

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

**МЕТОДИЧЕСКОЕ УКАЗАНИЕ
к лабораторным занятиям по биологической химии
для студентов 3 курса**

Ташкент – 2021

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор по учебно-воспитательной
работе, профессор

З.А.Юлдашев



май 2021г.

МЕТОДИЧЕСКОЕ УКАЗАНИЕ

к лабораторным занятиям по биологической химии
для студентов курса образовательного направления
5510500«Фармация (по отраслям)»

Ташкент -2021

Составитель:

А.Н.Максудова – доцент кафедры органической и биологической химии,
кандидат биологических наук

Рецензенты:

З.Т.Файзиева – доцент кафедры фармакологии и клинической фармации,
доктор медицинских наук

З.А.Хушбактова – ведущий научный сотрудник отдела фармакологии и
токсикологии ИХРВ АН РУз, доктор биологических наук

Методическое пособие разработано на основе учебной программы и
обсуждено на заседании кафедры №23 4 мая 2021г. и рекомендовано к
утверждению.

Зав.каф., проф, д.х.н.



Каримов А.

Методическое пособие обсуждено на заседании № 10 специализированного
методического совета 10 мая 2021г. и рекомендовано к утверждению.

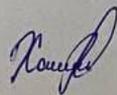
Председатель совета



Султонова Р.Х.

Методическое пособие обсуждено и утверждено на заседании ЦМК
института (протокол № 10 от «25» мая 2021 г.).

Секретарь ЦМК



С.Р.Хаджиметова

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение в биологическую химию. Способы выделения белков из тканей и биологических жидкостей.
2. Простые и сложные белки. Методы количественного определения белков.
3. Структурно-функциональная организация ферментов. Механизм действия ферментов. Определение активности амилазы методом Вольгемута.
4. Кинетика ферментативной реакции. Специфичность действия ферментов. Регуляция активности ферментов
5. Структурная организация нуклеиновых кислот. Реакции на структурные компоненты нуклеопротеидов.
6. Метаболизм белков. Методы количественного определения ДНК и РНК.
7. Биоэнергетика и метаболизм. Определения активности сукцинатдегидрогеназы мышц.
8. Структура и функция дыхательной цепи. Механизм окислительного фосфорилирования. Определение активности цитохромоксидазы.

ИНФОРМАЦИОННАЯ ЧАСТЬ.

При составлении настоящего методического пособия было подобрано такие лабораторные работы, которые направлены на усвоение содержания курса, регламентированного учебной программой. Знания в процессе обучения усваиваются в результате активной самостоятельной деятельности студентов. Выполнение лабораторных работ одна из возможных форм такой деятельности. Студент обучается ясно формулировать задачи и выбирать способы их решения, овладевает умением провести эксперимент и объяснить его результаты.

Структура лабораторных работ включает следующие компоненты: лабораторная работа, выполнение методов педагогической технологии и текущий контроль, самостоятельная работа студентов.

Цель проведения лабораторных работ: на основании знания реакционной способности органических молекул сформировать умение и навыки выполнения качественных реакций на функциональные группы, получение отдельных представителей различных классов органических соединений, проведение с ними характерных реакций, что способствует глубокому усвоению теоретического материала.

Студенты приобретают практические навыки работы с органическими веществами, химической посудой и приборами.

На первом занятии студенты обязательно знакомятся с правилами техники безопасности, с оказанием первой помощи при ожогах и отравлениях и оформляют в журнале инструктаж.

Лабораторная работа выполняется каждым студентом индивидуально. С целью экономии аудиторного времени студент дома, используя учебник для лабораторных работ, заранее частично заполняет протокол работы.

На кафедре принята следующая форма протокола, который заполняют на развернутом листе тетради.

N	Название опыта	Схема реакции	Условия реакции (t ⁰ , катализатор, и.т.д.)	Наблюдаемый результат опыта (изм. окраски, выделение газа, появление осадка)	Вывод
1	2	3	4	5	6

Графы 1,2,3,4 заполняются дома при подготовке к занятию, а графы 5 и 6 - после выполнения опыта. Особое внимание следует обратить на заполнение шестой графы. Правильный, хорошо продуманный вывод, с элементами обобщения, сделанный на основе проведенной реакции, свидетельствует о сознательном и глубоком усвоении учебного материала.

Полностью оформив протокол, студент защищает работу. Преподаватель оценивает каждого студента к концу занятия и объявляет рейтинговый балл.

Выполнив и защитив указанное в плане количество лабораторных работ по отдельным темам, студент допускается к сдаче контрольных работ.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №1

Тема: Введение в биологическую химию. Способы выделения белков из тканей и биологических жидкостей.

Цель обучения: Сформировать у студентов представление о предмете и задачах биологической химии и молекулярной биологии, специфике биохимических лабораторий и особенностях работы с биологическим материалом, а также о методах выделения и очистки белков. Обучить методике выполнения цветных реакций на белки и аминокислоты.

Целевые задачи: концу занятия студент должен уметь:

- применять правила безопасности при работе в биохимической лаборатории;
- объяснять меры по оказанию первой помощи;
- работать с основной и дополнительной литературой и учебно-методическими разработками кафедры;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы.

Основные этапы занятия: Правила работы в биохимических лабораториях. Техника безопасности. Гомогенизация, ультрацентрифугирование и экстракция биологического объекта. Подготовка полученного экстракта к исследованию.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний:

1. Предмет и задачи биологической химии.
2. Живые системы, их характеристика. Биохимия и молекулярная биология, теоретические и практические аспекты.
3. Объекты биохимических исследований и методы биохимии и молекулярной биологии.
4. Место биохимии и молекулярной биологии среди биологических дисциплин и ее роль в формировании мировоззрения.

5. Белки – важнейшие компоненты живых организмов. Содержание белков в тканях.
6. Аминокислотный состав белков; строение пептидов.
7. Какова содержание и распределение белков в организме?
8. Какое соединение является структурными мономерами белков?
9. Чем отличаются протеиногенные аминокислоты от непротеиногенных?
10. Можно ли с помощью дистиллированной воды экстрагировать миозин из мышечной ткани?
11. Какое свойство казеина используют для выделения этого белка из молока?
12. Почему приходится применять неодинаковые методические приёмы для выделения разных белков?

