

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Майкопский государственный технологический университет»**

Кафедра морфологии

Дахужева З.Р., Неровных Л.П.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ ПО КУРСУ
«БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ»**
Для студентов специальностей
31.05.02 Педиатрия, 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.03 Стоматология,
33.05.01. Фармация

Майкоп - 2020

ББК 577.1(07)

УДК 28.707.2

Д 21

Печатается по решению научно-технического совета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Майкопский государственный технологический университет»

Составители:

канд. техн. наук

Дахужева З.Р.

канд. техн. наук

Неровных Л.П.

Рецензент:

канд.хим.наук

Голованова Т.Н.

Учебно-методическое пособие к лабораторному практикуму по курсу «Биологическая химия» для студентов специальностей 31.05.02 Педиатрия, 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.03 Стоматология, 33.05.01. Фармация / З.Р. Дахужева, Л.П. Неровных – Майкоп, 2020. - с.76

Лабораторный практикум, состоящий из 10 лабораторных работ. Каждая лабораторная работа включает теоретический материал, описание методик проведения анализов и вопросы для самоконтроля.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Работая в лаборатории, необходимо соблюдать меры предосторожности, придерживаясь следующих правил:

Общие сведения

- Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде.
- Работа в биохимической лаборатории допускается только в специальном халате, так как вероятна возможность загрязнения, порчи одежды при попадании на нее едких реактивов.

Обращение с реактивами

- Все концентрированные кислоты и щелочи должны находиться в вытяжном шкафу.
- Все опыты с ядовитыми и неприятно пахнущими веществами проводить в вытяжном шкафу.
- Наливать или насыпать реактивы следует только над столом.
- Не следует оставлять открытыми банки с реактивами.
- Пролитые или рассыпанные реактивы нужно немедленно удалить со стола, вытерев стол тряпкой и обмыв водой.
- Пролитые концентрированные кислоты следует засыпать песком, затем собрать песок лопаткой. Облитое место необходимо облить раствором соды и вытереть тряпкой.
- При работе с органическими растворителями (спирты, эфиры, ацетон, бензин и др.) нельзя определять вещество по запаху, так как может произойти отравление их парами.
- Наполнение пипеток растворами органических растворителей, кислот, щелочей проводят только при помощи груши.
- Внимательно следить за тем, чтобы реактивы (особенно кислоты и щелочи) не попадали на лицо, руки и одежду.

– Не ходить по лаборатории с концентрированными кислотами, а наливать их только в определенном, отведенном для этого месте.

– Не загрязнять реактивы во время работы (не путать пробки от склянок, содержащих разные реактивы; избыток взятого реактива не выливать обратно в склянку; пользуясь пипеткой, набирать каждый реактив только предназначенной для этого пипеткой, ни в коем случае не путать их).

– В случае попадания на кожу концентрированной кислоты облитое место нужно промыть большим количеством воды, а затем разбавленным раствором соды. При попадании растворов щелочей на кожу пораженное место нужно обмыть сначала разбавленной кислотой, а потом водой.

Обращение с нагревательными приборами

– Перед тем как зажечь спиртовку – убедиться, что поблизости нет горючих жидкостей (спирт, эфир и др.).

– Зажигать спиртовку можно только спичкой.

– В пробирке можно нагревать только небольшое количество раствора, жидкость должна занимать не более $1/3$ объема пробирки.

– Пробирку при нагревании нужно направить в сторону от себя и рядом находящихся людей.

– Нельзя наклоняться над спиртовкой. Вначале пробирку с раствором нужно прогреть всю, а затем нагревать в нужном месте, не вынимая из пламени спиртовки.

– Нельзя нагревать пробирку долго в одном месте, так как жидкость быстро закипит и выплеснется из пробирки.

– Нагревать пробирку нужно ниже уровня жидкости в ней.

– При нагревании жидкости держать пробирку отверстием в сторону от себя и тех, кто находится рядом, не касаться пробиркой горящего фитиля, всегда соблюдать большую осторожность при нагревании, не допускать выплескивания жидкости (время от времени отводить пробирку от пламени, не нагревать ее в вертикальном положении), не приближать лицо к сосуду, в котором нагревается жидкость.

- После нагревания следует сразу затушить спиртовку, накрыв пламя колпачком.
- Работа с водяной баней осуществляется только под тягой.
- При неосторожной работе могут быть ожоги нагретой стеклянной посудой. При ожогах на обожженное место нужно положить ватку, смоченную раствором марганцевокислого калия.

Закончив работу, привести рабочее место в порядок.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа № 1

Тема: «Определение концентрации глюкозы в крови ферментативным методом (с помощью прибора контроля уровня глюкозы в крови ONE TOUCH BASIC PLUS)»

Теоретическая часть

Углеводы – самые распространенные в природе органические соединения. Они являются главной составной частью большинства продуктов растительного происхождения и входят в состав тканей животных. Углеводы в больших количествах накапливаются в растительных тканях, как правило, в виде полисахаридов. Растительные полисахариды являются основным источником моносахаридов, которые подвергаются далее химической или микробиологической переработке с получением широкого спектра производных. Углеводы выполняют в организме важные функции. Среди них:

– *энергетическая*: при окислении 1 г углеводов выделяется 17 кДж энергии (4,1 ккал). В качестве основного энергетического источника используется свободная глюкоза или запасы углеводов в виде гликогена;

- *структурная*: углеводы (рибоза, дезоксирибоза) входят в состав некоторых ферментов и используются для построения нуклеиновых кислот. Отдельные углеводы являются компонентами клеточных мембран. Производные глюкозы (глюкуроновая кислота, глюкозамин и т. д.) входят в состав полисахаридов и сложных белков хрящевой и соединительной тканей;

– *защитная*: углеводные компоненты входят в состав иммуноглобулинов и участвуют в поддержании иммунитета. Гетерополисахариды находятся в веществах, покрывающих поверхность сосудов, бронхов, пищеварительного тракта, и защищают от проникновения бактерий, вирусов, а также от механических повреждений;

– *резервная*: в животных организмах углеводы запасаются в скелетных мышцах, печени и других тканях в виде гликогена. Крахмал является запасующим полисахаридом растений; – *регуляторная*: клетчатка пищи не расщепляется в кишечнике, но активирует перистальтику кишечника, а также ферменты пищеварительного тракта, способствующие усвоению питательных веществ.

Классификация углеводов основана на их структуре: в зависимости от сложности молекулы их можно разделить на **моносахариды** и их производные, **олигосахариды** и **полисахариды**.

Принцип метода: Система контроля уровня глюкозы в крови **ONE TOUCH BASIC PLUS** предназначена для определения уровня глюкозы в цельной крови в домашних и клинических условиях. Система включает в себя прибор **ONE TOUCH BASIC PLUS**, тест-полоски, ланцеты и флакон с контрольным раствором.

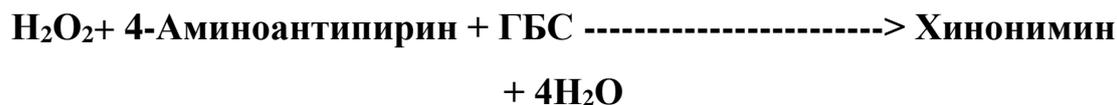
Тест основан на глюкозооксидазной реакции, специфичной для глюкозы. На любые другие сахара тест не реагирует. После нанесения крови на тест-полоску компоненты последней реагируют с кровью в следующей последовательности:

Глюкозооксидаза



Пероксид водорода реагирует с хромогеном (4-аминоантипирин) с образованием красителя хинонимина:

Пероксидаза



Интенсивность окраски пятна при длине волны 505 нм прямо пропорциональна концентрации глюкозы в нем.

Линейность метода: до 33,3 ммоль/л.

Норма:

Цельная кровь – 3,3-5,5 ммоль/л (18-25°C);

Сыворотка – 3,8-6,1 ммоль/л.

Оборудование и реагенты:

- 1) прибор **ONE TOUCH BASIC PLUS**;
- 2) тест-полоски;
- 3) ланцеты;
- 4) Стандарт (контрольный раствор 4,8-6,8 ммоль/л).

Ход работы

1. Включить прибор. На экране автоматически появится результат предыдущего теста.
2. Установить код нажатием кнопки «С». Номер кода на приборе должен совпадать с номером кода на флаконе с тест-полосками.
3. Ввести тест-полоску в прибор до упора.
4. Проколоть палец с помощью нового стерильного ланцета.
5. Аккуратно нанести каплю крови на зону теста.
6. Получить точный результат через 45 секунд (дата, время, уровень глюкозы в ммоль/л).

Хотя система **ONE TOUCH BASIC PLUS** требует малого количества крови, очень важно, чтобы капля крови была достаточно большой и закрывала полностью зону теста.

Данный прибор не предназначен для диагностики сахарного диабета и для измерения уровня глюкозы в крови у новорожденных детей в возрасте до 4 недель.

Если результаты анализа ниже 3,3 ммоль/л, на экране появится надпись «опасно врач» – следует немедленно принять меры вместе с лечащим врачом при гипогликемии.

Если результат выше 33,3 ммоль/л, на экране прибора появится надпись «HI опасно врач», что указывает на недопустимо высокую концентрацию глюкозы в крови (острая гипергликемия) и требуется немедленное обращение к врачу.

Для проверки правильности показаний прибора (минимум 1 раз в неделю) можно использовать проверочную тест-полоску или контрольный раствор:

Контроль с помощью проверочной тест-полоски	Контроль с помощью контрольного раствора
1. Включить прибор	1. Включить прибор
2. Ввести проверочную полоску стороной 1 вверх	2. Убедитесь, что номер на экране совпадает с номером на флаконе с тест-полосками. Вставить тест-полоску.
3. При появлении записи на экране «Нанеси пробу» извлечь проверочную полоску	3. Хорошо встряхнуть флакон с контрольным раствором.

4. Когда на экране прибора появится надпись «введи стор.2», ввести проверочную полоску стороной 2.	4. Нанести каплю контрольного раствора на зону теста
5. Прибор покажет результат.	5. Прибор покажет результат через 45 секунд.

Клинико-диагностическое значение: Увеличенные уровни глюкозы в крови (гипергликемия) характерны для сахарного диабета, гиперфункции щитовидной железы, гипофиза и надпочечников.

Концентрация глюкозы в крови ниже нормы (гипогликемия) наблюдается при инсулин-секретирующих опухолях, микседеме, гипофункции гипофиза, гипофункции надпочечников, и в случае введения пациенту сверхбольшой дозы инсулина.

Выводы: записать результаты эксперимента.

Вопросы для самоконтроля:

1. Углеводы. Биологическая роль. Переваривание и всасывание углеводов. Судьба всосавшихся моносахаридов. Нарушения углеводного обмена.
2. Углеводы. Классификация. Биологическая роль. Общая характеристика моносахаридов. Основные реакции моносахаридов.
3. Углеводы. Синтез гликогена. Глюконеогенез. Сходство и отличие реакций глюконеогенеза и гликолиза.
4. Пентозофосфатный путь окисления углеводов (прямое окисление). Биологическая роль пентозофосфатного цикла. Последовательность реакций. Ферменты. Связь с гликолизом.
5. Углеводы. Биологическая роль. Переваривание и всасывание углеводов. Судьба всосавшихся моносахаридов. Нарушения углеводного обмена.

Лабораторная работа № 2

Тема: «Определение содержания суммарных липидов в сыворотке крови по реакции с сульфосфосфованилиновым реактивом»

Теоретическая часть

Липиды – разнородная по химическому строению группа органических веществ биологического происхождения, практически нерастворимых в воде и легко растворимых в органических неполярных (хлороформ, эфир, бензол, дихлорэтан и др.) и полярных (этанол, метанол, ацетон и др.) жидкостях. Разнообразие химического строения липидов затрудняет их классификацию. Эту группу веществ можно разделить на *липидные мономеры* (жирные кислоты, высшие алифатические и аминспирты и др.), *простые липиды* (ацилглицерины, воска, диольные липиды), *сложные липиды* (фосфолипиды и гликолипиды) и *стероиды* (наиболее распространенный из них – холестерин и его эфиры). Биологические функции липидов в живых организмах многообразны. Они содержатся в жидких средах и входят в состав биологических мембран клеток организма. Ввиду плохой растворимости в воде липиды образуют соединения с гидрофильными молекулами – белками, углеводами. Образование липид-белковых комплексов (липопротеидов) придает липидам растворимость в воде и позволяет транспортироваться с кровью и лимфой в организме. Своеобразие растворимости используется при исследовании липидов, поскольку позволяет отделить их от других веществ, которые находятся в биологическом материале. Поэтому подбор растворителей в ходе извлечения липидов из образцов имеет большое значение при их анализе.

Для обнаружения и количественного определения отдельных представителей липидов, экстрагированных из биологического материала, существуют различные физико-химические методы и реакции на функциональные группы. Анализ липидов проводят путем постановки

специфических реакций на составные части в целой молекуле или после ее гидролиза.

Для изучения состояния липидного обмена в организме используется определение содержания липидных компонентов в биологических жидкостях. Разные липиды входят в состав сложноорганизованных комплексов – *липопротеидов* – или адсорбируются белками, в основном альбуминами, плазмы или сыворотки крови. В крови содержатся хиломикроны, образующиеся в слизистой тонкого кишечника и поступающие в нее с лимфой, пре- β -липопротеиды (липопротеиды очень низкой плотности), β -липопротеиды (липопротеиды низкой плотности) и α -липопротеиды (липопротеиды высокой плотности). Апопротеиды трех последних классов липопротеидов синтезируются в печени, поэтому по содержанию липопротеидов в крови судят не только о липидном обмене, но и функции печени.

