокислот:
 - а) с гидрофобными (неполярными) радикалами,
 - б) с незаряженными полярными радикалами,
 - в) с отрицательно заряженными радикалами,
 - г) с положительно заряженными радикалами.
7. Напишите формулы дипептидов:
 - а) аланил-лейцина,
 - б) серил-лизина,
 - в) глицил-триптофана.Отметьте пептидные связи.
8. Напишите формулы и назовите трипептиды:
 - а) ала-вал-глу,
 - б) лей-про-тре,
 - в) тир-гли-гли.
9. Рассмотрите особенности пептидной связи и следствия, вытекающие из них.

Тема Б. Физико-химические свойства аминокислот, пептидов и белков

1. Что обозначает величина рН, для чего она введена? Объясните, почему шкала рН от 1 до 14?
2. Что такое рК, каков физический смысл этой величины?
3. Рассмотрите кривую титрования аминокислоты на примере аланина. Как и для чего строят кривые титрования?
4. Что называют изоэлектрической точкой аминокислоты? Как ее находят с помощью кривой титрования?
5. В какой области значений рН и почему находится изоэлектрическая точка:
 - а) кислой,
 - б) нейтральной,
 - в) основной аминокислоты?Приведите примеры вышеназванных аминокислот.
6. Напишите формулу пептида: гли-асп-про-тре. Определите его поведение в электрическом поле:
 - а) в нейтральной,
 - б) в слабокислой,
 - в) в слабощелочной среде.
7. Напишите формулу пептида: ала-асн-цис-гис. В какой среде находится его изоэлектрическая точка? Ответ обоснуйте.
8. Напишите формулу пептида: глу-цис-асн-арг. Укажите его суммарный заряд в слабокислой среде.
9. Чем объясняется устойчивость белковых растворов? Почему белковые растворы неустойчивы вблизи изоэлектрической точки?
10. Что такое "денатурация белка"? Какие денатурирующие факторы вы знаете? Приведите примеры обратимой и необратимой денатурации.

Тема В. Структура белков

1. Какие продукты получаются при действии трипсина на пептид: лиз-асп-гли-ала-глу-тре?
2. Какие продукты получаются при действии трипсина на пептид: ала-лиз-глу-фен-гли-мет-тир-три?

3. Определите N-концевую аминокислоту в пептиде гли-иле-сер с помощью динитрофторбензола.

4. Определите N-концевую аминокислоту в пептиде ала-цис-тир с помощью дансила.

5. Определите N-концевую аминокислоту в пептиде вал-гли-лиз по методу Эдмана.

6. Определите C-концевую аминокислоту в пептиде лей-ала-гли с помощью гидразина.

7. Каковы этапы установления первичной структуры белковой молекулы?

8. α -спираль и ее параметры (шаг спирали, число аминокислот в витке, высота аминокислотного остатка). Какие взаимодействия стабилизируют α -спираль?

9. Каковы причины, нарушающие регулярность вторичной структуры белков? Перечислите аминокислоты, дестабилизирующие α -спираль.

10. Укажите типы связей, стабилизирующих третичную структуру белков. Приведите схему взаимодействия между двумя заряженными аминокислотами.

11. Приведите примеры аминокислот, участвующих в образовании водородных связей в белках. Изобразите схематично 3 варианта водородных связей между радикалами этих аминокислот.

12. Напишите формулы следующих фрагментов белка, принимающих участие в формировании его третичной структуры:

...тир-цис-глу-иле-сер...

...асп-цис-лиз-ала-асн...

Изобразите схемы всех возможных взаимодействий между радикалами аминокислот.

13. Напишите формулы следующих фрагментов белка, принимающих участие в формировании его третичной структуры:

...тре-лей-цис-гln-арг...

...гис-вал-цис-лиз-глу...

Изобразите схемы всех возможных взаимодействий.

14. В связывании субъединиц четвертичной структуры белка принимают участие радикалы следующих аминокислот: ала, гис, тре, фен, асп. Выпишите попарно формулы аминокислот, между ра-

14. Третичная структура ДНК и РНК.

Тема Д. Ферменты

1. Химическая природа ферментов. Простые и сложные ферменты. Понятие о кофакторе.

2. Формулы ФМН, ФАД, участие этих коферментов в обменных процессах.

3. Формулы и функции НАД⁺, НАДФ⁺.

4. Формула К_oА, характеристика его составных частей.

5. Тиаминпиродифосфат, строение и функции.

6. Убихинон, строение и функции.

7. Формула УДФ-глюкозы, участие этого кофермента в обменных процессах.