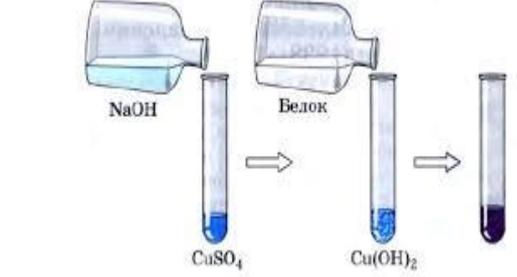
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

Лабораторная работа №1 Экстракция мышечной ткани.

Принцип работы: Экстракция основана. Миофибриллы мышечной клетки содержат сократительные белки (миозин и актин) и регуляторные белки (тропомиозин и тропонин). Белки миофибрилл не растворяются в воде, но их можно экстрагировать из мышечной ткани солевыми растворами с концентрацией соли 0,5 моль/л. Многие белки саркоплазмы (гиалоплазмы мышечных клеток) растворимы в воде или в солевых растворах низкой концентрации (0,05 моль/л). При экстракции мышечной ткани 5% раствором хлорида калия извлекаются как миофибриллярные, так и саркоплазматические белки.

Реактивы	Оборудование
Навеска мышечной ткани; 5%-ный раствор хлорида калия (KCl); 10%-ный раствор NaOH; 1%-ный раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.	Ступка фарфоровая с пестиком; воронка; стакан стеклянный с носиком на 1 л; фильтры бумажные; колба; центрифуга K23.

№	Процесс
1	<p>Взвесить 2 г мышечной ткани. Поместить в фарфоровую ступку, добавить 2 мл 5%-ного раствора KCl и растереть песком до гомогенного состояния.</p> 

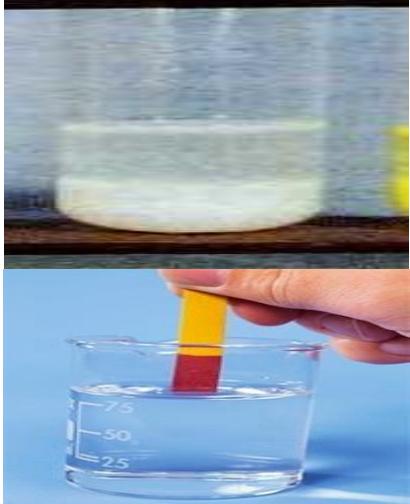
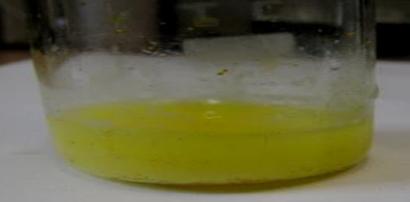
2	К гомогенату добавить 3 мл раствора KCl и растереть 5 мин, затем прибавить еще 5 мл 5%-ного раствора KCl. Растереть 5 мин.	
3	Полученный гомогенат профильтровать через два слоя марли или центрифугировать в течение 15 мин при 4000 об/мин.	
4	С фильтратом проделать биуретовую реакцию: вставить воронку с фильтратом в пробирку и добавить 1 мл 10%-ного раствора NaOH и 1 каплю 1%-ного раствора сульфата меди.	 <p data-bbox="954 920 1220 947">Рис. 77. Биуретовая реакция</p>

Лабораторная работа № 2 Выделение казеина из молока.

Принцип работы: В молоке содержится специфический белок казеин содержащий фосфор; 0% всех белков молока приходится на долю казеина. Этот белок обладает кислыми свойствами и находится в молоке в виде растворимой кальциевой соли. При подкислении казеин выпадает в осадок в виде белых рыхлых хлопьев, которые фильтрованием легко отделить от раствора.

	Реактивы	Оборудование
	HCl , 1%-ный раствор; H ₂ O дистиллированная; NaOH, 10%-ный раствор ; HNO ₃ , концентрированный раствор; лакмусовая бумажка; молибденовый реактив; CuSO ₄ , 1%-ный раствор	Химические стаканы вместимостью 50 мл, мерные цилиндры вместимостью 10мл; стеклянные палочки и воронка; бюретка; фильтры бумажные; пробирки с обратным холодильником; штативы с пробирками; песчаные бани.
№	Процесс	

1	В химический стакан емкостью 50 мл отмеряют мерной пробиркой 3 мл молока и 7 мл дистиллированной воды.	
2	К смеси постепенно, слегка перемешивая, добавляют 10-15 капель 1% раствора соляной кислоты до начала образования рыхлого осадка. (Кислоту добавлять аккуратно по каплям, так как в избытке ее осадок казеина растворяется!)	
3	Для удаления кислоты в стакан наливают 10 мл дистиллированной воды, перемешивают и через 5 минут жидкость осторожно сливают с осадка.	
4	К осадку еще раз приливают 10 мл дистиллированной воды, содержимое стакана осторожно перемешивают и через 5 минут фильтруют через бумажный фильтр.	
5	Осадок с фильтра переносят стеклянной палочкой в колбочку	
6	Небольшую часть осадка оставляют на фильтре приливают 10 капель 10%-ного раствора NaOH и 1 каплю 1%-ного раствора сульфата меди.	
7	Наблюдают устойчивое сине-фиолетовое окрашивание.	

8	В колбочку приливают 6 мл 10% раствора гидроксида натрия, присоединяют обратный холодильник и нагревают на песочной бане в течение 1 часа.	
9	К охлажденному гидролизату добавляют 20-30 капель концентрированной азотной кислоты слабокислой реакции на лакмус. При нейтрализации выпадает осадок высокомолекулярных продуктов неполного гидролиза казеина.	
10	После отстаивания жидкость фильтруют.	
11	К 10 каплям фильтрата добавляют 1 мл 10% щелочи и 1 каплю 1% раствора сульфата меди;	
12	Наблюдают устойчивое сине-фиолетовое окрашивание.	
13	К 0,5 мл фильтрата добавляют 1 мл молибденового реактива доводят до кипения и кипятят несколько минут.	
14	Окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок.	