При исследовании обмена липидов в клинике определяют содержание липопротеидов, общих липидов, включающих сумму всех липидных веществ сыворотки или плазмы крови, а также отдельные их фракции – триацилглицерины, неэтерифицированные жирные кислоты, свободный и этерифицированный холестерин, фосфолипиды.

Реактивы. Серная кислота, конц.; фосфованилиновый реактив*.

Оборудование. Штатив с пробирками; пипетки для отмеривания сильных кислот; пипетки вместимостью 0,1; 1 и 10 мл; стеклянные палочки; водяная баня; ФЭК.

Материал. Сыворотка крови.

Метод основан на способности продуктов распада ненасыщенных липидов образовывать с фосфованилиновым реактивом соединение,

интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию общих липидов в сыворотке крови.

Ход работы

В опытную пробирку (*сухую!*) вносят 0,1 мл сыворотки крови и 2,9 мл концентрированной серной кислоты (*осторожно! Специальными пипетками!*), а в контрольную – 0,1 мл дистиллированной воды и 2,9 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое обеих пробирок тщательно перемешивают стеклянной палочкой и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин (*осторожно!*). Затем обе пробирки быстро охлаждают под струей холодной воды до комнатной температуры. Из опытной и контрольной пробирок отбирают по 0,2 мл охлажденного содержимого в другие пробирки, в которые предварительно наливают фосфованилинового реактива по 3 мл в обе пробирки.

После тщательного перемешивания стеклянной палочкой пробы ставят на 45 мин в темное место при комнатной температуре (для развития окрашивания).

Фотометрируют опытную пробу против контрольной на ФЭКе при 500-560 нм (зеленый светофильтр), в кювете с толщиной слоя 0,5 см.

Расчет. Содержание общих липидов в сыворотке крови x (г/л) рассчитывают по формуле

$$x = \frac{m10000 \cdot 3}{0,2 \cdot 1000},$$

где m – масса общих липидов в пробе, найденная по калибровочному графику (рис.6), мг;

10000 – коэффициент пересчета на 1 л сыворотки крови;

1000 – коэффициент пересчета миллиграммов в граммы;

3 – общий объем исходной смеси (0,1 мл сыворотки крови + 2,9 мл концентрированной серной кислоты), мл;

0,2 – объем смеси, взятой для проведения цветной реакции, мл.

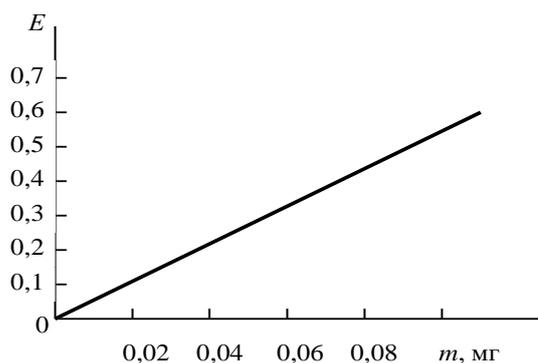


Рис. 6. Калибровочный график для определения содержания общих липидов сыворотки крови

Оформление работы. По найденному значению экстинкции рассчитать содержание общих липидов в крови, указав на возможные изменения в их содержании и причину ЭТИХ ИЗМЕНЕНИЙ.

Практическое значение работы. Нормальное содержание общих липидов в сыворотке крови (нормолипемия) составляет 4,0-8,0 г/л. При физиологических условиях увеличение содержания липидов в крови (гиперлипемия) наблюдается через 1-4 ч после принятия богатой жирами пищи. Натощак уровень общих липидов снижается (гиполипемия). Гиперлипемия проявляется при многих патологических состояниях: у больных сахарным диабетом отмечается резко выраженная гиперлипемия (до 20,0 г/л), при заболеваниях почек (липоидном нефрозе), при поражении печени (циррозе печени и остром гепатите), при ожирении, при врожденной гиперлипемии, атеросклерозе и у лиц, злоупотребляющих алкоголем.

В выводах отметить практическое использование метода определения общих липидов в клинической лаборатории для выявления нарушений липидного обмена.

Вопросы для самоконтроля:

1. Важнейшие липиды тканей человека. Химическое строение. Физико-химические свойства. Классификация. Характеристика липидного состава, диета и потребности в липидах детей разного возраста.
2. Липопротеиды. Химическое строение, представители, роль в обмене веществ. Состав и строение транспортных липопротеидов крови. Гиперлипидемии.
3. Липопротеины плазмы крови. Классификация. Строение липопротеиновых частиц. Холестериновый коэффициент атерогенности.
4. Какой метод в клинической биохимии используют для выявления нарушений липидного обмена?

Лабораторная работа № 3

Тема: «Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы»

Теоретическая часть

Белки – это высокомолекулярные соединения, состоящие из аминокислотных остатков, связанные пептидными связи между карбоксильной группой одной из аминокислот и α -аминогруппой другой. Все белки состоят из аминокислот, в состав белка входят только 20 аминокислот, они называются протеиногенными. Для этих аминокислот характерны свои специфические свойства и они могут образовываться, если с углеродным скелетом карбоновых кислот соединяются функциональные группы.

Физико – химические свойства белков

Для белков характерны следующие свойства: высокая вязкость растворов, способность к сильному набуханию, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, низкое осмотическое давление и высокое онкотическое. Наиболее важные: молекулярная масса, растворимость, денатурация, гидратация, ионизация, размер и форма молекул.

Классификация белков

1. По химическому строению:

- а) простые белки, которые при гидролизе дают только аминокислоты (альбумин, глобулин, гистоны);
- б) сложные белки, которые при гидролизе дают аминокислоты и небелковые группы. В зависимости от небелковых групп: 1. Гликопротеины (углеводы), 2. Липопротеины (жиры), 3. Нуклеопротеины (нуклеиновые кислоты), 4. Фосфопротеины (фосфор), 5. Хроморотеины, 6. Металлопротеины (металлы).

2. По конформации:

а) Глобулярные белки. Выполняют динамическую функцию (альбумин, глобулин, пепсин и т.д.)

б) Фибриллярные белки. Выполняют опорную функцию (коллаген, эластин, кератин, фибрин);

3. По биологическим функциям:

а) Белки регуляторы активности генома. Протамины и гистоны – щелочные белки, т.к. протамины содержат до 80%, а гистоны содержат до 20-30% диаминокислоты (аргинина и лизина). Протамины придают ДНК стабильную, компактную форму и обеспечивают ее транспорт. Гистоны - нейтрализуют отрицательный заряд ДНК, угнетение или стимуляция синтеза ДНК, торможение синтеза РНК, освобождение РНК с ДНК.

б) Транспортные белки (альбумин сыворотки крови, альбумин молока (лактальбумин), мышц (миоальбумин)). В сыворотке крови 40-50г/л. Альбумин сыворотки крови выполняет функции;

1. Регуляция осмотического давления крови;
2. Транспортировка по крови жирных кислот, гормонов, холестерина, минеральных солей, витаминов;
3. На своей поверхности имеют тиоловые, имидозольные, гуанидиновые группы, которые обезвреживают эндогенные и экзогенные яды;
4. Являются условным депо белка в организме.

Помимо альбумина транспортными белками являются следующие глобулины: *церрулоплазмин* – перенос ионов меди из печени в клеточные органеллы; *трансферин* – перенос ионов трехвалентного железа; *гемоглобин* – кислород, углекислый газ;

Принцип метода: Белки являются амфотерными электролитами. Направление движения белков в электрическом поле зависит от рН среды. Коллоидные частицы белка перемещаются в электрическом поле постоянного тока к аноду – в щелочной среде, к катоду – в кислой среде.

Разделение белков сыворотки обычно проводят в буферном растворе при рН 8,6 – 8,9. В качестве носителя используют пленки из ацетата целлюлозы. В этих условиях заряженные белки сыворотки крови перемещаются по смоченным пленкам из ацетата целлюлозы в направлении анода со скоростью, зависящей от величины заряда и относительной молекулярной массы белка. Этот след представляет собой дорожку, на которой после окрашивания ясно видны места концентрации белков различных фракций. Наиболее быстро движутся альбумины, затем α_1 -, α_2 -, β -глобулины, и, наконец, γ -глобулины. По этим следам (дорожкам) можно определить содержание белка в различных белковых фракциях пробы. Методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы можно получить 5 и более белковых фракций.

Нормальные величины белковых фракций зависят от вида применяемого красителя:

Белковые фракции	Окраска электрофореграммы	
	Пунцовый С	Амидо черный
1. Альбумины	52% (46,9-61,4)	60,2% (50,3-70,1)
2. α_1 -Глобулины	3,3% (2,2-4,2)	4,4% (2,7-6,1)
3. α_2 -Глобулины	9,4% (7,9-10,9)	12,3% (9,4-15,2)
4. β -глобулины	14,3% (10,2-18,3)	13,0% (7,7-18,0)
5. γ -Глобулины	21,4% (17,6-25,4)	20,1% (15,2-25,0)

Оборудование и реагенты:

- 1) Аппарат для электрофореза;
- 2) Источник постоянного тока;
- 3) Денситометр;
- 4) Веронал-мединаловый буфер, рН 8,6;

- 5) Раствор амидо черного для окрашивания электрофореграммы (амидо черный 250 мг в 100 мл 7% уксусной кислоты);
- 6) Раствор для отмывания (5-7% уксусная кислота)
- 7) Раствор для просветления пластинок из ацетата целлюлозы (смесь этанола, уксусной кислоты и глицерина);
- 8) Сыворотка крови;
- 9) Дистиллированная вода.

Просветления пластинок из ацетата целлюлозы можно достигнуть также, погрузив пластинки на 2-3 минуты в глицерин или вазелиновое масло.

Ход работы

1. Сухие пластинки из ацетата целлюлозы помечают карандашом, а затем осторожно кладут на поверхность буфера для электрофореза так, чтобы они поглощали жидкость только снизу с помощью капиллярных сил. При быстром погружении пластинки в буфер в порах ацетата целлюлозы может остаться воздух.
2. Извлекают пластинки из буферного раствора и аккуратно зажимают их между листами плотной фильтровальной бумаги, не допуская высыхания пластинок. О высыхании свидетельствует появление белых пятен на поверхности пластинки. В этом случае пропитывание буфером следует повторить (см. пункт 1).
3. Влажную пластинку закладывают в рамку и помещают в электрофоретическую камеру.
4. С помощью аппликатора на поверхность пластинки с катодного краю наносят образец – 0,2-0,4 мл сыворотки крови.
5. Сразу после нанесения образцов включают электрический ток.

Для кратковременного электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы лучшие результаты получаются при стабильном напряжении. Как правило, для пластинок толщиной около 120 мкм сила тока не должна

превышать 0,5 мА на 1 см ширины пластинки. Для более толстых пластинок (250-300 мкм) сила тока может достигать 1мА на 1 см ширины пластинки. Применяв высокий градиент напряжения (30-40 В на 1 см) можно получить четкое разделение фракций белка за короткий промежуток времени (20-30 минут).

6. После отключения тока пластинки осторожно переносят в красящий раствор на 5 минут.
7. Затем пластинки отмывают до отбеливания фона в 5-7% растворе уксусной кислоты дважды по 3 минуты. Промывают 3 раза дистиллированной водой. Просушивают между листами фильтровальной бумаги.
8. Проводят просветление пластинок. Для этого помещают пластинки на 30 секунд в 90° этиловый спирт. Затем помещают их в осветляющий раствор на 30 секунд. Наклеивают на стекло и помещают в сушижаровой шкаф на 5 минут при температуре 100°C.
9. Высушенную пластинку сканируют на денситометре при длине волны 600 нм, характерной для красителя амидо черного.

Расчет

Данные о содержании белка в белковых фракциях сыворотки крови могут быть представлены как в форме процентного распределения белка по фракциям, так и в форме содержания белка в отдельных фракциях в г/л (для этого предварительно в крови определяют содержание общего белка биуретовым методом). Результаты измерения заносят в таблицу:

Белковые фракции	Нормальные величины, %	Полученные величины, %	Полученные величины, г/л
1. Альбумины	60,2% (50,3-70,1)		

2. α 1- Глобулины	4,4% (2,7-6,1)		
3. α 2- Глобулины	12,3% (9,4- 15,2)		
4. β - глобулины	13,0% (7,7- 18,0)		
5. γ - Глобулины	20,1% (15,2- 25,0)		
Концентрация общего белка в сыворотке крови – _____ г/л			

Клинико-диагностическое значение: Электрофорез белков сыворотки крови имеет диагностическое значение в наблюдении за динамикой патологического процесса и оценке эффективности медикаментозного лечения.

Увеличение содержания α -глобулинов в сыворотке характерно для острых воспалительных заболеваний, так как в данную фракцию входят белки острой фазы.

Во фракцию α -глобулинов входит также и большинство гликопротеинов крови. Поэтому ее содержание увеличивается при различных хронических заболеваниях, раке, травмах, ревматизме и инфаркте миокарда.

Повышение β -глобулинов в сыворотке чаще наблюдается при гиперлиппротеинемиях различного происхождения, так как в эту фракцию входят липопротеины.

Фракция γ -Глобулинов состоит из иммуноглобулинов и увеличивается при заболеваниях, связанных с интенсивными иммунными процессами, а также при миеломных болезнях.

Гипогаммаглобулинемия может носить врожденный характер или быть обусловленной истощением иммунной системы (рак, хронические воспалительные процессы, аллергические заболевания, СПИД).

Выводы: записать результаты эксперимента.

Вопросы для самоконтроля:

1. Классификация белков. Важнейшие представители протеинов и протеидов. Биологические функции белков. Изменение белкового состава при онтогенезе и болезнях.
2. Белки плазмы крови: методы, используемые для разделения белков плазмы на фракции; нормативное содержание в плазме альбуминов и глобулинов; общий белок плазмы крови в норме.
3. Характеристика изменений количества общего белка плазмы крови и процентного содержания отдельных белковых фракций.
4. С чем связано увеличение содержания α -глобулинов в сыворотке?