8. Дайте систематическое название ферментам, катализирующим следующие реакции, определите класс каждого фермента:

а) асп + ПВК \Leftrightarrow ала + ЩУК,

б) УДФ-глюкоза \Leftrightarrow УДФ-галактоза,

в) АТФ + ПВК + СО₂ \Rightarrow АДФ + Ф + ЩУК,

г) лактат + НАД⁺ \Leftrightarrow пируват + НАДНН⁺,

д) малат \Leftrightarrow фумарат + Н₂О.

9. Напишите следующие реакции, дайте систематические названия ферментам, определите класс каждого фермента:

а) асп + α-кетоглутарат \Leftrightarrow глу + ЩУК,

б) глюкоза + АТФ \Leftrightarrow глюкозо-6-фосфат + АДФ,

в) сукцинат + ФАД \Leftrightarrow фумарат + ФАД · Н₂,

г) ала + СО₂ + АТФ \Rightarrow асп + АДФ + Ф,

д) глутамин + Н₂О \Rightarrow глутамат + NH₃,

е) этиловый спирт + НАД⁺ \Leftrightarrow ацетальдегид + НАДНН⁺.

10. Приведите уравнения двух реакций с участием первичных дегидрогеназ. Назовите ферменты, катализирующие эти реакции.

11. Приведите два примера реакций, катализируемых гидролазами.

12. Напишите уравнение реакции, указав фермент:

α-кетоглутарат \Rightarrow глутамат.

Тема Е. Распад углеводов

1. Напишите уравнение реакции превращения ПВК в молочную кислоту. Укажите фермент, катализирующий это превращение.

2. Напишите уравнения реакций, отличающих гликогенолиз от анаэробного гликолиза. Объясните, в чем причина отличия энергетических эффектов этих процессов.

3. Составьте суммарное уравнение анаэробного гликолиза.

4. Напишите уравнения реакций заключительного этапа спиртового брожения, укажите ферменты, принимающие участие в этих реакциях.

5. Составьте суммарное уравнение спиртового брожения.

6. Напишите уравнение реакции, отличающей анаэробный гликолиз от спиртового брожения, указав фермент.

7. Составьте схему окислительного декарбоксилирования ПВК, укажите ферменты и коферменты, принимающие участие в этом процессе.

8. В чем отличие аэробного гликолиза от анаэробного?

9. Цикл ди- и трикарбоновых кислот:

а) напишите уравнение реакции конденсации ацетил-КоА и ЩУК, назовите продукт реакции;

б) напишите уравнения реакций с участием трикарбоновых кислот, назовите ферменты, участвующие в них;

в) напишите уравнения реакций превращения янтарной кислоты в ЩУК, указав соответствующие ферменты;

г) напишите уравнения реакций превращения изолимонной кислоты в сукцинил-КоА. Назовите ферменты, катализирующие это превращение;

д) какая стадия цикла Кребса сопряжена с синтезом ГТФ? Напишите схему этого процесса;

е) напишите уравнения реакций превращения α -кетоглутарата в янтарную кислоту. Назовите ферменты, катализирующие это превращение.

10. Перечислите ферменты, принимающие участие в цикле Кребса, относящиеся к классу:

а) оксидоредуктаз,

б) лиаз.

11. Приведите схему дыхательной цепи ферментов. Укажите локализацию точек фосфорилирования.

12. Определите число АТФ, синтезирующихся при:

- распаде молекулы глюкозо-6-фосфата до ПВК,
- распаде молекулы глицеральдегид-3-фосфата до ПВК,
- окислительном декарбоксилировании молекулы ПВК,
- биологическом окислении малата в оксалоацетат,
- превращении изолимонной кислоты в янтарную.

13. Каков энергетический эффект одного оборота цикла ди- и трикарбоновых кислот?

Тема Ж. Липиды

1. Классификация липидов.

2. В состав свиного жира входят триглицериды:

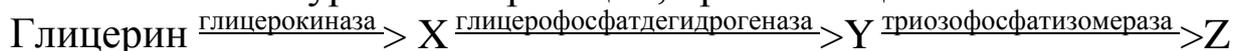
- а) трипальмитин,
- б) триолеин,
- в) олеодипальмитин,
- г) пальмитостеароолеин.

Напишите формулы перечисленных триглицеридов. Какие из них являются простыми и какие смешанными?

3. Гидролиз жиров в желудочно-кишечном тракте позвоночных.

4. Напишите уравнения реакций гидролиза тристеарина, олеодипальмитина.