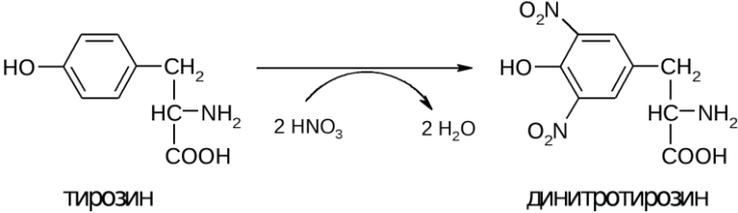
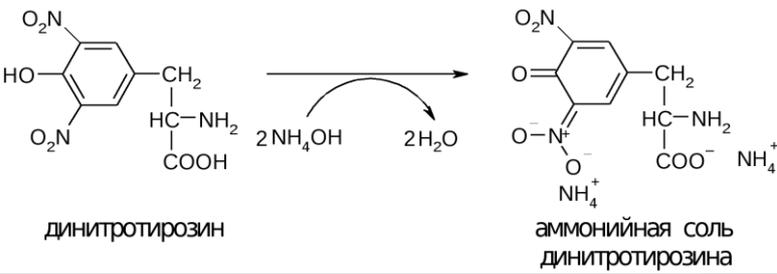
Лабораторная работа №3 Качественные реакции на аминокислоты.

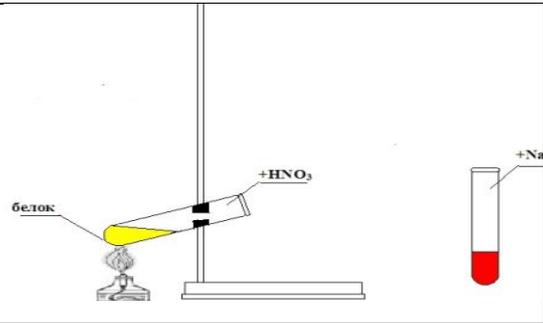
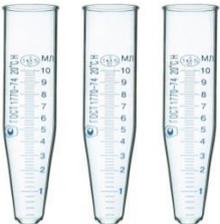
Принцип работы: Цветные реакции основаны на образовании окрашенных продуктов при взаимодействии белков с некоторыми химическими веществами и обусловлены присутствием в молекуле белка той или иной аминокислоты. Эти реакции дают возможность не только обнаружить наличие белка в растворе, но и выявить присутствие отдельных аминокислот в молекуле белка. На основе некоторых цветных реакций разработаны методы количественного определения белка и аминокислот.

Реактивы	Оборудование
<p>CuSO_4 „ 1%-ный раствор; гидроксид натрия , 10% и 30%-ный растворы; азотная кислота, концентрированный раствор; аммиак, концентрированный раствор; тирозин, 0,1%-ный раствор; ледяная уксусная кислота; серная кислота концентрированный раствор; ацетат свинца, 5%-ный раствор; α-нафтол, 0,1%-ный спиртовой раствор; гипобромид натрия.</p>	<p>Штативы с пробирками, пипетки , газовые горелки, водяные бани.</p>

№	Процесс
	Биуретовая реакция
	<p>(Пиотровского) Обусловлена наличием пептидных связей в молекуле белка. Для пептидной (амидной) группы характерна кето-енольная (лактам-лактимная) таутомерия. При добавлении сернокислой меди к сильнощелочному раствору белка образуются комплексные соединения меди с пептидными группировками, окрашенные в фиолетовый цвет. При этом преобладающие в щелочной среде енольные формы пептидных связей образуют ковалентные связи с ионом меди за счет водорода енольного гидроксила, а координационные – за счет электронных пар атомов азота иминных групп. Биуретовую реакцию дают все соединения, содержащие в молекуле две и больше двух близкорасположенных пептидных связей, например, биурет $\text{NH}_2\text{--CO--NH--CO--NH}_2$ (продукт конденсации двух молекул мочевины), оксамид $\text{NH}_2\text{--CO--CO--NH}_2$.</p>
1	<p>В одну добавляют 5 капель разбавленного яичного белка, во вторую – 5 капель раствора желатина, в третью – 5 капель раствора миозина</p>



2	В каждую пробирку прибавляют 5 капель 10%-ного раствора NaOH и по 1 капле 1%-ного раствора сульфата меди.	
3	Во всех пробирках наблюдают устойчивое сине-фиолетовое окрашивание	
Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)		
<p>Обусловлена присутствием в молекуле белка ароматических аминокислот. При нагревании этих аминокислот с концентрированной азотной кислотой образуются их нитропроизводные, окрашенные в желтый цвет.</p> <div style="text-align: center;">  <p>тирозин динитротирозин</p> </div> <p>Нитропроизводные аминокислот в щелочной среде образуют соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет:</p> <div style="text-align: center;">  <p>динитротирозин аммонийная соль динитротирозина</p> </div>		
1	В одну пробирку наливают 5 капель раствора яичного белка, во вторую 5 капель раствора желатина, в третью 5 капель раствора миозина.	