Лабораторная работа № 4

Тема: «Качественные реакции на витамины»

Цель: ознакомиться с классификацией и биологическим значением витаминов, научиться понимать состояния организма человека при разной обеспеченности его витаминами, в процессе эксперимента обнаружить присутствие витаминов в продуктах питания.

Теоретическая часть

Витамины — низкомолекулярные, разнообразные по химическому строению органические вещества, принимающие участие во многих реакциях клеточного метаболизма.

В отличие от белков, жиров и углеводов витамины 1- не являются структурными компонентами клетки; 2 - не используются в качестве источника энергии.

Большинство витаминов не синтезируются в организме человека и животных, но некоторые синтезируются микрофлорой кишечника и тканями в минимальных количествах, поэтому основным источником витаминов является пища.

Витамины — вещества нестойкие, они легко разрушаются высокой температурой, действием сильных гидроксидов, кислородом воздуха, ионизирующими излучениями и другими факторами.

Известно 3 состояния связанные с витаминами:

- 1) **авитаминоз** - полное отсутствие витаминов в кормах;
- 2) **гиповитаминоз** - недостаток витаминов в кормах;
- 3) **гипервитаминоз** – избыточное поступление витаминов с кормом.

В настоящее время авитаминозы практически отсутствуют, но часто встречаются гиповитаминозы. Причины их вызывающие делятся на 2 группы: 1- экзогенные - отсутствие или недостаток витаминов в рационе; 2 – эндогенные – а) нарушение процессов всасывания витаминов в желудочно-кишечном тракте при его заболевании, при заболевании печени и желчного

пузыря; б) наличие в кормах антибиотиков и сульфаниламидных препаратов, которые подавляют кишечную микрофлору, вырабатывающую витамины; в) некоторые физиологические состояния организма (беременность, острые и хронические заболевания, тяжелая работа, рост и развитие молодняка, высокая продуктивность), при котором необходимо повышенное потребление витаминов.

Определенное значение в развитии авитаминозов и гиповитаминозов имеют антагонисты витаминов (**антивитамины**), близкие по структуре к соответствующим витаминам. Антивитамины являются их «ложными заменителями» и включаясь в естественную цепь реакций обмена, нарушают его нормальное течение. Очевидно, в основе действия антивитаминов лежит «конкурентное» вытеснение антивитаминном соответствующего витамина из ферментного комплекса. В результате образуется недействительный фермент, метаболизм нарушается и возникает тяжелое заболевание.

В качестве примеров антивитаминов могут быть такие вещества: дикумарол — витамин К, сульфамидные препараты— парааминобензойная кислота, аминоптерин — фолиевая кислота, дезоксипиридоксин — витамин В₆, пиритиамин — тиамин (В₁), пиридин-3-сульфоукислота — амид никотиновой кислоты (РР), а также не исключается антивитаминное действие солей тяжелых металлов в желудочно-кишечном тракте.

Классификация и номенклатура витаминов

По химическому строению витамины делят на витамины алифатического ряда, ациклического ряда, ароматического ряда, гетероциклического ряда.

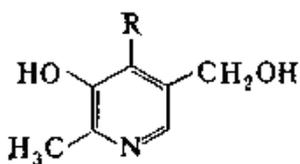
По физико-химическим свойствам витамины разделяют на две группы:

витамины, растворимые в жирах (*липовитамины*), и витамины, растворимые в воде (*гидровитамины*).

Витамины принято обозначать большими буквами латинского алфавита (А, D, Е, В₁, В₂ и т. д.), а также по болезни (которую излечивает данный витамин) с прибавкой «анти» (антиксерофтальмический, антирахитный, антинеуритный и т. д.) или по химическому (условному) названию (ретинол, кальциферол, биотин, аскорбиновая кислота и т. д.). К группе жирорастворимых витаминов относятся витамины А, D, Е, К и F, а водорастворимым — В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₁₂, С, Р, Н. К группе витаминоподобных веществ относятся холин, инозит, витамины В₁₃, В₁₅, убихинон и др.

Опыт 1. Обнаружение витамина В₆ (пиридоксин) в сером и белом хлебе.

Витамин В₆ – собирательное название производных 3-гидрокси-2-метилпиридинов. На самом деле представляет собой группу **витаминов**: пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин, которые тесно связаны между собой и действуют совместно. В форме кофермента — пиридоксальфосфата (ПАЛФ) входит в состав т. н. пиридоксальных ферментов, катализирующих переаминирование, декарбоксилирование и др. превращения аминокислот в организмах, а также в состав фосфоорилазы гликогена. Синтезируются микроорганизмами, зелёными растениями, у жвачных и человека – кишечной микрофлорой. Недостаток В₆ вызывает анемию, дерматит и судороги.



I: R = CH₂OH

II: R = CHO

III: R = CH₂NH₂

В присутствии хлорного железа растворы, содержащие пиридоксин, приобретают красную окраску.

Ход работы

В одну пробирку помещают 1 мл водной вытяжки из серого хлеба, во вторую – 1 мл водной вытяжки из белого хлеба. В обе пробирки добавляют по 1-2 капли 5% раствора хлорного железа, встряхивают.

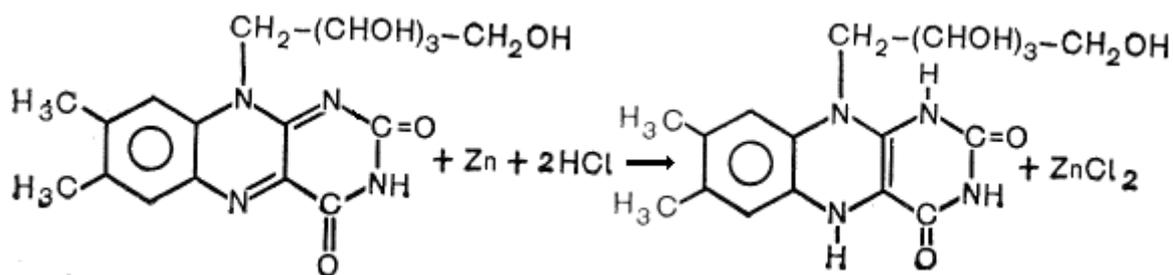
Вывод: записать результаты эксперимента.

Опыт 2. Качественная реакция на витамин В₂.

Рибофлавин состоит из изоаллоксазинового ядра и спирта рибитола. Рибофлавин входит в состав простетической группы флавиновых ферментов – флавопротеидов в виде коферментов флавинадениндинуклеотида (ФАД) и флавинаденинмононуклеотида (ФМН). Флавопротеиды активируют реакции дегидрирования, т. е. отщепления протонов и электронов от субстратов. Они участвуют в окислении D-аминокислот, β-оксикетокислот, НАДН (Н⁺), в биологическом окислении и др.

Биологическое действие флавиновых ферментов связано с наличием в изоаллоксазиновом кольце двойных связей: флавиновый фермент отнимает от окисляемой молекулы два электрона, присоединяя их к азоту по месту двойных связей, и два протона.

При недостатке в организме витамина В₂ могут возникнуть, например, катаракта (помутнение хрусталика) и другие заболевания.



Принцип метода. Окисленная форма витамина В₂ представляет собой желтое флюоресцирующее в ультрафиолетовых лучах вещество. Реакция на витамин В₂ основанная на способности его легко восстанавливаться; при этом раствор витамина В₂, обладающий желтой окраской, приобретает сначала розовый цвет за счет образования промежуточных соединений, а затем обесцвечивается, так как восстановленная форма витам.

Ход работы

1/10 часть таблетки или порошка рибофлавина растворяют в 1 мл воды, наблюдают флюоресценцию раствора. В раствор добавляют 1 мл конц. НСl и небольшой кусочек металлического цинка. Жидкость постепенно окрашивается сначала в розовый цвет за счет образования промежуточного соединения красного цвета - родофлавина, а потом обесцвечивается вследствие образования лейкофлавина. Происходит восстановление рибофлавина, выделяющимся газообразным водородом.

Вывод: записать результаты эксперимента.

Вопросы для самоконтроля:

1. Общая характеристика и классификация витаминов?
2. Какова роль витаминов в обмене веществ?
3. Как изменяется потребность в витаминах при интенсивной мышечной деятельности?
4. Что является причиной проявления гиповитаминоза в весенний период?

5. Почему избыточное потребление жирорастворимых витаминов приводит к развитию гипervитаминозов, водорастворимых – нет?

Лабораторная работа № 5

Тема: «Влияние активаторов и ингибиторов на амилазу слюны»

Цель: изучить ингибиторы и активаторы ферментов. Опытным путем установить влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны

Теоретическая часть

Ферменты (энзимы) – биологические катализаторы, ускоряющие химические реакции обмена веществ в организме, в химическом отношении являются белками.

По строению ферменты делятся на:

- 1) простые или однокомпонентные;
- 2) сложные или двухкомпонентные (холоферменты).

Простые ферменты представляют собой простые белки и при гидролизе распадаются только на аминокислоты (пепсин, трипсин, уреазы и др.).

Сложные ферменты – холоферменты, являются сложными белками и, помимо, полипептидных цепей содержат небелковый компонент (**кофактор**). Белковая часть двухкомпонентного фермента называется **апоферментом**.

Кофакторы могут иметь различную прочность связи с апоферментом.

Если кофактор прочно связан с полипептидной цепью, он называется **протетической группой**. Между протетической группой и апоферментом – ковалентная связь. Если кофактор легко отделяется от апофермента и способен к самостоятельному существованию, то такой кофактор называется **коферментом**.

Биологическая роль кофакторов

Химическая природа кофакторов крайне разнообразна. Роль кофакторов в двухкомпонентных ферментах играют:

- большинство витаминов (Е, К, Q, С, Н, В₁, В₂, В₆, В₁₂ и др.);
- соединения нуклеотидной природы (НАД, НАДФ, АТФ, КоА, ФАД, ФМН), а также целый ряд др. соединений;
- липолевая кислота;
- многие двухвалентные металлы (Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ и др.).

Например, витамины В₂ и В₅ в составе НАД, НАДФ, ФАД, ФМН осуществляют перенос водорода в окислительно-восстановительных реакциях, витамин В₁ участвует в декарбоксилировании кетокислот, пантотеновая кислота – перенос ацильных групп, витамин В₆ – перенос аминокислот.

Потеря кофактора в результате диссоциации или отсутствие его, при авитаминозе приводит к утрате ферментативной активности и нарушению обмена веществ.

Свойства ферментов

1. Все ферменты – термолабильны, т.е. оптимум действия 0-45°C. При увеличении температуры на каждые 10°, но до 50°, активность ферментов возрастает в 2 раза (правило Вант-Гоффа). При температуре 80-90° ферменты денатурируются. Но есть исключения, миокиназа выдерживает 100°. При температур около 0°C фермент обычно не разрушается, но активность их падает до нуля.

2. Ферменты специфичны; различают абсолютную и относительную специфичность. Относительная (групповая) специфичность наблюдается, когда фермент катализирует реакции одного типа с более чем одним структуроподобным субстратом.

Абсолютная специфичность проявляется тогда, когда фермент действует лишь на одно – единственное вещество и катализирует лишь определенное превращение данного вещества. Например: фермент уреазы

катализирует гидролиз мочевины; сахараза - катализирует превращение только сахарозы.

Стереоспецифичность - фермент катализирует превращение только одного из возможных стереоизомеров субстрата.

3. Ферменты для своего действия требуют строго определённого значения pH среды, такая концентрация ионов водорода необходима для ионизации субстрата, для сохранения активности ферментов, связи между коферментом и апоферментом. Кислая фосфотаза при pH = 4,5, амилаза слюны при pH = 6,8, трипсин 7,5-8,5 и т.д.

4. Ферменты обладают высокой каталитической активностью (например, холинэстераза за 1 сек. расщепляет 300000 молекул ацетилхолина).

5. Обратимость действия. Большинство ферментов легко катализируют реакции и влево и вправо. Это не свойственно протолитическим ферментам.

6. Зависимость от времени. Ферменты необходимо исследовать сразу, потому что по истечении времени накапливаются продукты которые подавляют активность ферментов.

Классификация ферментов

Все ферменты разделены на 6 классов:

1. Оксидоредуктазы;
2. Трансферазы;
3. Гидролазы;
4. Лиазы;
5. Изомеразы;
6. Лигазы (синтетазы).

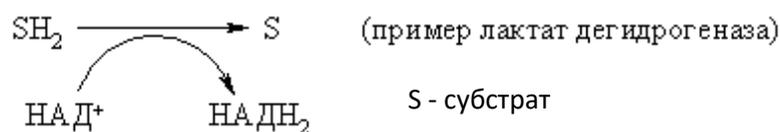
Оксидоредуктазы – это ферменты, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции.

Окисление субстрата. Окисление субстрата возможно:

1. Отщеплением от субстрата атомов водорода

Акцептором атомов водорода могут быть:

а) Коферменты – НАД⁺ или ФАД (редко НАДФ⁺). В данном случае фермент носит название «дегидрогеназа».



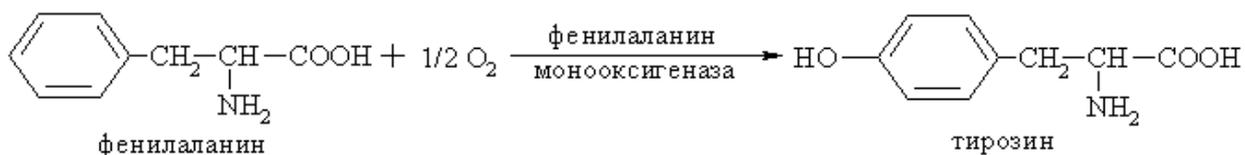
б) Кислород (O₂). В данном случае фермент называется «оксидаза» и в результате реакции образуется перекись водорода.