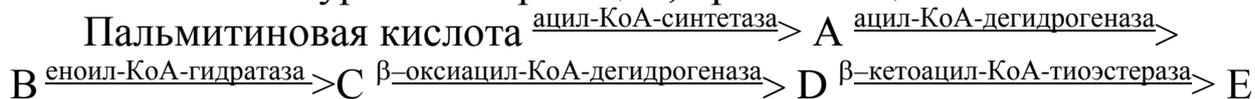
5. Напишите уравнения реакций, протекающих по схеме:



Назовите вещества X, Y, Z.

6. Напишите уравнение реакции активирования стеариновой кислоты.

7. Напишите уравнения реакций, протекающих по схеме:



Назовите вещества A, B, C, D, E.

Каков энергетический эффект одного акта β -окисления?

8. Рассчитайте энергетический эффект распада молекулы глицерина в анаэробных и в аэробных условиях.

9. Энергетический выход полного окисления молекулы пальмитиновой кислоты, трипальмитина.

10. Энергетический эффект полного окисления молекулы стеариновой кислоты, тристеарина.

11. Посредством, каких химических реакций осуществляется синтез высших жирных кислот из глюкозы? Покажите в виде схемы.

12. Напишите уравнения реакций, посредством которых происходит биосинтез жиров из глицерофосфата и высших жирных кислот. Каково биологическое значение этих процессов?

13. Что такое "йодное число", "кислотное число", "эфирное число", "число омыления"?

14. Рассчитайте кислотное число масла, если навеска его составляет 0,2521 г, а на титрование было затрачено 1,2 мл 0,1 н. раствора гидроксида калия (1 мл КОН содержит 5,6 мг щелочи)?

Вопросы к коллоквиуму № 1.

Обмен нуклеиновых кислот и белков

А. Обмен нуклеиновых кислот.

1. Распад нуклеиновых кислот в живых организмах. Классификация нуклеаз.
2. Распад нуклеотидов.
3. Распад пуриновых и пиримидиновых оснований.
4. Репликация ДНК: значение, механизм.
5. Транскрипция (синтез РНК).
6. Обратная транскрипция.

Б. Обмен белков.

7. Распад белков в живых организмах. Гидролиз белков в желудочно-кишечном тракте позвоночных под действием протеолитических ферментов.
8. Распад аминокислот по аминогруппе: окислительное дезаминирование, переаминирование. Распад аминокислот по карбоксильной группе и радикалу.
9. Конечные продукты распада аминокислот. Орнитиновый цикл.
10. Биосинтез белка, его основные этапы.
11. Процесс активирования аминокислот: значение, механизм.
12. Генетический код и его особенности.
13. Трансляция (сборка полипептидной цепи), механизм.

Литература

1. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии: Учеб. для хим. и биол. ф-в пед. ун-тов и ин-тов. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1993. – С. 219 - 293.
2. Основы биохимии: Учебник для студ. биол. спец. ун-тов / Под ред. А.А. Анисимова. – М.: Высш. школа, 1986. – С. 216 - 237, 257 - 273, 290 - 307.
3. Ленинджер А. Основы биохимии. – М.: Мир, 1985. – Т. 2. С. 663 – 676; Т. 3. С. 897 - 913, 926 - 949.

Вопросы к коллоквиуму № 2. Обмен углеводов

1. Пути распада углеводов в живых организмах.
2. Распад поли- и олигосахаридов. Гидролиз и фосфолиз.
3. Распад полисахаридов в желудочно-кишечном тракте человека.
4. Превращения моносахаридов. Пути синтеза глюкозо-6-фосфата и значение этого соединения.
5. Анаэробный гликолиз: значение, стадии, энергетический эффект. Субстратное фосфорилирование.
6. Гликогенолиз. Реакции, отличающие гликогенолиз от анаэробного гликолиза. Энергетический эффект гликогенолиза.
7. Спиртовое брожение: значение, реакции заключительного этапа спиртового брожения, энергетический эффект.
8. Дыхание: значение, основные этапы. Окислительное декарбоксилирование пирувата.
9. Цикл Кребса и его значение.
10. Дыхательная цепь ферментов.
11. Энергетический эффект дыхания.
12. Энергообеспечение живых организмов. Биоэнергетика.
13. Окислительное фосфорилирование. Гипотеза Митчелла.
14. Фотосинтез.
15. Синтез олиго- и полисахаридов.

Литература

1. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии: Учеб. для хим. и биол. ф-в пед. ун-тов и ин-тов. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1993. – С. 320 - 363.
2. Основы биохимии: Учебник для студ. биол. спец. ун-тов / Под ред. А.А. Анисимова. – М.: Высш. школа, 1986. – С. 338 - 385.
3. Ленинджер А. Основы биохимии. – М.: Мир, 1985. – Т. 2. С. 439 – 461, 477 – 495, 508 – 543, 601 – 605.