2	<p>Затем во все пробирки добавляют по 3 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятят. В первой и третьей пробирках образуется белый осадок, который при нагревании окрашивается в желтый цвет и постепенно растворяется, сообщая желтую окраску раствору.</p>	
3	<p>После охлаждения в каждую пробирку добавляют приблизительно 10 капель концентрированного аммиака или 30%-ного раствора щелочи NaOH. Желтое окрашивание растворов переходит в оранжевое вследствие образования натриевой соли динитротирозина.</p>	
<p>Реакция Фоля</p>		
<p>Обусловлена присутствием в белке серосодержащих аминокислот, которые при кипячении со щелочью теряют серу в виде сульфида натрия. Сульфид натрия с ацетатом свинца в щелочной среде дает черно-коричневое окрашивание.</p>		
1	<p>В одну пробирку наливают 10 капель раствора яичного альбумина, во вторую 10 капель раствора миозина, в третью 10 капель раствора желатины.</p>	
2	<p>Затем во все пробирки добавляют по 20 капель 10 %-ного раствора NaOH и осторожно кипятят в течение 3 мин.</p>	
3	<p>Затем прибавляют по 1 капле 5 %-ного раствора уксуснокислого свинца. Жидкость в пробирках с яичным белком и миозином темнеет так как образуется черный осадок сульфида свинца. В пробирке с желатином черного осадка не образуется так как желатин не содержит серосодержащих аминокислот.</p>	

ТЕСТЫ ПО ТЕМЕ:

1. Белки это:

- А. высокомолекулярные азотсодержащие вещества
- Б. вещества, состоящие из аминокислот
- В. вещества, имеющие сложную структурную организацию
- Г. вещества, имеющие пептидную связь
- Д. все ответы верны

2. Какой из указанных аминокислот относится к редким протеиногенным аминокислотам?

- А. триптофан
- Б. аланин
- В. гидроксипролин
- Г. гистидин
- Д. цистеин

3. Какой из указанных аминокислот относится к непротеиногенным?

- А. лизин
- Б. фенилаланин
- В. лейцин
- Г. орнитин
- Д. валин

4. Структурная классификация аминокислот обусловлено:

- А. по степени незаменимости аминокислот для организма
- Б. по кислотно - основным свойствам аминокислот
- В. по строению бокового радикала
- Г. стереоизомерии аминокислот
- Д. нет правильного ответа

5. Электрохимическая классификация аминокислот обусловлено:

- А. по степени незаменимости аминокислот для организма
- Б. по кислотно - основным свойствам аминокислот
- В. по строению бокового радикала
- Г. стереоизомерии аминокислот
- Д. нет правильного ответа

6. Биологическая классификация аминокислот обусловлено

- А. по степени незаменимости аминокислот для организма
- Б. по кислотно - основным свойствам аминокислот
- В. по строению бокового радикала
- Г. стереоизомерии аминокислот
- Д. нет правильного ответа

7. Какая реакция является характерной для пептидной связи?

- А. Фоля
- Б. ксантопротеиновая
- В. Миллона
- Г. биуретовая
- Д. Сакагучи

8. К незаменимым аминокислотам относится:

- А. метионин
- Б. аргинин
- В. пролин
- Г. серин

Д. глицин

9. Укажите белковой природы вещества, выполняющие ферментативную функцию?

А. Инсулин

Б. транскортин

В. цитохромоксидаза

Г. гистон

Д. иммуноглобулин

10. Укажите белковой природы вещества, выполняющие гормональную функцию?

А. Инсулин

Б. транскортин

В. цитохромоксидаза

Г. гистон

Д. иммуноглобулин

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 2

Тема: Простые и сложные белки. Методы количественного определения белков.

Цель обучения: Сформировать знания о структуре белков, умение проводить реакции осаждения белков и объяснять их механизмы. Сформировать знания о структурной организации белков.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- освободить раствор белка от низкомолекулярных веществ;
- уметь осаждать белки, используя различные методы;
- разделить белки способом высаливания;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы;

Основные этапы занятия: Приготовление простого диализатора, смесь высокомолекулярного и низкомолекулярного вещества, создавать среды с различными рН.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Основные особенности пептидной связи. Образование пептидной связи.
2. Качественные реакции на пептидную связь.
3. Строение белков. Связи, образующие первичную структуру белка. Особенности пептидной связи.
4. Вторичная структура белков. Связи, образующие вторичную структуру белка. Укажите основные особенности α -спирали.
5. Третичная структура белков. Связи, стабилизирующие третичную структуру белка.
6. Четвертичная структура белков. Стабилизация четвертичной структуры белков. Принципиальное отличие четвертичной структуры от низших

уровней структурной организации белка. Взаимодействие между субъединицами стабилизирующие четвертичную структуру

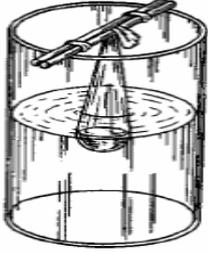
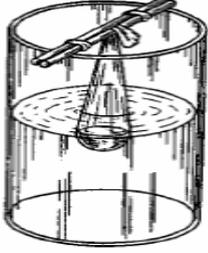
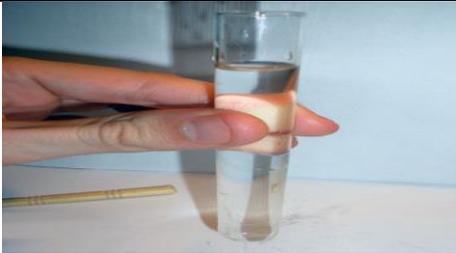
7. Физико-химические свойства белков: белки как амфотерные макромолекулы, коллоидно-осмотические свойства белков.
8. Нарушение пространственной структуры белка. Денатурация и ренатурация. Обратимая и необратимая денатурация белков. Денатурирующие факторы.
9. Функциональная классификация белков
10. Классификация белков по структурным признакам.
11. С помощью каких методов можно освободить раствор белка от низкомолекулярных веществ?
12. Как доказать что при диализе белок останется в целлофаном мешочке, а ионы соли находятся в диализирующей жидкости?
13. Какие реакции вызывают денатурацию?
14. Какова роль нахождения изоэлектрической точки для индивидуальных белков?

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

Лабораторная работа №4 Диализ белков.

Принцип работы: Очень удобным методом очистки белковых растворов от низкомолекулярных примесей, например от избытка солей после высаливания, является диализ. Диализом называется процесс разделения высоко- и низкомолекулярных веществ с помощью полупроницаемых мембран (целлофан, коллодий, пергамент и др.). Молекулы белка, обладающие большими размерами и молекулярной массой, не способны проникать через такие мембраны, в то время как низкомолекулярные вещества легко проходят через них

<i>Реактивы</i>		<i>Оборудование</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄ насыщенный раствор, BaCl ₂ , 5%-ный раствор; CuSO ₄ , 1%-ный раствор; NaOH, 10% -ный раствор		стаканы вместимостью 100мл; целлофан в виде квадратов 150 x 150 мм; стеклянные палочки; резиновые колечки; штатив с пробирками; пипетки с делениями.
№	Процесс	
1	В пробирку наливают 2 мл 3% раствора яичного альбумина и добавляют 1 каплю насыщенного раствора сульфата аммония.	