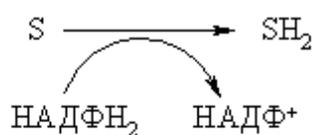
2. Присоединение к субстрату атомов кислорода. В данном случае фермент носит название «оксигеназа». Если к молекуле субстрата присоединяется один атом кислорода, то фермент называется «монооксигеназа», если два, то «диоксигеназа».



Например:



II. Восстановление субстрата. Восстановление субстрата возможно путем присоединения к нему водорода (H₂). Донором водорода чаще всего выступает НАДФН₂.



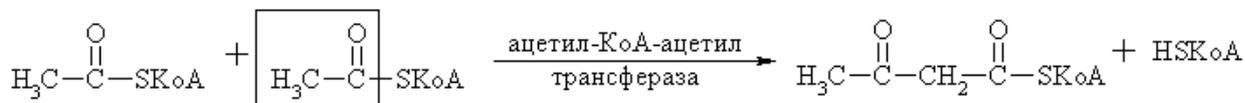
Пример:



Трансферазы

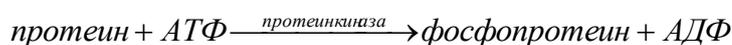
Трансферазы – это ферменты, которые катализируют реакции переноса различных групп от одного вещества (донора) к другому (акцептору). В организме осуществляется перенос следующих групп: метильных, ацетильных, ацильных, фосфорных и т.д. Рабочее название фермента складывается по принципу: акцептор + переносимая группа + трансфераза.

Например:



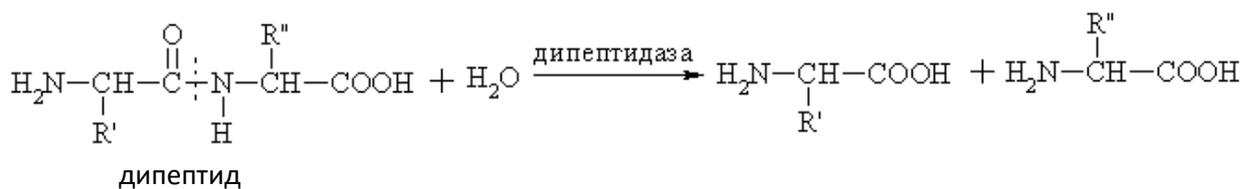
Трансферазы, которые катализируют реакции переноса фосфорных групп принято называть киназами. Рабочее название киназ складывается из названия акцептора + термин «киназа». Донором фосфатной группы является АТФ.

Например:



Гидролазы

Гидролазы – это ферменты, которые катализируют реакции разрыва связей в субстратах с присоединением воды. Рабочее название фермента в этом классе складывается из названия субстрата + окончание аза

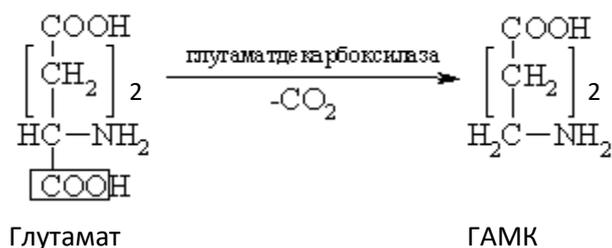


Все пищеварительные ферменты и ферменты лизосом являются гидролазами. В этом классе много исторически сложившихся или тривиальных названий. Такие названия не подчиняются правилам «Классификации и номенклатуры ферментов». Например, пепсин, трипсин, гастриксин и т.д.

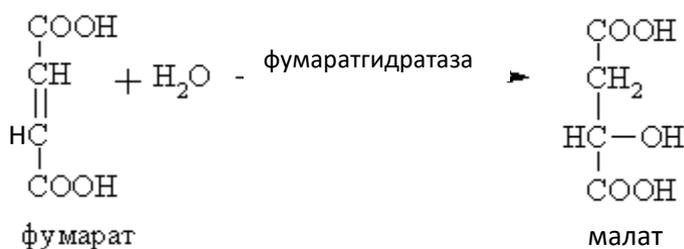
Лиазы

Лиазы – это ферменты, катализирующие реакции разрыва связей в субстратах путем негидролитического отщепления различных групп (CO₂, NH₂, H₂O и др.) или присоединения воды по месту двойной связи. Названия ферментов складываются следующим образом: субстрат + отщепляемая или присоединяемая группа + окончание аза

1. Декарбоксилазы – это ферменты, катализирующие отщепление CO₂ от субстрата



2. Гидратазы – это ферменты, катализирующие присоединение H₂O к субстрату.

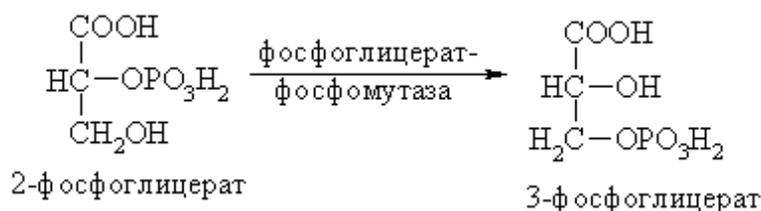


3. Синтазы – это ферменты, катализирующие реакции синтеза без участия АТФ (за счет энергии субстрата)

4. Альдолазы – это ферменты, катализирующие разрыв связей в субстрате, при котором один из продуктов реакции обязательно является альдегидом.

Изомеразы

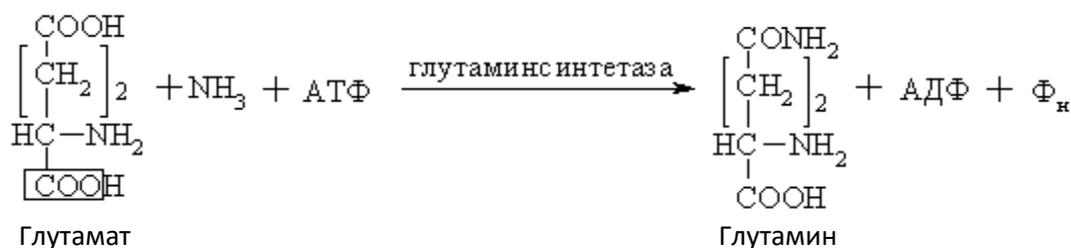
Изомеразы – это ферменты, катализирующие реакции изомеризации, происходящие в пределах одной молекулы. В зависимости от вида изомерии ферментам дают соответствующие названия: рацемазы – катализируют превращения стереоизомеров, эпимеразы – эпимеров, таутомеразы – таутомеров. Мутазы катализируют реакции переноса функциональных групп в пределах одной молекулы. Название этих ферментов складывается следующим образом: название субстрата + название переносимой группы + мутаза.



Некоторые ферменты имеют название изомеразы (например, при цис – транс изомерии).

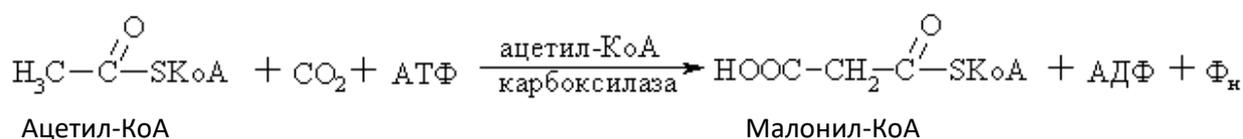
Лигазы

Лигазы – это ферменты, катализирующие синтетические реакции, которые происходят с участием энергии АТФ или др. нуклеозидтрифосфатов.



Название фермента складывается следующим образом: продукт реакции + синтетаза.

К этому классу относят карбоксилазы. Присоединение карбоксильной группы к субстрату происходит с затратой энергии АТФ. Название фермента будет состоять из названия исходного субстрата + термин «карбоксилаза»



Принцип метода: Активаторами и ингибиторами называются вещества, которые способны ускорить или затормозить действие ферментов. Механизм действия активаторов и ингибиторов не всегда ясен. В некоторых случаях в отсутствие активатора действие фермента совершенно не проявляется.

Например, амилаза после диализа полностью теряет способность расщеплять крахмал и вновь ее приобретает после добавления NaCl.

Активаторами и ингибиторами часто пользуются в биохимических исследованиях для изучения механизма действия отдельных ферментов, имеющих в тканях. Прибавлением различных ядов удается блокировать активные центры одних ферментов, не изменяя при этом действие других. Если к отдельным порциям смеси, содержащей крахмал и амилазу, прибавить в одном случае NaCl, в другом - воду, в третьем - раствор CuSO₄ (или соли свинца, ионы серебра) и инкубировать в течение , то через некоторое время

при добавлении йода жидкость в пробе с NaCl окрасится в желтый цвет, в контрольной пробе с водой - в красный, а в пробе с CuSO₄ в синий.

Различная окраска жидкости обусловлена неодинаковой степенью гидролиза крахмала амилазой в присутствии NaCl и CuSO₄.

Ход работы

Реактивы: 1) вода дист.; 2) NaCl, 1% р-р; 3) CuSO₄, 1-5% р-р; 4) слюна, разбавленная в 5 раз; 5) крахмал, 0,5% р-р; 6) йод (р-р Люголя).

Готовят 3 пробирки. В первую наливают 10 капель дистиллированной воды, во вторую - 8 капель воды + 2 капли 1 % р-ра NaCl, а в третью - 8 капель воды + 2 капли 1% р-ра CuSO₄. В каждую пробирку приливают по 10 капель слюны, разведенной в 5 раз, перемешивают, добавляют 5 капель 0,5 % р-ра крахмала. вновь перемешивают, оставляют стоять при комнатной температуре. Через 5-10 минут во все пробирки прибавляют по 5 капель раствора йода. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активатором амилазы является NaCl (2-я пробирка), а ингибитором амилазы является CuSO₄ (3-я пробирка).

Вывод: записать результаты эксперимента.

Вопросы для самоконтроля:

1. Общая характеристика и строение ферментов.
2. Активный и аллостерический центры ферментов.
3. Механизм действия ферментов. Энергия активации.
4. Общие свойства ферментов. Регуляция активности ферментов.
5. Классификация ферментов.

Тема: «Осаждение клеточных структур»

Цель: ознакомиться с методиками для исследования изолированных отделов клетки. Научиться пользоваться приборами.

Теоретическая часть

Выделение клеточных органелл. Разработан ряд методик для исследования изолированных отделов клетки. Для того чтобы выделить клеточные органеллы, исследуемый образец измельчают и затем **гомогенизируют** в забуференной среде с использованием гомогенизатора Поттера-Элведжема (тефлоновый пестик, вращающийся в стеклянном цилиндре). Это сравнительно мягкий метод, который особенно предпочтителен для выделения лабильных молекул и ультраструктур. Другие методики разрушения клеток включают ферментативный лизис, разрушающий клеточные стенки, или механическое разрушение замороженных тканей (размолот или с помощью вращающихся ножей; под большим давлением; осмотическим шоком; многократным чередованием замораживания и оттаивания).

Для выделения интактных органелл важно, чтобы среда, в которой проводится гомогенизация, была *изотонической*, т.е. осмотическое давление буфера должно соответствовать давлению внутри клетки. Если раствор гипотоничен, органеллы будут «впитывать» дополнительную воду и лопнут, а в гипертонических растворах они, напротив, сморщиваются.

Вслед за гомогенизацией следует **фильтрование** через марлю для удаления интактных клеток и соединительных тканей. Собственно фракционирование клеточных органелл проводится с помощью дифференциального центрифугирования, т.е. центрифугирования при различных скоростях вращения ротора. При этом ступенчатое увеличение центробежной силы приводит к последовательному осаждению различных органелл, т.е. их разделению в соответствии с плотностью и размером.

Ядро седиментирует уже при ускорении, достигаемом с помощью настольных центрифуг. Декантирование супернатанта (надосадочной жидкости) и тщательное повторное ресуспендирование осадка дает фракцию, обогащенную клеточными ядрами. Однако эта фракция все еще содержит другие клеточные компоненты в качестве примесей, например, фрагменты цитоскелета.

Частицы меньших размеров и менее плотные, чем ядро, получают при воздействии на супернатант постепенно увеличивающегося ускорения. Эта операция проводится на более мощных центрифугах, таких, как высокоскоростные центрифуги с охлаждением и ультрацентрифуги. Порядок осаждения фракций следующий: митохондрии, затем мембранные пузырьки (везикулы) и рибосомы. Супернатант последнего центрифугирования представляет собой «цитозоль», т.е. растворимые компоненты клетки, перешедшие при гомогенизации ткани в буферный раствор.

Выделение клеточных органелл обычно проводят при низких температурах (0-5°C) для того, чтобы уменьшить степень деградации материала за счет реакций, катализируемых ферментами; последние высвобождаются в процессе разрушения ткани. Добавление тиолов и хелатирующих агентов необходимо для защиты функциональных SH-групп от окисления.

В процессе фракционирования важно контролировать чистоту фракций. Присутствие в определенной фракции той или иной органеллы и наличие других компонентов определяют с помощью **молекул-маркеров**. Обычно это органеллоспецифичные ферменты (**ферменты-маркеры**). Распределение ферментов-маркеров в клетке отражает локализацию в ней соответствующих каталитических реакций.

Основы метода центрифугирования. Частицы в растворе *осаждаются (седиментация)*, когда их плотность выше плотности раствора, или *всплывают (флотация)*, когда их плотность ниже плотности раствора.