Контрольные вопросы по молекулярной биологии

1. Предмет молекулярной биологии.
2. Современные проблемы молекулярной биологии.
3. История развития молекулярной биологии.
4. Словарь терминов молекулярной биологии.
5. Методы молекулярной биологии.
6. Установление первичной структуры ДНК, значение.
7. Характеристика и значение рестриктаз. Механизмы действия, номенклатура.
8. Метод концевого мечения.
9. Метод электрофореза в полиакриламидном геле.
10. Прямые методы определения первичной структуры ДНК.
 - 10.1. Метод Максэма-Гилберта.
 - 10.2. Метод Сенгера-Коулсона.
11. Косвенные методы изучения структуры генома про- и эукариот.
 - 11.1. Изучение кинетики реассоциации ДНК.
 - А) Высокоповторяющиеся последовательности ДНК (ВПП) и их значение.
 - Б) Умеренно повторяющиеся последовательности ДНК (УПП) и их значение.
 - В) Уникальные последовательности ДНК, их значение.
 - Г) Особенности генома про- и эукариот.
 - 11.2. Методы гибридизации нуклеиновых кислот. Мозаичная структура генов эукариот, роль интронов и экзонов.
12. Программа «Геном человека». Особенности генома человека.
13. Основные этапы генетической инженерии, ее значение.
14. Способы получения генов про- и эукариот.
15. Понятие о процессинге продуктов транскрипции генов.
16. Процессинг предшественников р-РНК.
17. Процессинг предшественников т-РНК. Эндонуклеаза Р. Каталитическая роль РНК.

18. Процессинг предшественников и-РНК эукариот. Роль малых ядерных РНК.

Литература

1. Коничев А.С. Молекулярная биология: Учеб. для студ. пед. вузов / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Изд. центр "Академия", 2003. – 400 с.

Оглавление

Раздел I. Белки.....	3
<i>Работа 1. Распределительная хроматография аминокислот на бумаге</i>	<i>3</i>
<i>Работа 2. Определение изоэлектрической точки белков.....</i>	<i>5</i>
<i>Работа 3. Качественные реакции на белки.....</i>	<i>6</i>
Раздел II. Ферменты.....	17
<i>Работа 4. Качественные реакции на присутствие ферментов.....</i>	<i>17</i>
<i>Работа 5. Свойства ферментов.....</i>	<i>20</i>
Раздел III. Нуклеиновые кислоты.....	25
<i>Работа 6. Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей и качественное определение продуктов их гидролиза (белка, рибозы, пуриновых оснований и фосфорной кислоты)</i>	<i>25</i>
Раздел IV. Углеводы.....	27
<i>Работа 7. Качественные реакции на углеводы.....</i>	<i>27</i>
Раздел V. Липиды	31
<i>Работа 8. Характерные реакции на липиды</i>	<i>31</i>
<i>Работа 9. Определение кислотного числа и числа омыления жира</i>	<i>34</i>
Раздел VI. Электрофорез	36
<i>Работа 10. Фракционирование белков методом электрофореза в полиакриламидном геле</i>	<i>39</i>

Вопросы к контрольным работам и коллоквиумам.....	44
<i>Тема А. Аминокислоты</i>	<i>44</i>
<i>Тема Б. Физико-химические свойства аминокислот, пептидов и белков.....</i>	<i>45</i>
<i>Тема В. Структура белков</i>	<i>45</i>
<i>Тема Г. Нуклеиновые кислоты</i>	<i>47</i>
<i>Тема Д. Ферменты</i>	<i>48</i>
<i>Тема Е. Распад углеводов.....</i>	<i>49</i>
<i>Тема Ж. Липиды.....</i>	<i>50</i>
<i>Вопросы к коллоквиуму № 1. Обмен нуклеиновых кислот и белков</i>	<i>52</i>
<i>Вопросы к коллоквиуму № 2. Обмен углеводов.....</i>	<i>53</i>
Контрольные вопросы по молекулярной биологии.....	54

Учебное издание

**Биохимия
и молекулярная биология**

Методические указания

Составители: **Урванцева** Галина Александровна
Грачева Екатерина Леонидовна

Редактор, корректор А.А. Антонова
Компьютерная верстка И.Н. Ивановой

Подписано в печать 29.07.2005 г. Формат 80×64/16.
Бумага тип. Усл. печ. л. 3,25. Уч.-изд. л. 2,0.
Тираж 100 экз. Заказ № .

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.

Отпечатано на ризографе.

Ярославский государственный университет.
150 000 Ярославль, ул. Советская, 14.

Биохимия и молекулярная биология