2	Из листа целлофана, предварительно намоченного дистиллированной водой, делают мешочек и выливают в него содержимое пробирки. Края мешочка прикрепляют к середине стеклянной палочки (или зажимают между двумя стеклянными палочками, соединенными друг с другом резиновыми колечками).	 <p>Рис. 1. Диализ белка.</p>
3	Мешочек помещают в стакан с дистиллированной водой так, чтобы стеклянная палочка легла на края стакана. Уровень жидкости в мешочке должен быть ниже уровня жидкости в стакане.	 <p>Рис. 1. Диализ белка.</p>
3	Через 1 час после начала диализа жидкость, находящуюся в стакане, проверяют на присутствие белка и сульфат-анионов: а) Проба на белок. С 1 мл жидкости из стакана проделывают биуретовую реакцию.	
4	б) Проба на сульфат-анионы. К 1 мл жидкости из стакана добавляют 3-4 капли 5% раствора хлорида бария и наблюдают образование осадка сульфата бария в виде белой мути.	
5	Целлофановый мешочек вынимают из стакана. Жидкость из мешочка переливают в пробирку и проделывают биуретовую реакцию.	

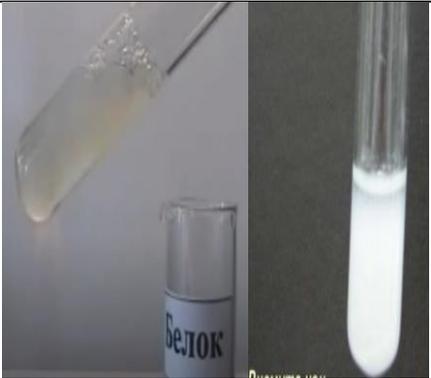
Лабораторная работа № 5. Реакции осаждения белков

Принцип работы: Растворимость белков в воде определяется наличием гидрофильных групп (несущих заряд или незаряженных) в аминокислотах, входящих в состав белка. Имеют также значение наличие у молекул одноименного суммарного заряда и форма молекул.

Воздействия, влияющие на гидратацию заряд или форму белковых молекул, изменяют и растворимость.

Реактивы		Оборудование
1 %-ный яичный белок , 96%-ый спирт или ацетон; натрий хлорид, 10%-ый раствор, концентрированная азотная кислота, 1%-ный белок, 10%-сульфосалициловая кислота, 10%-ной пикриновой кислоты, 1%-ной уксусной кислоты, 5% раствор железистосинеродистого калия, 5%-ного раствора уксуснокислого свинца, уксусная кислота, 1%- ный и 10%-ный растворы; NaOH, 10%- ный раствор; NaCl, насыщенный раствор.		штатив с пробирками, пипетка, газовая горелка
№	Процесс	
1. Осаждение белка органическими растворителями		
1	К 5 каплям 1% раствора яичного (пшеничного или соевого) белка прибавляют 20-25 капель 96° этилового спирта или ацетона. Раствор мутнеет.	
2	Добавляют 1 каплю насыщенного раствора хлористого натрия. При стоянии выпадает осадок белка	
2. Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами		
<p>Белок при взаимодействии с концентрированными минеральными кислотами денатурируется и выпадает в осадок вследствие дегидратации и нейтрализации зарядов коллоидных частиц. При длительном воздействии серная и соляная кислоты производят частичный гидролиз белка и осадок постепенно растворяется. В азотной кислоте растворение осадка белка происходит значительно медленнее. Реакция осаждения белка концентрированной азотной кислотой получила широкое применение в лабораторной практике для обнаружения белка в биологических жидкостях (проба Геллера).</p>		
1	В пробирку наливают 10-15 капель концентрированной азотной кислоты и,	

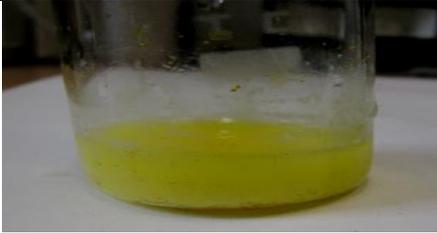
	<p>наклонив её под углом 45°, осторожно, по стенке пробирки, спускают из пипетки равный объём 1% раствора какого-либо белка.</p>	 
2	<p>На границе двух слоев жидкости образуется осадок белка в виде тонкой плёнки.</p>	
3	<p>То же можно проделать, взяв вместо азотной кислоты концентрированную серную или соляную кислоту.</p>	
<p>3. Осаждение белка некоторыми органическими кислотами</p>		
<p>При добавлении к раствору белка трихлоруксусной или сульфосалициловой кислоты белок выпадает в осадок. Реакции осаждения белка органическими кислотами получили широкое практическое применение. Так, трихлоруксусная кислота применяется в микрохимических количественных анализах для получения безбелковых фильтратов; сульфосалициловая кислота широко используется в клинических лабораториях для обнаружения белка в моче, экссудатах и других биологических жидкостях (чувствительность реакции 0,0015%).</p> <p>Следует иметь в виду, что трихлоруксусная кислота осаждает только белки и не осаждает высокомолекулярных продуктов распада белка – пептонов. Сульфосалициловая кислота осаждает не только белки, но и высокомолекулярные пептоны и полипептиды.</p>		

1	К 5 каплям 1% раствора яичного (пшеничного или соевого) белка добавляют 1-2 капли 10% раствора сульфосалициловой кислоты. Выпадает осадок белка.	
2	К 5 каплям 1% раствора яичного (пшеничного или соевого) белка добавляют 1-2 капли 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Выпадает осадок белка.	