Чем больше разница в плотности, тем быстрее идет распределение частиц. Когда плотности частиц и раствора одинаковые (*изопикнические условия*), частицы остаются неподвижными. При малой разнице в плотности частицы можно разделить только в центрифуге, которая создает центробежную силу, во много раз превышающую силу земного притяжения.

Роторы. Возникающая в центрифуге центробежная сила, которая, создается ускорением, обычно выражается числом, кратным ускорению свободного падения g ($g = 9,81 \text{ м/с}^2$). Величины до 10000g получают с помощью простой настольной центрифуги, высокоскоростные рефрижераторные центрифуги позволяют достигнуть 50000g, а ультрацентрифуги, работающие с охлаждением и в вакууме, — 500000g. Существуют два типа роторов — *угловые* и *свободно подвешенные*, так называемые бакет-роторы. Последние используются обычно в высокоскоростных центрифугах и ультрацентрифугах.

Скорость седиментации частицы (v) зависит от угловой скорости (ω), эффективного радиуса ротора $r_{\text{эфф}}$ (расстояние от оси вращения) и седиментационных свойств частиц.

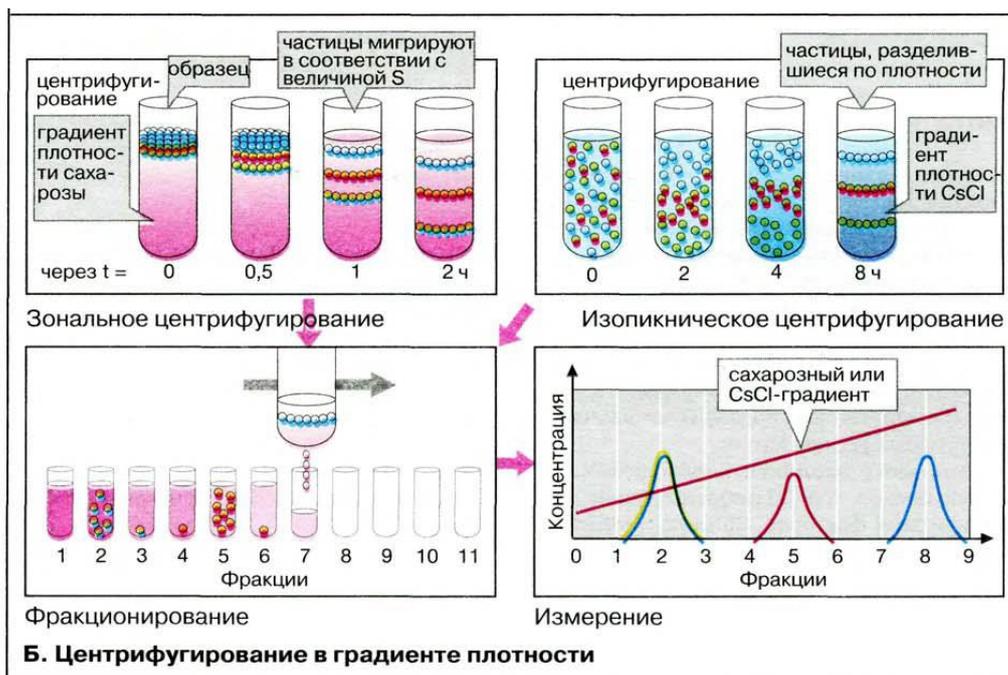
Седиментационные свойства частицы характеризуются **коэффициентом седиментации S** и выражаются в единицах Сведберга ($1S = 10^{-13}\text{с}$). На схеме справа показано соотношение между плотностью и коэффициентом седиментации для различных частиц в растворе хлорида цезия (CsCl). Величина S может колебаться в широких пределах. Для сравнения коэффициентов седиментации в различных средах их обычно корректируют по плотности и вязкости воды при 20°C (S_{20w}).

Коэффициент седиментации зависит от молекулярной массы (M) частицы, ее формы (коэффициент трения f), парциального удельного объема \bar{v} (величина, обратная плотности частицы). Из рисунка видно, что белки, ДНК (DNA) и РНК (RNA) сильно различаются по плотности.

Центрифугирование в градиенте плотности. Макромолекулы или органеллы, незначительно различающиеся по размеру или по плотности, можно разделить центрифугированием в градиенте плотности. Для этих целей используются два метода.

При **зональном центрифугировании** анализируемая проба (например, белки или клетки) наслаивается тонким слоем поверх буферного раствора. В процессе центрифугирования частицы проходят через раствор, так как их плотность выше плотности раствора. Скорость движения зависит от массы и формы частиц (см. формулы на схеме А). Центрифугирование прекращают прежде, чем частицы достигнут дна центрифужной пробирки. Затем дно прокалывают и собирают ряд фракций, содержащих различные частицы. Стабильность градиента плотности в процессе центрифугирования достигается применением растворов углеводов или коллоидного силикагеля, концентрация которых возрастает от поверхности к дну пробирки. Градиент плотности препятствует образованию конвекционных потоков, снижающих качество разделения.

При **изопикническом центрифугировании** пробу (например ДНК, РНК или вирусы) равномерно распределяют во всем объеме раствора (обычно CsCl). В этом случае разделение продолжается значительно дольше, чем при зональном центрифугировании. Градиент плотности создается в процессе центрифугирования за счет седиментации и диффузии. Со временем каждая частица попадает в область, соответствующую ее собственной плавучей плотности. Центрифугирование прекращают, когда устанавливается равновесие. Полученные фракции анализируют, используя подходящую измерительную технику.



Отделить белок от желтка. Добавить к белку 70-100 мл буферного раствора. Затем образец гомогенизируют 2 мин. Отбирают 0,5 мл пробу в эппендорф и центрифугируют 10 мин при скорости 9000 об/мин.

Сделать **вывод** относительно полученных результатов (какие органеллы были седиментированы).

Вопросы для самоконтроля:

1. Какие существуют способы выделения клеточных органелл?
2. С какой целью образцы гомогенизируют?
3. Как выделяют частицы меньших размеров, чем ядро?
4. Каков порядок осаждения фракций клеточных структур?
5. С какой целью применяют молекулы-маркеры?
6. На чем основан метод центрифугирования?
7. Какие существуют типы роторов?
8. От каких факторов зависит скорость седиментации?
9. Что характеризует коэффициент седиментации?
10. На чем основано центрифугирование в градиенте плотности?
11. Как проводят зональное центрифугирование?

Лабораторная работа № 7

Тема: «Основы метода полимеразной цепной реакции»

Цель: изучение принципа действия метода полимеразной цепной реакции.

Теоретическая часть

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод, который позволяет найти в исследуемом клиническом материале небольшой участок генетической информации любого организма, специфичный только для данного вида организмов, среди огромного количества других участков и многократно размножить его.

Принцип метода: Метод ПЦР основан на естественной репликации ДНК, включающей расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК и комплементарное дополнение обеих.

Репликация ДНК в ПЦР-методе может начаться не в любой точке, а только в определенных **стартовых блоках** – коротких двунитевых участках ДНК. Суть метода заключается в том, что, маркируя такими блоками специфический только для данного вида организмов участок ДНК, можно многократно воспроизвести (**амплифицировать**) именно этот участок.

Для того чтобы осуществить такой процесс *in vitro* (в пробирке), используют две генетические пробы, называемые **праймерами**, которые служат в качестве затравки для синтеза выбранного участка ДНК. При внесении в исследуемую пробу праймеры подобно паре генетических детективов прочесывают раствор в поисках участка, которому они комплементарны и, следовательно, способны присоединиться, образовав двунитчатый стартовый участок. После присоединения праймеров (**отжиг**) начинается воспроизведение специфического фрагмента ДНК с помощью фермента **Taq-полимеразы**. Вновь

синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации – это и есть цепная полимеразная реакция в ПЦР-методе. В результате ее количество копий специфического участка ДНК увеличивается в геометрической прогрессии и через 25 циклов амплификации синтезируются 10^6 копий фрагмента. В течение 30-40 циклов нарабатывается количество ДНК, достаточное, чтобы визуально учитывать результаты реакции после электрофореза в агарозном геле. Протекание ПЦР (т.е. переход от стадии к стадии и от цикла к циклу) регулируется изменением температуры рабочей смеси:

1. **температура денатурации ДНК** является функцией ионной силы используемого буфера;
2. **температура отжига** – температура, при которой возможно связывание праймера с матрицей, зависит от длины праймера и его первичной структуры;
3. **температура элонгации**, зависит от типа используемой ДНК-полимеразы.

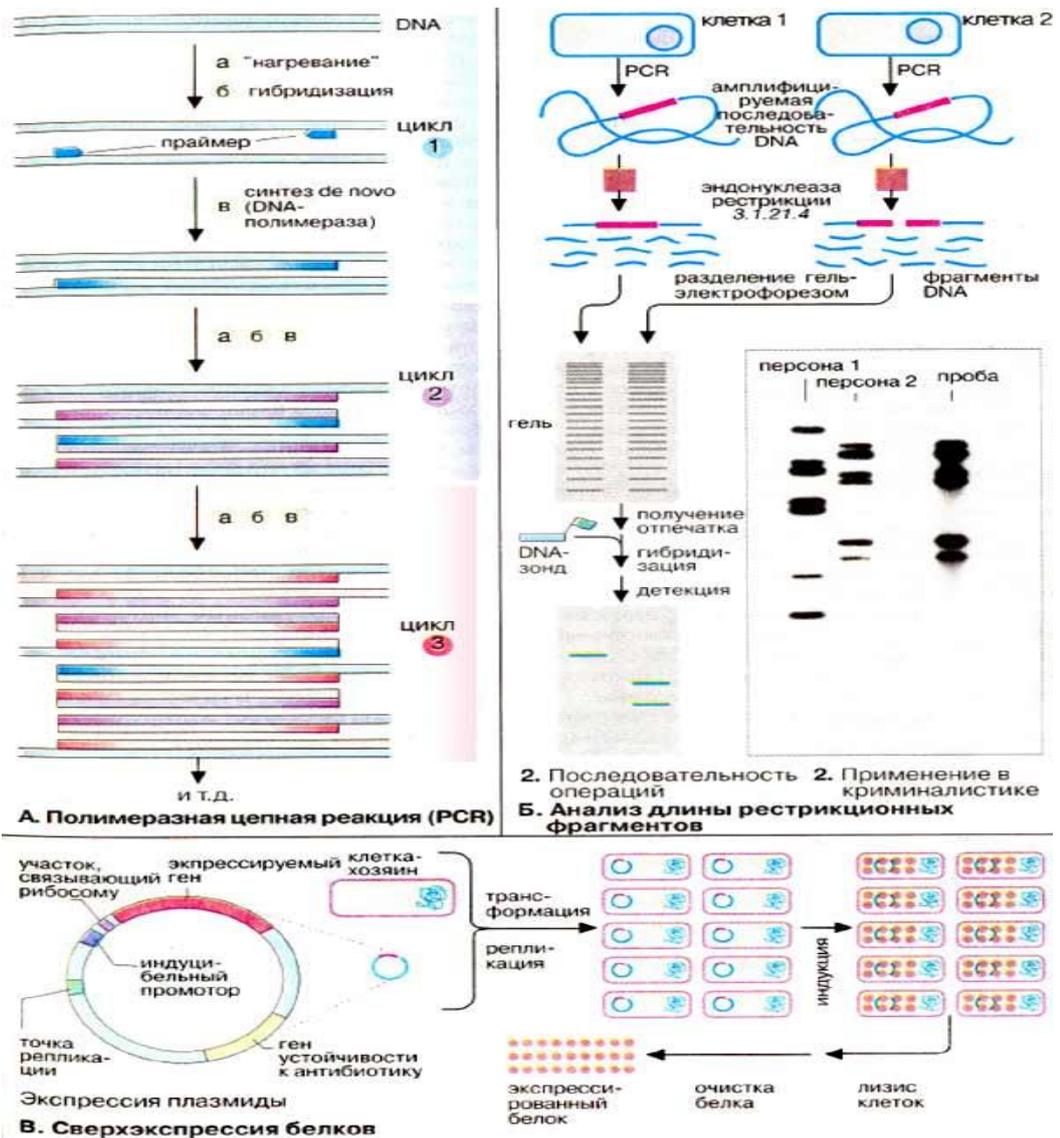
Чувствительность: очень высокая: около 10 бактериальных клеток, в то время как чувствительность иммунологических и микроскопических тестов колеблется в пределах 10^3 - 10^6 клеток.

Специфичность: 100 %.

Для ПЦР-анализа пригоден любой материал, в том числе и гистологические препараты.

Количество исследуемого материала составляет несколько десятков мл, но при низкой концентрации возбудителя может быть увеличен в сотни и тысячи раз за счет необходимости экстракции ДНК и РНК.

Исследуемый материал можно дезинфицировать химической или термической обработкой в момент его забора, и, следовательно исключается возможность инфицирования персонала в процессе проведения ПЦР.



Оборудование и реагенты:

В настоящее время метод ПЦР автоматизирован, довольно прост в исполнении и доступен любой молекулярно-биологической лаборатории. Для получения ответа на интересующие вопросы диагностики достаточно лишь смешать в пробирке:

- 1) ДНК-мишень, 10 нг/мкл;
- 2) Праймеры – короткие олигонуклеотиды (20-30 нукл.) – затравки, комплиментарные 3'-концевым последовательностям антипараллельных цепей ДНК гена, 2 шт., концентрация каждого 5 пмоль/мкл;
- 3) Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты 4 типов, смесь 2мМ;

- 4) *Taq*-ДНК-полимераза термостабильная, 5 Е/мкл (название свое фермент получает по имени штамма-продуцента);
- 5) ПЦР-буфер (ТРИС-буфер (рН 8.4), 200мМ; КСl, 500мМ; 0.01% Tween 20);
- 6) раствор MgCl₂, 25мМ;
- 7) Вода деионизованная;
- 8) Программируемый термостат (**амплификатор**), который по заданной программе автоматически проводит смену температур реакционной среды.