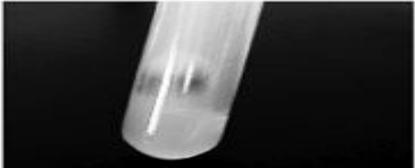
1. Осаждение белка алкалоидными реактивами

При добавлении к раствору белка растворов так называемых алкалоидных реактивов (пикриновой кислоты, танина, железисто-синеродистой кислоты и некоторых других веществ) белок выпадает в осадок. Реакция обусловлена наличием в белке азотистых гетероциклических группировок, аналогичных тем, которые находятся в молекулах алкалоидов (пиррольные, индольные, имидазольные и др.). слабое подкисление раствора уксусной кислоты способствует появлению положительного заряда на частице белка и облегчает взаимодействие белка с отрицательно заряженными ионами осадителя. Сильные минеральные кислоты, применяемые при гидролизе белка, подавляют диссоциацию органических кислот и препятствуют осаждению белка алкалоидными реактивами.

1	В 3 пробирки наливают по 5 капель 1% раствора яичного (пшеничного или соевого) белка.	
2	В первую пробирку прибавляют 2-3 капли 10% раствора пикриновой кислоты и 1-2 капли 1% уксусной кислоты. Выпадает осадок белка, окрашенный в жёлтый цвет.	

3	<p>Во вторую пробирку прибавляют 1-2 капли насыщенного раствора танина и 1-2 капли 1% уксусной кислоты. Выпадает осадок белка, окрашенный в серый цвет.</p>	
4	<p>В третью пробирку приливают 1 каплю 10% уксусной кислоты и 2-3 капли 5% раствора железистосинеродистого калия. Выпадает осадок белка.</p>	
<p>6. Осаждение белка солями тяжёлых металлов</p>		
<p>Белки при взаимодействии с солями тяжёлых металлов (Cu, Fe, Pb, Zn, Ag и др.) образуют нерастворимые в воде комплексные соединения (чаще всего с группами SH). При добавлении избытка соли осадок белка растворяется. Это явление носит название адсорбционной пептизации и обусловлено адсорбцией ионов тяжёлого металла на поверхности коллоидных частиц и появлением положительного заряда на частицах белка.</p>		
1	<p>К 5 каплям 1% раствора яичного (пшеничного или соевого) белка прибавляют 1 каплю 5% раствора хлорного железа или 5% раствора уксуснокислого свинца или 7% раствора сернокислой меди. Выпадает осадок белка.</p>	
2	<p>К другой такой же порции раствора белка прибавляют вначале 1 каплю раствора соли тяжёлого металла, а затем – ещё 5-10 капель и наблюдают за растворением осадка (пептизация).</p>	
2	<p>К 5 каплям 1% раствора белка прибавляют 1 каплю 5% раствора азотнокислого серебра. Выпадает осадок белка, который не растворяется в избытке реактива (отличие от других солей тяжёлых металлов). При очень малых</p>	

	<p>концентрациях белка осаждение солями тяжёлых металлов может не произойти, так как ионы металла могут оказаться в избытке и произвести пептизацию.</p>	
<p>7. Осаждение белков при нагревании.</p>		
1	<p>В пять пробирок наливают по 0,5 мл раствора яичного белка.</p>	
2	<p>Содержимое первой пробирки нагревают и наблюдают появление опалесценции (помутнение раствора).</p>	
3	<p>К раствору яичного белка во второй пробирке добавляют осторожно одну каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты, нагревают и наблюдают вначале появления опалесценции, а при дальнейшем нагревании выпадение белого хлопьевидного осадка белка. Это объясняется тем, что белок теряет заряд и находится в изоэлектрическом состоянии.</p>	
4	<p>К раствору яичного белка в третьей пробирке добавляют 1-2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают.</p>	
5	<p>Осадок при этом не образуется, так как частицы белка перезаряжаются, приобретают положительный заряд.</p>	
6	<p>К раствору яичного белка в четвертой пробирке добавляют 1 -2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты, 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают.</p>	

7	Выпадает белый осадок, так как происходит нейтрализация заряда на частицах белка	
8	К раствору яичного белка в пятой пробирке добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок не образуется, так как положительный заряд на частицах белка усиливается.	

Ситуационные задачи:

1. Как суммарный заряд белка влияет на его растворимость?

а) определите суммарный заряд пептида при рН 7

Ала-Глу-Тре-Про-Асп-Лиз-Цис

б) как изменяется заряд этого пептида при рН больше и меньше 7?

в) что такое изоэлектрическая точка белка (ИЭТ) и в какой среде лежит ИЭТ данного пептида?

г) при каком значении рН будет наблюдаться наименьшая растворимость данного пептида.

2. Смесь аминокислот, содержащая валин, лейцин, аспарагиновую кислоту, лизин, гистидин, серин была подвергнута фракционированию методом электрофореза на бумаге при рН=6,2. Какие аминокислоты будут перемещаться к катоду, аноду или останутся на линии старта?

ТЕСТЫ ПО ТЕМЕ:

1. Как называется метод очистки белка основанное на неспособности его проходить через полупроницаемые мембраны?

А. диализ

Б. электрофорезом

В. высаливанием

Г. аффинная хроматография

Д. гельфльтрация

2. Изоэлектрическая точка белка не зависит от:

А. присутствия в растворе ионов солей

Б. концентрации белка

- В.аминокислотного состава белка
- Г.количества NH₂- и COOH-групп.
- Д. структурной организации белка

3. На чем основан метод гелефильтрации:

- А.различиях молекулярной массы
- Б.различиях величин заряда
- В.различиях растворимости
- Г.гелеобразование
- Д.количества NH₂- и COOH-групп.