Определение можно проводить в разнообразном клиническом материале (кровь, сыворотка, лаважные массы, мокрота, слюна, желудочный сок, биопсийный материал, мазки, смывы) и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва).

Проведение анализа

ПЦР состоит из 3 основных процедур:

1. подготовки исследуемой пробы материала (изоляция ДНК или РНК);
2. собственно ПЦР;
3. детекция продукта ПЦР (амплифицированной ДНК).

Пятью основными компонентами ПЦР являются следующие:

- a. фермент *Taq*-ДНК-полимераза;
- b. пара олигонуклеотидных праймеров;
- c. 4 типа дезоксинуклеозидтрифосфатов (dАТФ, dГТФ, dЦТФ, dТТФ);
- d. копируемая ДНК;
- e. ионы Mg⁺².

Вспомогательными компонентами являются буферный раствор и минеральное масло.

Поскольку праймеры каждый раз встраиваются в амплифицируемые фрагменты ДНК-матрицы (**амплификоны**), то они в реакционной смеси ПЦР присутствуют в избытке.

Как правило, праймеры для ПЦР-детекции инфекционных возбудителей создают на консервативные участки их ДНК, которые редко подвергаются

генетическим перестройкам. Поиски таких участков осуществляют при помощи специальных компьютерных программ.

Результаты получают через несколько часов, то есть в течение одного рабочего дня.

Методика:

Рассмотрим ПЦР-анализ на примере амплификации участка плазмиды pBluescript II SK, размером ~ 180 п.н.

ПЦР проводится в объеме 10-100 мкл. Рабочая концентрация праймеров в реакционной смеси составляет 0.2-1 пмоль/мк. Количество матричной ДНК, добавляемой в реакцию колеблется в пределах от 10 до 1000 нг. Рабочая концентрация *Taq*-ДНК-полимеразы в реакционной смеси составляет 0.01-0.05 Е/мкл. Считается, что "скорость" достраивания у *Taq*-ДНК-полимеразы составляет 1000 нуклеотидов в минуту .

Ход работы

1. В стерильном эппендорфе на 0,5 мл смешать указанные выше компоненты, довести объем при помощи деионизованной воды до 20 мкл, аккуратно перемешать реакционную смесь пипетированием.
2. Наслоить на реакционную смесь немного минерального масла (приблизительно 30 мкл).
3. Поместить пробирки в амплификатор. Реакцию проводить в следующем режиме:

Температура, С	Стадия	Время	Число циклов
96	Денатурация	40 сек	25
50	Отжиг	30 сек	
72	Элонгация	30 сек	
72		10 мин	1
0		хранение	1

4. Детекция продуктов амплификации проводится методом электрофореза на агарозном геле.

Работать следует только в одноразовых перчатках и сменной обуви.

Чувствительность ПЦР может достигать математически возможного предела (детекция 1 копии ДНК-матрицы), поэтому существует высокая степень опасности получения ложно-положительного результата в силу переноса через предметы и реагенты как самой ДНК-матрицы (реже), так и амплификонов (очень часто), получаемых в больших количествах во многих пробирках в течение ежедневной работы. В связи с этим нами разработаны специальные требования к планировке и режиму работы ПЦР-генодиагностической лаборатории. Поэтому детекция продуктов ПЦР должна проводиться в изолированной комнате сотрудником, не производящим обработку клинических образцов и не готовящим реактивы для ПЦР. Приготовление основных растворов также должно производиться в отдельной чистой комнате. Все растворы должны храниться и использоваться в небольших порциях.

Клинико-диагностическое значение: ПЦР в настоящее время является наиболее совершенным диагностическим методом, позволяющим выявлять единичные клетки возбудителей многих инфекционных заболеваний за счет амплификации специфических для этих возбудителей фрагментов ДНК.

ПЦР позволяет обнаруживать патогенные для человека бактерии и вирусы даже в тех случаях, когда другими способами (иммунологическим, бактериологическим, микроскопическим) их выявление невозможно.

Тест-системы на основе ПЦР эффективны при диагностике трудно культивируемых, не культивируемых и персистирующих форм патогенных бактерий. С этим приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, а также при тестировании объектов внешней среды.

Метод позволяет определять число копий возбудителя в пробе и тем самым контролировать вирусологию или бактериологию в процессе лечения.

Метод также пригоден для выявления носителей дефектных генов (например ген HbS серповидно-клеточной анемии).

ПЦР-диагностикумы, в отличие от иммунологических тест-систем, позволяют избежать проблем, связанных с перекрестно-реагирующими антигенами, тем самым обеспечивая абсолютную специфичность определения патогенного организма.

Сделать **выводы** относительно клинико-биологического значения метода ПЦР.

Вопросы для самоконтроля:

1. Медикобиологическое значение метода ПЦР?
2. Механизм полимеразной цепной реакции.
3. Стадии постановки метода ПЦР.
4. Достоинства и недостатки метода.

Лабораторная работа № 8

Тема: «Изучение динамики гидролиза триацилглицеринов под действием панкреатической липазы»

Цель: изучить факторы, влияющие на динамику переваривания липидов.

Теоретическая часть

Потребность в липидах взрослого организма составляет 80-100 г в сутки, из них растительных (жидких) жиров должно быть не менее 30%. С пищей в основном поступают триацилглицеролы, фосфолипиды и эфиры ХС.

Переваривание липидов осложняется тем, что их молекулы полностью или частично гидрофобны. Для преодоления этой помехи используется процесс эмульгирования,

когда гидрофобные молекулы

(ТАГ, эфиры ХС) или гидрофобные части молекул (жирные кислоты в составе ФЛ, циклическая структура ХС) погружаются внутрь мицеллы, а гидрофильные остаются на поверхности, обращенной к водной фазе.

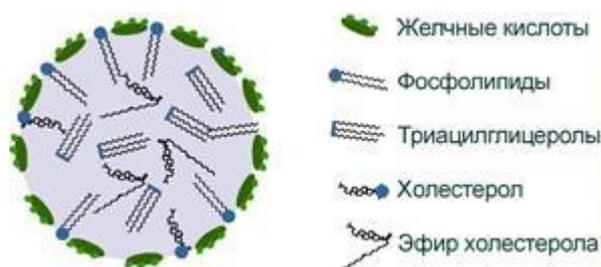


Рис. 1 - Строение капли

эмульгированного жира

Этапы переваривания жиров

1. **Эмульгирование** жиров пищи – необходимо для того, чтобы ферменты ЖКТ смогли начать работу.

2. **Гидролиз** триацилглицеролов, фосфолипидов и эфиров ХС под влиянием ферментов ЖКТ.

3. **Образование мицелл** из продуктов переваривания (жирных кислот, МАГ, холестерина).

4. **Всасывание** образованных мицелл в эпителий кишечника.

5. Ресинтез триацилглицеролов, фосфолипидов и эфиров ХС в энтероцитах.

После ресинтеза липидов в кишечнике они собираются в транспортные формы – **хиломикроны** (в основном) и липопротеины высокой плотности (ЛПВП) (малое количество) – и разносятся по организму. Эмульгирование и гидролиз липидов происходят практически одновременно. Вместе с этим, продукты гидролиза не удаляются, а оставаясь в составе липидных капелек, облегчают дальнейшее эмульгирование и работу ферментов.

Переваривание в ротовой полости. У взрослых в ротовой полости переваривание липидов не идет, хотя длительное пережевывание пищи способствует частичному эмульгированию жиров.

Переваривание в желудке. Собственная липаза желудка у взрослого не играет существенной роли в переваривании липидов из-за ее небольшого количества и того, что ее оптимум рН 4,5-5,5. Также влияет отсутствие эмульгированных жиров в обычной пище (кроме молока). Тем не менее, у взрослых теплая среда и перистальтика желудка вызывает некоторое эмульгирование жиров. При этом даже низко активная липаза расщепляет незначительные количества жира, что важно для дальнейшего переваривания жиров в кишечнике, т.к. наличие хотя бы минимального количества свободных жирных кислот облегчает эмульгирование жиров в двенадцатиперстной кишке и стимулирует секрецию панкреатической липазы.

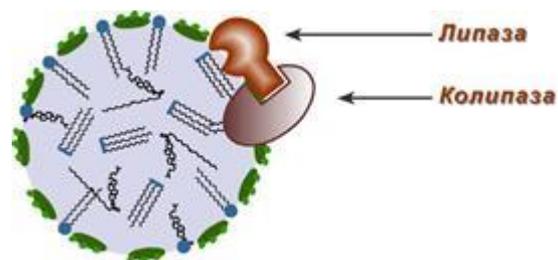
Переваривание жиров идет в кишечнике. Под влиянием перистальтики ЖКТ и составных компонентов желчи пищевой жир эмульгируется. Образующиеся лизофосфолипиды также являются хорошим поверхностно-активным веществом, поэтому они способствуют эмульгированию пищевых жиров и образованию мицелл. Размер капель такой жировой эмульсии не превышает 0,5 мкм.

Гидролиз эфиров ХС
панкреатического сока.

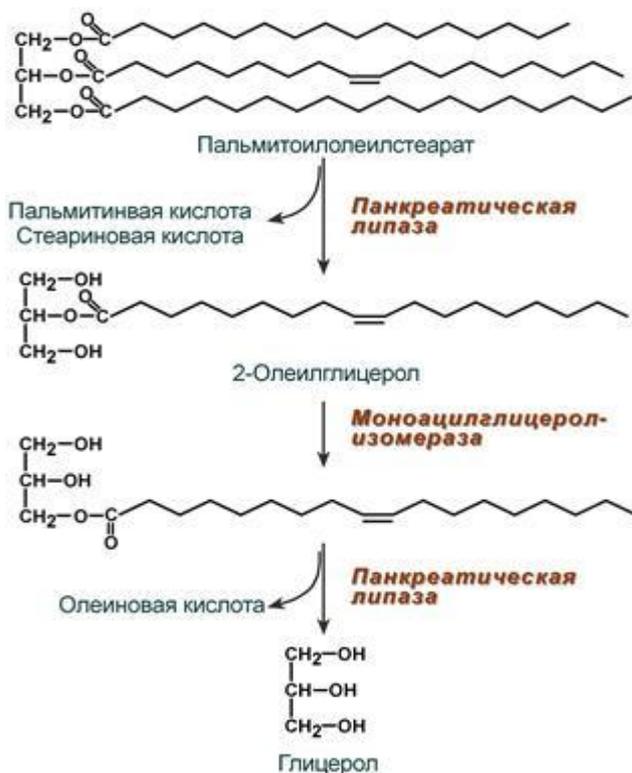
Переваривание ТАГ в
кишечнике осуществляется под
воздействием панкреатической
липазы с оптимумом рН 8,0-9,0. В
кишечник она поступает в
виде пролипазы, для проявления ее

активности требуется колипаза, которая помогает липазе расположиться на
поверхности липидной капли. Колипаза, в свою очередь,
активируется трипсином и затем образует с липазой комплекс в соотношении
1:1.

осуществляет холестеролэстераза



**Рис. 2 - Роль колипазы в действии
липазы**



**Рис. 3 - Полный ферментативный
гидролиз триацилглицерола**

Панкреатическая липаза
отщепляет жирные кислоты,
связанные с С¹ и С³ атомами
углерода глицерола. В результате ее
работы остается 2-
моноацилглицерол (2-МАГ). 2-МАГ
всасываются или
превращаются моноглицеролизоме
разой в 1-МАГ. Последний
гидролизуется до глицерола и
жирной кислоты. Примерно 3/4 ТАГ
после гидролиза остаются в форме 2-
МАГ и только 1/4 часть ТАГ
гидролизуется полностью.

В панкреатическом соке также имеется активируемая трипсином фосфолипаза A₂, отщепляющая в фосфолипидах жирную кислоту от C₂, также обнаружена активность фосфолипазы C и лизофосфолипазы.

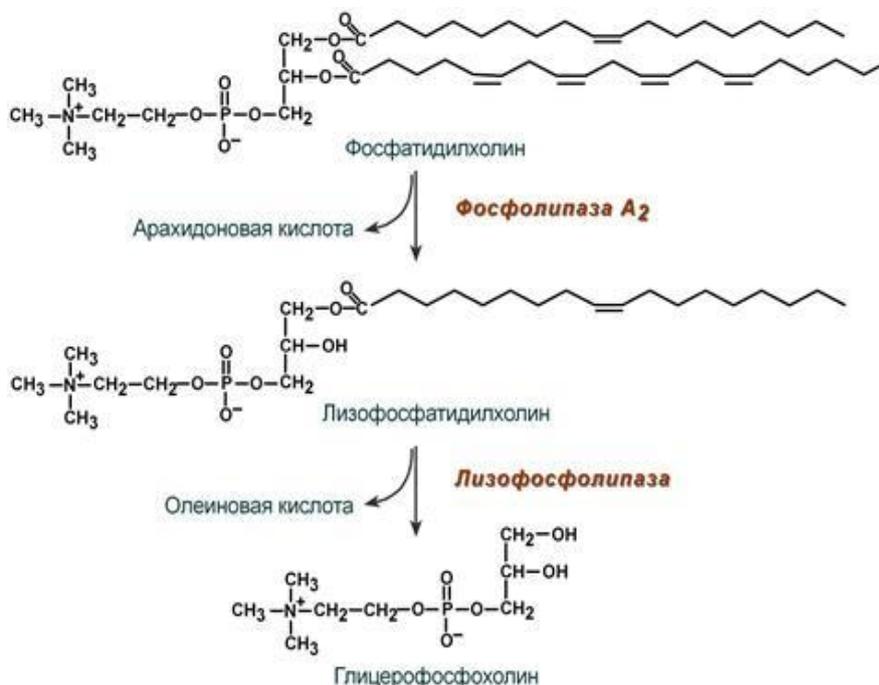
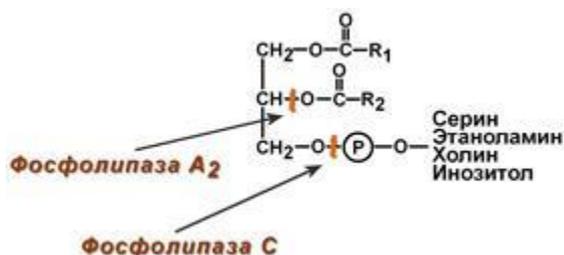


Рис. 4 - Действие фосфолипазы A₂ и лизофосфолипазы на примере фосфатидилхолина



В **кишечном соке** также имеется активность фосфолипазы A₂ и фосфолипазы C.