4.Денатурация белка сопровождается:

- А.разрывом ковалентных связей
- Б.изменением конформации белка
- В.уменьшением растворимости белка
- Г. нарушением связывания белка с лигандом
- Д. Нарушением первичной структуры белка

5. Разделение белков в электрическом поле называется:

- А.электрофорез
- Б.изоэлектрическая точка
- В.высаливанием
- Г.диализ
- Д.гельфильтрация

6.Белки денатурируют в клетке в результате:

- А.Повышения температуры
- Б.Изменения рН
- В. Действия протеолитических ферментов
- Г.Разрыва слабых связей, поддерживающих конформацию белка
- Д.Синтеза белков теплового шока

7. Амфотерность белкам придают:

- А.кисотно-основные группы боковых радикалов
- Б.неполярные группы боковых радикалов
- В.незаменимые аминокислоты
- Г.нет правильного ответа
- Д.наличие заменимых аминокислот

8. Высаливание белка это процесс:

- А.осаждение белков нейтральными солевыми растворами
- Б.способность белков переходить через полупроницаемые мембраны
- В.зависимость скорости седиментации молекул под действием центробежной силы
- Г.скорость движения белков в электрическом поле
- Д.потеря биологической активности

9. В какой последовательности будут выходить из колонки при гелефильтрации на сефадексе белки со следующими молекулярными массами?

1) иммуноглобулин А – 500 000; 2) фибриноген 330 000; 3) трансферрин – 75 000; 4) ретинол-связывающий белок – 24 000; 5) транскортин – 55 000?

- А.1,2,3,4,5
- Б.2,4,3,5,1
- В.1,3,5,4,2

Г.3,4,5,1,2

Д.5,4,1,2,3

10. Установите все возможные соответствия между факторами денатурации и повреждаемыми связями и взаимодействиями

- | | |
|---|--------------------------------------|
| 1. Неорганические кислоты (концентрированные) | А. водородные связи |
| 2. Спирты | Б. гидрофобные взаимодействия |
| 3. Температура > 60°C | В. ионные связи |
| | Г. ковалентные связи |
| | Д. электростатические взаимодействия |
| | Е. координационные связи |

ТРЕНИНГ «БУМЕРАНГ»*

I – группа

Методы осаждения белков.

II – группа

Современные методы выделения и очистки белков.

III – группа

Физико-химические свойства белков.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 3

**Тема: Структурно-функциональная организация ферментов.
Механизм действия ферментов. Определение активности амилазы
методом Вольгемута.**

Цель обучения: Сформировать знания о структуре ферментов, сравнение влияния неорганических и биологических катализаторов на активность фермента. Определить амилазную активность слюны. Определить активность тирозиназы.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- производить сбор слюны;
- приготовить ферментные препараты различной концентрации;
- проводить цветные реакции на субстрат и на продукт реакции;
- определить активность тирозиназы;

- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы;

Основные этапы занятия: Гидролиз крахмала с помощью соляной кислоты. Ферментативное расщепление крахмала амилазой. Метод определения амилазной активности по Вольгемуту.

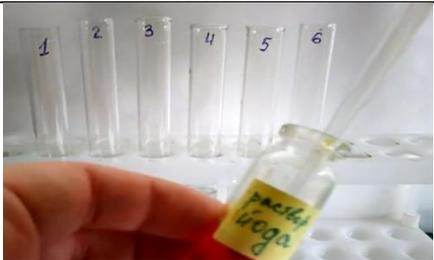
Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Какова химическая природа ферментов?
2. Каковы общие свойства ферментов?
3. Что такое апофермент и кофермент?
4. Что называется проферментом?
5. Строение ферментов. Активный центр ферментов, состав, формирование, роль. Функциональные группы аминокислот, входящих в его состав.
6. Структура и биологическое роль коферментов: ТПФ, НАД и НАДФ, ФАД и ФМН, ФП, биотин, ТГФК, КоА. Участие коферментов в метаболизме.
7. Кофакторы ферментов: ионы металлов (на примере карбоксипептидазы А) амилазы и нуклеотидные кофакторы: УТФ, ЦТФ, ГТФ, АТФ.
8. Особенности ферментативного катализа. Виды специфичности
9. Механизм действия ферментов.
10. По какому принципу классифицируются ферменты?
11. По каким признакам можно судить о действии фермента?
12. Какие существуют методы количественного определения ферментативной активности?

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

Лабораторная работа № 6. Количественное определение активности амилазы по методу Вольгемута

Принцип работы: Метод определения амилазной активности по Вольгемуту относится к «пороговым». Он основан на определении минимального «порогового» количества фермента, которое способно при определенных условиях опыта расщепить 1 мл 0,1% раствора крахмала. Это минимальное количество фермента принимают за единицу амилазной активности. Амилазная активность слюны (амилокластическая сила слюны – А) выражается количеством миллилитров 0,1% раствора крахмала, которое может расщепить 1 мл неразведенной слюны при температуре 38° в течение 30 минут. В норме амилазная активность слюны равна 160-320. Метод Вольгемута широко используется в клинической практике для определения амилазной активности крови и мочи.

Реактивы		Оборудование
<p>Слюны (наклонив голову, приоткрывают рот, подносят пробирку к нижней губе и собирают слюну), дист. вода, 0,1% раствора хлористого натрия, 0,1% раствора крахмала, 1% раствора йода</p>		<p>Стакан, штатив с пробирками; пипетки с делениями, бюретка</p>
№	Процесс	
1	<p>Заготавливают 2 ряда из 6 одинаковых пронумерованных пробирок. В каждую пробирку наливают из бюретки по 1 мл дистиллированной воды. В первую пробирку первого ряда добавляют из пипетки 1 мл слюны, разведенной в 10 раз. Содержимое первой пробирки перемешивают путем троекратного вытягивания и выпускания жидкости из пипетки, и 1 мл смеси переносят во вторую пробирку. Содержимое второй пробирки перемешивают тем же способом и 1 мл смеси переносят в третью пробирку и т.д.; из шестой пробирки 1 мл смеси выбрасывают. Таким же образом производят разведение слюны во втором ряду пробирок. В каждом ряду получают разведение фермента в 20, 40, 80 раз и т.д.</p>	
2	<p>Во все пробирки первого ряда добавляют по 1 мл воды, в пробирки второго ряда – по 1 мл 0,1% раствора хлористого натрия. Во все пробирки добавляют из бюретки по 2 мл 0,1% раствора крахмала (начиная с последних, где концентрация фермента наименьшая).</p>	
3	<p>Содержимое перемешивают и пробирки помещают в водяную баню при температуре 38° на 30 минут.</p>	
4	<p>Через 30 минут пробирки вынимают и доливают почти доверху водопроводной водой, добавляют по 1 капле 1% раствора йода и содержимое пробирок перемешивают.</p>	
		

5	Жидкость в пробирках окрашивается в желтый, красный и синий цвет. Желтое окрашивание свидетельствует о полном расщеплении крахмала. В каждом ряду отмечают наибольшее разведение слюны, при котором произошло полное расщепление крахмала, и рассчитывают амилазную активность в отсутствие и в присутствии NaCl.	
---	---	--

Результаты работы по определению амилазной активности фиксируют в форме таблицы.