Рис. 5 - Точки действия фосфолипаз

Для работы всех указанных гидролитических ферментов в кишечнике необходимы ионы Ca²⁺, способствующие удалению жирных кислот из зоны катализа.

Образование мицелл. В результате воздействия на эмульгированные жиры ферментов панкреатического и кишечного соков образуются 2-моноацилглицеролы, жирные кислоты и свободный холестерин, формирующие структуры мицеллярного типа (размер около 5 нм). Свободный глицерол всасывается прямо в кровь.



Рис. 6 - Схематичное изображение переваривания липидов

Полученные мицеллы достигают эпителия кишечника и их составляющие диффундируют в клетки и попадают в гладкую эндоплазматическую сеть. Желчные кислоты почти не всасываются и остаются в просвете кишечника.

Ход работы

Основную часть пищевых липидов составляют триацилглицерины, поэтому в переваривании жира наиболее важны условия для действия панкреатической липазы (триацилглицерол-ацилгидролаза; КФ 3.1.1.3). Этот фермент гидролизует только эмульгированный жир в слабощелочной среде. Активатором фермента служат желчные кислоты. Липаза гидролизует преимущественно концевые ацилы молекулы триацилглицерина. Образующийся 2-моноацилглицерин расщепляется карбоксиэстеразой.

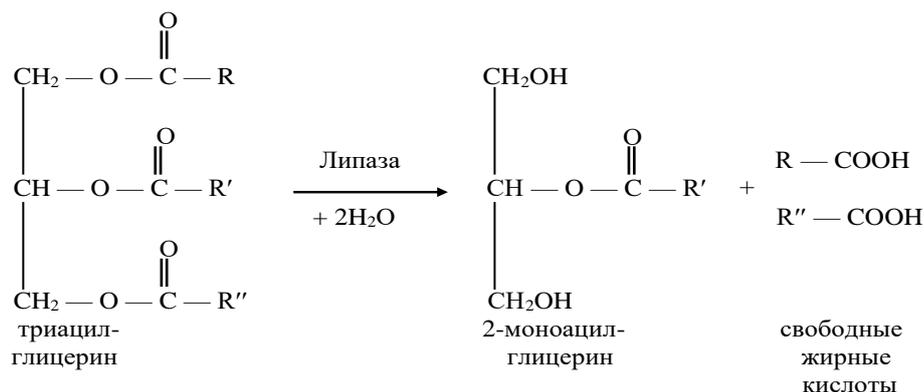
В качестве субстрата для изучения активности липазы используют приготовленную жировую эмульсию или молоко, в котором липиды находятся в эмульгированном состоянии.

Реактивы. Коровье молоко; желчь; гидроксид натрия, 0,1 М раствор; фенолфталеин, 0,5%-ный раствор в 76%-ном этаноле.

Оборудование. Колбы вместимостью 100 мл для титрования; микробюретка; водяная баня с лабораторным термометром.

Материал. Панкреатин, свежеприготовленный 5%-ный раствор на 1%-ном растворе гидрокарбоната натрия (pH≈8,0).

Метод основан на титриметрическом определении с помощью гидроксида натрия жирных кислот, освобождающихся из триацилглицеринов молока в процессе их гидролиза панкреатической липазой в присутствии и в



отсутствие желчи. Реакция протекает по уравнению

Количество образующихся жирных кислот определяется титрованием раствором гидроксида натрия с индикатором фенолфталеином.

Ход определения. В три колбы отмеряют цилиндром по 25 мл коровьего молока и добавляют в первую 2 мл дистиллированной воды, во вторую и третью по 2 мл раствора панкреатина. Кроме того, в третью колбу добавляют 5 капель желчи (1 мл).

Содержимое колб перемешивают и сразу отбирают по 5 мл в другие колбы для титрования (определяют исходный уровень свободных жирных кислот).

Колбы с оставшейся смесью помещают в водяную баню при 37°C и через каждые 15 мин берут по 5 мл их содержимого, переносят в колбы для титрования проб.

К отобраным 5 мл инкубационной смеси в колбы прибавляют по 10 мл дистиллированной воды и по 2 капли раствора фенолфталеина. Оттитровывают их содержимое 0,1 М раствором гидроксида натрия до слабо-

розовой окраски жидкости. Отмечают объем гидроксида натрия, пошедший на титрование всех проб.

Оформление работы. Результаты оформить графически: по оси ординат отложить объем раствора гидроксида натрия, пошедший на титрование всех проб, а по оси абсцисс – время. По полученным на графике трем кривым (1 – без липазы; 2 – с липазой; 3 – липаза и желчь).

Практическое значение работы. При заболеваниях поджелудочной железы, в которой образуется липаза, может нарушаться переваривание жиров, и они выводятся в неизменном виде. Однако чаще всего наблюдается нарушение переваривания жиров при патологии печени и желчевыводящих путей, когда желчь либо не вырабатывается, либо не поступает в кишечник в силу препятствий в желчевыводящих путях. Поскольку желчные кислоты являются активаторами липазы, эмульгаторами жиров, а также участвуют в процессе всасывания жирных кислот, то при их отсутствии резко нарушается процесс переваривания липидов с выделением их в большом количестве с фекалиями (стеаторея). Определение активности липазы применяется в клинике после взятия кишечного сока с помощью зонда для установления причины патологии переваривания липидов. В фармации метод исследования активности липазы необходим для контроля качества лекарственных препаратов (панкреатин, фестал, панзинорм и др.), содержащих этот фермент.

Сделать **вывод** об относительной скорости гидролиза триацилглицеринов под действием липазы и роли желчи в этом процессе.

Вопросы для самоконтроля:

1. Наличие каких факторов необходимо для переваривания липидов?
2. В каком отделе ЖКТ идет переваривание липидов?
3. Какие этапы включает процесс переваривания липидов?
4. Какой процесс катализирует панкреатическая липаза?
5. Как образуется мицелла при эмульгировании жиров?
6. Какова роль колипазы в действии липазы, чем она активируется?

7. Как действуют фосфолипазы?
8. На чем основан метод изучения динамики гидролиза триацилглицеринов под действием панкреатической липазы?
9. К чему может приводить недостаточная активность ферментов при переваривании?
10. Какую роль выполняют желчные кислоты?
11. Каково практическое значение лабораторной работы?

Лабораторная работа № 9

Тема: Определение компонентов мочи с помощью диагностических полосок (HUMAN-Test Combina).

Теоретическая часть

Основной функцией почек является выведение из организма воды и водорастворимых веществ (конечных продуктов обмена веществ). С экскреторной функцией тесно связана функция регуляции ионного и кислотно-основного равновесия внутренней среды организма (гомеостатическая функция). Обе функции контролируются гормонами. Кроме того, почки выполняют эндокринную функцию, принимая непосредственное участие в синтезе многих гормонов. Наконец, почки участвуют в процессах промежуточного метаболизма, особенно в глюконеогенезе и расщеплении пептидов и аминокислот.

Через почки проходит очень большой объем крови: 1500 л в сутки. Из этого объема отфильтровывается 180 л первичной мочи. Затем объем первичной мочи существенно снижается за счет реабсорбции воды, в итоге суточный выход мочи составляет 0,5-2,0 л.

Процесс мочеобразования

Функциональной (и структурной) единицей почек является **нефрон**, в почке человека содержится примерно 1 млн нефронов. Процесс мочеобразования в нефронах складывается из трех этапов.

Ультрафильтрация (гломерулярная или клубочковая фильтрация).

В клубочках почечных телец из плазмы крови в процессе ультрафильтрации образуется первичная моча, изоосмотическая с плазмой крови. Поры, через которые фильтруется плазма, имеют эффективный средний диаметр 2,9 нм. При таком размере пор все компоненты плазмы крови с молекулярной массой (М) до 5 кДа свободно

проходят через мембрану. Вещества $M < 65$ кДа частично проходят через поры, и только крупные молекулы ($M > 65$ кДа) удерживаются порами и не попадают в первичную мочу. Так как большинство белков плазмы крови имеют достаточно высокую молекулярную массу ($M > 54$ кДа) и заряжены отрицательно, они удерживаются гломерулярной базальной мембраной и содержание белков в ультраfiltrате незначительно.

Реабсорбция

Первичная моча концентрируется (примерно в 100 раз по сравнению с исходным объемом) за счет обратной фильтрации воды. Одновременно по механизму активного транспорта в канальцах реабсорбируются практически все низкомолекулярные вещества, особенно глюкоза, аминокислоты, а также большинство электролитов (неорганических и органических ионов). Реабсорбция аминокислот осуществляется с помощью группспецифичных транспортных систем (переносчиков), с дефектом которых связан ряд генетически обусловленных наследственных заболеваний (цистиноз, глицинурия, синдром Хартнупа).

Принцип метода: В основе работы тест-полосок лежат методы сухой химии. Полоски предназначены для полуколичественного определения компонентов мочи по результатам цветных и ферментативных реакций в толще полоски.

Интенсивность окраски тестовой области полоски сравнивается с цветовой шкалой для каждого компонента.

Оборудование и реагенты:

- 1) Тест-полоски;
- 2) Свежесобранная моча;

- 3) Цветовые шкалы для показателей на этикетке контейнера для тест-полосок.

Ход работы

1. Погрузить полоску в мочу на 1-2 секунды так, чтобы намочить все тестовые области.
2. Удалить излишек мочи с полоски проведя ею по краю емкости с мочой.
3. Держать полоску горизонтально в течение 1-2 минут.
4. Сравнить цвета всех тестовых областей полоски с соответствующими цветовыми шкалами на этикетке контейнера. Сравнение должно проводиться не позднее, чем через 2 минуты! Цвет на краях тестовых областей не учитывается.

Компонент мочи	Принцип метода	Результат	Норма	Клинико-диагностическое значение
1. Удельный вес	Ионный обмен между электролитом тестовой области и ионами, растворенными в моче, что вызывает изменение окраски индикатора .	Сине-зеленый цвет для низкой ионной силы до желто-коричневого цвета для концентрированной мочи.	$\geq 1,018$ для утренней мочи. Удельный вес зависит от концентрации растворенных в моче веществ.	Очень высокие и низкие цифры плотности для утренней мочи требуют установления причины. Низкий удельный вес обычно связан с полиурией, а высокий чаще бывает при глюкозуриях.

<p>2. Нитриты</p>	<p>Реакция Грисса: сульфаниламид тетрагидробен -зохинолином реагируют с продуктами метаболизма энтеробактерий .</p>	<p>Любая степень окраски в оранжево- розовый цвет свидетельствует о присутствии не менее 10^5 микроорганизмов в 1 мл мочи</p>	<p>$< 10^3$ микроорганизмов в мл мочи</p>	<p>Определенная степень бактериурии указывает на наличие воспалительного процесса. Отрицательный результат не исключает бактериурии и может говорить об инфицировании бактериями, не содержащими нитратредуктазы</p>
-----------------------	---	--	---	--

3. рН	Двойной индикатор: метиловый красный и бромтимоловый синий	Диапазон окраски от оранжевого через желтый и зеленый до синего, что соответствует рН от 5 до 9.	рН свежей мочи находится в диапазоне 5-6	При смешанной пище в организме образуются кислые продукты обмена. Кислотность увеличивается при сахарном диабете, туберкулезе почек и почечной недостаточности. Щелочная реакция мочи характерна при рвоте, приеме щелочных лекарств, хронической инфекции мочевыводящих путей
4. Белок/альбумин	Сдвиг рН индикатора тетрабромфенолового синего, чувствительный к альбумину	При выраженной протеинурии окраска соответствует содержанию белка > 0,3 г/л	Ниже порога чувствительности теста	Белок в моче появляется при усиленном распаде белка тканей, при гемолизе, при патологии почек, при воспалении мочевыводящих путей.

<p>5. Глюкоза</p>	<p>Ферментативный глюкозоокси- дазный метод, специфичный для глюкозы</p>	<p>Зеленоватый оттенок тестовой области свидетельствует о небольших количествах глюкозы в моче</p>	<p>Глюкозурия до 0,2 г/л не обнаруживается</p>	<p>Появление глюкозы в моче зависит от ее концентрации в крови, от фильтрационной способности почек и от реабсорбционных процессов в канальцах нефрона. Глюкоза появляется также при раздражении ЦНС, гипертиреозе, патологии печени. Глюкозурия может иметь алиментарную и лекарственную причины.</p>
-----------------------	--	--	--	--

6.Кетоны	Взаимодействие ацетона и ацетоуксусной кислоты с нитропруссидом натрия в щелочной среде (тест Легалья)	При наличии кетонов образуется комплекс фиолетового цвета. Красное окрашивание может быть вызвано наличием фталеиновых соединений	Отсутствуют в моче	Появление кетонов в моче может быть вызвано физиологическим стрессом (голодание, беременность, спорт), но чаще наблюдается при диабете и свидетельствует о неправильном пищевом режиме.
----------	--	---	--------------------	---

7. Уробилиноген	Реакция связывания уробилиногена стабилизированными солями диазония	Желтая окраска тестовой области с последующим переходом в зелено-голубой цвет	1,7-30 мкмоль/л	Паталогическая концентрация уробилиногена – характерный симптом поражения паренхимы печени (гепатиты, цирроз), гемолитических состояний и заболеваний кишечника (энтериты, запоры, кишечная непроходимость). Полное отсутствие говорит о нарушении поступления желчи в кишечник.
8. Билирубин	Связывание билирубина со стабилизированными солями диазония в сильноокислой среде	Желто-оранжевая окраска тестовой области	Отсутствует в моче	Следовые количества билирубина свидетельствуют о ранних заболеваниях печени и нарушении оттока желчи и требуют дальнейшего обследования.

Клинико-диагностическое значение: Тест-полоски предназначены для скрининговых исследований мочи в целях диагностики диабета, заболеваний печени, гемолитических болезней, урогенитальной и почечной патологии, а также нарушений метаболизма и кислотно-щелочного баланса.

Сделать **вывод** относительно полученных результатов.

1. Функция почек. Основное назначение почек. Процесс мочеобразования.
2. Моча: общие сведения. Органические и неорганические составляющие мочи.
3. Экскреция протонов и аммиака.
4. Реабсорбция электролитов и воды.

Лабораторная работа № 10

Тема: «Цветные реакции на белки и аминокислоты. Реакции осаждения и денатурации белков»

Теоретическая часть

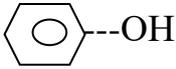
Белки - полимерные соединения, построенные из аминокислот, которые соединены между собой пептидными связями. Аминокислоты - это производные карбоновых кислот, у которых три валентности α -углеродного атома всегда заняты одним атомом водорода (-H), аминогруппой (-NH₂) и карбоксильной группой (-COOH). Четвертая валентность может быть занята атомом водорода (глицин) или группировкой атомов, называемой радикалом (-R). В составе радикалов многие аминокислоты имеют реакционно-способные (функциональные) группы, например сульфгидрильную -SH (цистеин), тиометильную -S-CH₃ (метионин), гидроксильную -OH (серин, треонин, тирозин).

А. Цветные реакции на белки и аминокислоты

К цветным реакциям относятся универсальные реакции (биуретовая на пептидные связи и нингидриновая на α -аминокислоты) и специфические, обусловленные присутствием в белках остатков определенных аминокислот. По результатам специфических реакций можно судить о пищевой ценности белков.

Таблица 2 - Реакции окрашивания, обусловленные наличием определенных химических группировок

№	Название реакции	Реактив	Окрашивание	На какие группы действует
1	Ксантопротеиновая	$\text{HNO}_{3\text{конц}}$	Желтое	бензольное кольцо/ гетероцикл в составе АК – фен, тир
2	Фоля		Серо- черное	При щелочном гидролизе «слабосвязанная <u>S</u> » в <u>цистеине</u> и <u>цистине</u> отщепляется $\rightarrow \text{H}_2\text{S} +$ щелочь $\rightarrow \text{K}_2\text{S}/\text{Na}_2\text{S} +$ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \rightarrow \text{PbS}\downarrow$
3	Адамкевича	+ глиоксиловая кислота, $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{конц}}$	Красно- фиолетовое	Индольные группировки - три
4	Нингидриновая	при $\uparrow t^0\text{C}$ в щел. среде нингидрина + - 1° аминогр. (- NH_2)	Сине- фиолетовое	АК и амины
		- 2° аминогр. (=NH)	Желтое	Иминокислоты - пролин и оксипролин
5	Биуретовая	CuSO_4	Фиолетовое или красно- фиолетовое	Пептидная связь -CO-NH-

6	Миллонова	Миллонов реактив (водный р-р металлической Hg в HNO ₃)	Вишневое окрашивание	Фенольные группировки 
---	-----------	--	-------------------------	---

Цель работы

Провести цветные реакции с двумя растворами (I и II)*, один из которых содержит овальбумин (яичный белок), а другой - желатин (овальбумин содержит все 20 аминокислот, а желатина только 17), и определить, в каком растворе - овальбумин, а в каком - желатин.

Принцип метода

Ряд химических реактивов специфически взаимодействуют с функциональными группами аминокислот (как свободных, так и в составе пептидов или белков), в результате чего развивается специфическое окрашивание. Такие реакции называют **цветными реакциями**. Интенсивность окраски в цветных реакциях пропорциональна количеству реагирующих функциональных групп. Поэтому цветные реакции могут быть использованы для качественного и количественного определения белков, для определения присутствующих в них аминокислот или для анализа состава белков. Например:

* Растворы I и II готовятся лаборантом по указанию преподавателя (белок одного куриного яйца разводят в 300 мл дистиллированной воды, фильтруют; используют 1%-ный раствор желатины).

1. с помощью биуретовой реакции определяют наличие пептидных групп в олигопептидах и в белках (универсальная реакция для любых белков);

2. с помощью нингидриновой реакции определяют наличие α-аминогрупп в свободных аминокислотах, а также в аминокислотах олигопептидов и белков (универсальная реакция для любых белков);

3. с помощью ксантопротеиновой реакции определяют наличие в белках ароматических аминокислот;

4. с помощью реакции Фоля определяют наличие в составе белков серосодержащей аминокислоты - цистеина.

Выполнение работы

Реакция	Номер пробирки	Ход работы	Окраска	Чем обусловлена реакция
Биуретовая	1	Раствор I - 5 капель, 10%-ный раствор NaOH - 5 капель, 1%-ный раствор CuSO ₄ - 1 капля		
	2	Раствор II - 5 капель, 10%-ный раствор NaOH - 5 капель, 1%-ный раствор CuSO ₄ - 1 капля		
Нингидриновая	1	Раствор I - 5 капель, 1%-ный раствор нингидрина в ацетоне - 2 капли; нагревают		
	2	Раствор II - 5 капель, 1%-ный раствор нингидрина в ацетоне - 2 капли; нагревают		
Ксантопротеиновая	1	Раствор I - 5 капель, HNO ₃ (конц.) - 3 капли; осторожно нагревают		

	2	Раствор II - 5 капель, HNO ₃ (конц.) - 3 капли; осторожно нагревают		
Фоля	1	Раствор I - 5 капель, 30%- ный раствор NaOH - 5 капель, 5%-ный раствор (CH ₃ COO) ₂ Pb - 1 капля; нагревают до кипения		
	2	Раствор II - 5 капель, 30%- ный раствор NaOH - 5 капель, 5%-ный раствор (CH ₃ COO) ₂ Pb - 1 капля; нагревают до кипения		

Указанные цветные реакции можно проводить на четырех предметных стеклах*: на один край каждого стекла наносят 1 каплю раствора I, на другой - 1 каплю раствора II.

Биуретовая реакция. К белкам на первом стекле последовательно добавляют 1 каплю 10%-ного раствора NaOH и 1 каплю 1%-ного раствора CuSO₄, аккуратно перемешивая стеклянной палочкой.

Нингидриновая реакция. К белкам на втором стекле добавляют 1 каплю раствора нингидрина, перемешивают и осторожно нагревают до кипения.

Ксантопротеиновая реакция. К белкам на третьем стекле добавляют 1 каплю концентрированной HNO₃, перемешивают и осторожно нагревают.

Реакция Фоля. К белкам на четвертом стекле добавляют 1 каплю 30%-ного раствора NaOH и 1 каплю 5%-ного раствора (CH₃COO)₂Pb. Нагревают до кипения.

* Параллельно преподаватель проводит демонстрационный опыт в пробирках, результаты которого студенты используют для оформления таблицы.

Самостоятельное формулирование выводов

Б. Реакции осаждения и денатурации белков

Существуют белки растворимые и нерастворимые в воде. Коллоидные растворы белков относительно устойчивы. Эта устойчивость обусловлена тем, что белковые молекулы имеют одинаковый электрический заряд и упакованы так, что на их поверхности находится большое количество гидрофильных полярных групп. Вследствие этого вокруг белковой молекулы формируется плотная многослойная водная оболочка, называемая *гидратной оболочкой*. Гидрофобные радикалы аминокислот упрятаны внутрь глобулы.

Изменение зарядов белковых молекул и/или снятие гидратной оболочки приводит к агрегации белковых молекул и выпадению их в осадок. При нагревании молекулы белков денатурируют, т.е. теряют свою нативную структуру, разворачиваются, но остаются во взвешенном состоянии, что проявляется в помутнении разбавленного белкового раствора.

Реакции осаждения белков используют для экспресс-обнаружения белка в биологических жидкостях (например, в моче), для получения безбелковых растворов (например, при выделении ДНК из животных тканей), при разделении белковых фракций в процессе выделения и очистки белков.

Цель работы

Провести реакции осаждения белка (в работе используют раствор овальбумина), применяя различные воздействия.

Принцип метода

Для осаждения белка нужно лишить его стабилизирующих факторов: снять заряд, удалить гидратную оболочку или разрушить третичную структуру (вызвать денатурацию), используя различные химические реагенты или нагревание.

Выполнение работы

	Реакция осаждения белка	Ход работы*	Наблюдения	Чем обусловлена реакция
1	Нагреванием	В пробирку вносят 10 капель раствора яичного белка (см. предыдущую работу), нагревают		
2	Концентрированными минеральными кислотами (азотная кислота)	В пробирку вносят 20 капель HNO ₃ (конц.), наклоняют пробирку под углом 45° и осторожно по стенке наслаивают на кислоту 20 капель раствора белка. Смотрят на просвет, перемешивают		
	Реакция осаждения белка	Ход работы*	Наблюдения	Чем обусловлена реакция
3	Органическими кислотами [трихлоруксусная кислота (ТХУ)]	В пробирку вносят 10 капель раствора белка, добавляют 5 капель 10%-ного раствора ТХУ, перемешивают		
4	Солями тяжелых металлов [сульфат меди(II)]	В пробирку вносят 5 капель раствора белка, прибавляют 1 каплю 7%-ного раствора CuSO ₄ , перемешивают		
5	Солями	В пробирку вносят 5 капель раствора белка, прибавляют 2		

тяжелых металлов (нитрат серебра)	капли 1%-ного раствора AgNO ₃ , перемешивают		
6 Органическими растворителями (ацетон)	В пробирку вносят 10 капель белка, прибавляют 20 капель ацетона, перемешивают		

*Если вместо пробирок используют предметные стекла, то на стекло наносят по 1 капле каждого требуемого реактива и перемешивают стеклянной палочкой.

Пояснение

1. Нагревание вызывает денатурацию белка, сопровождающуюся помутнением раствора.

2. Минеральные и органические кислоты вызывают дегидратацию и перезарядку части белковых молекул, сопровождающуюся их денатурацией.

3. Соли тяжелых металлов вызывают денатурацию белка, что обусловлено адсорбцией ионов металлов на поверхности белковой молекулы и образованием нерастворимого комплекса.

4. Органические растворители снимают гидратную оболочку и понижают устойчивость белка в растворе, но осадок выпадает только в нейтральных и слабокислых растворах. Длительное действие органического растворителя вызывает денатурацию белка.

Самостоятельное формулирование **ВЫВОДОВ**

Вопросы для самоконтроля:

1. Характеристика белковых веществ. Элементарный состав белка. Значение белков для организма: белки - ферменты, белки - гормоны, структурные белки, белки - рецепторы, транспортные белки, антитела.

2. Физико-химические свойства белков: молекулярный вес, методы его определения. Диализ.

3. Физико-химические свойства белков: растворимость и содержание белков в растворах. Денатурация белков. Использование процесса денатурации в медицине.

4. Белки как амфотерные электролиты. Поведение белков в электрическом поле. Электрофорез. Применение его во врачебной практике. Изоэлектрическая точка белков.

5. Методы выделения, разделения и очистки индивидуальных белков.

Список литературы:

1. Биохимия [Электронный ресурс]: учебник / под ред. Е. С. Северина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 768 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970433126.html>
2. Биохимия [Электронный ресурс]: учебник / под ред. Е. С. Северина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 768 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427866.html>
3. Биологическая химия с упражнениями и задачами [Электронный ресурс]: учебник / под ред. С.Е. Северина - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014.-624 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970430279.html>
4. Биологическая химия. Ситуационные задачи и тесты [Электронный ресурс]: учебное пособие / А. Е. Губарева [и др.]; под ред. А. Е. Губаревой. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 528 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970435618.html>
5. Биохимия с упражнениями и задачами [Электронный ресурс]: учебник / Северин Е.С. и др. / под ред. Е.С. Северина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 384 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970417362.html>
6. Биохимия. Руководство к практическим занятиям [Электронный ресурс]: учебное пособие / Н.Н Чернов и др.; под ред. Н.Н. Чернова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 240 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970412879.html>
7. Клиническая биохимия: учебное пособие / под ред. В.А. Ткачука. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 264 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970407332.htm>
8. Вавилова Т.П. Биологическая химия в вопросах и ответах [Электронный ресурс]: учебное пособие / Т.П. Вавилова, О.Л. Евстафьева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 128 с. – ЭБС

СОДЕРЖАНИЕ

Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории	4
Лабораторные работы	7
Лабораторная работа № 1.	7
Лабораторная работа № 2.	12
Лабораторная работа № 3.	17
Лабораторная работа № 4.	24
Лабораторная работа № 5.	29
Лабораторная работа № 6.	38
Лабораторная работа № 7.	43
Лабораторная работа № 8.	50
Лабораторная работа № 9.	58
Лабораторная работа № 10.	56
Список литературы	76