Определение амилазной активности слюны по Вольгемуту

<i>№ пробирки</i>	1	2	3	4	5	6	<i>Амилазная активность</i>
<i>Разведение слюны</i>	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	<i>расчет</i>
<i>Окраска при добавлении йода, ряд без добавления NaCl</i>							
<i>Окраска при добавлении йода, ряд с добавлением NaCl</i>							

Выводы:

Примечание. Окраска обозначается буквами Ж – желтая, Ор – оранжевая, Кр – красная, Ф – фиолетовая, С – синяя.

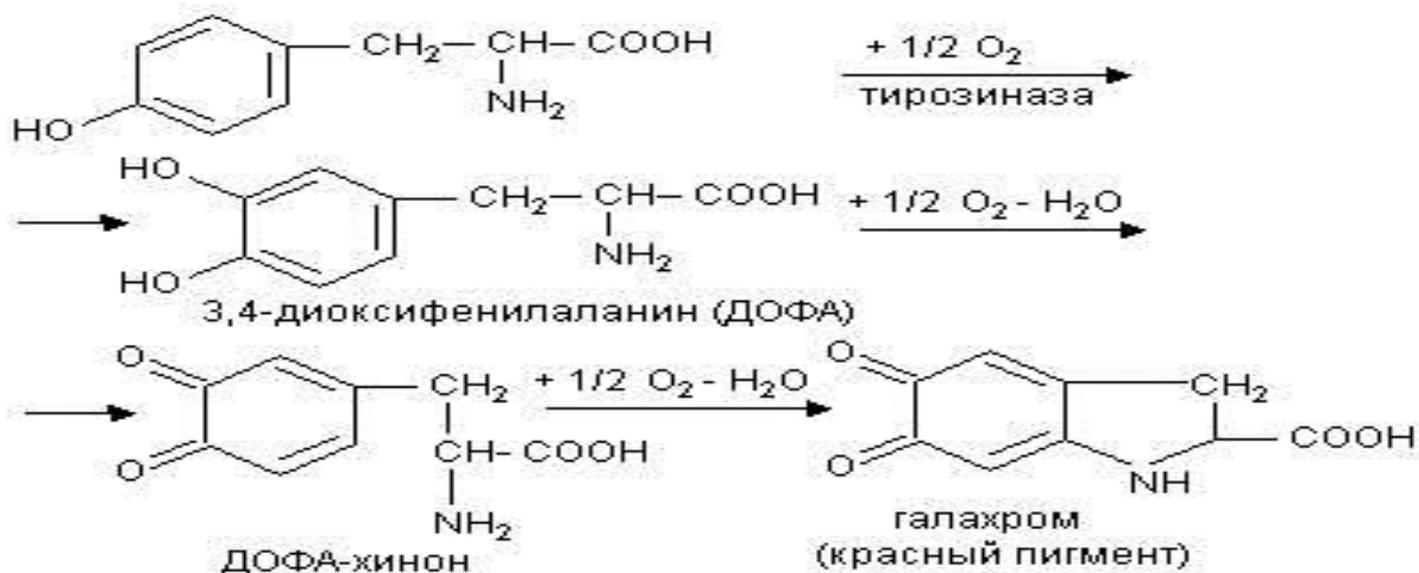
Амилокластическую силу слюны выражают количеством миллилитров 0,1% раствора крахмала, которое может расщепить 1 мл неразведенной слюны в данных условиях опыта, т.е. первом ряду третья пробирка окрашена в желтый цвет. Она содержит слюну в разведении 1/80. Это количество слюны способно расщепить 2 мл 0,1% раствора крахмала, а 1 мл слюны в тех же условиях расщепит:

$$X = \frac{2 * 80}{1} = 160$$

Амилокластическая сила слюны в присутствии хлористого натрия выразится несколько большей величиной (в 2-4 раза).

Лабораторная работа № 7. Определение активности тирозиназы

Принцип работы: Под влиянием фермента тирозиназы окисление тирозина приводит к образованию окрашенных соединений хиноидного типа. Тирозин сначала окисляется до диоксифенилаланина (ДОФА), а затем – до ДОФА-хинона.



Реактивы		Оборудование
дистиллированная вода, картофель, раствор тирозина 0,1 %		электроплитка, водяная баня, термостат, терка, ступка, марля
№	Процесс	
1	Для получения ферментного препарата сырой картофельный клубень очищают от кожуры, верхние слои клубня в количестве 2,0-4,0 г кусочками нарезают в ступку	
2	Растирают с 10 мл дистиллированной воды и фильтруют через два слоя марли. Допускается для лучшего измельчения потереть картофель на терке.	
3	Растирают с 10 мл дистиллированной воды и фильтруют через два слоя марли. Допускается для лучшего измельчения потереть картофель на терке.	

4	В две пробирки отмеряют по 1 мл полученного фильтрата: содержимое одной пробирки (контрольной) кипятят 1-2 мин и охлаждают водопроводной водой. В обе пробирки добавляют по 1,0 мл 0,1 % раствора тирозина, содержимое пробирок перемешивают и помещают на водяную баню при температуре 30°C.	
5	Время от времени пробирки энергично встряхивают для лучшего соприкосновения с воздухом. Постепенно в одной пробирке под действием тирозиназы раствор темнеет за счет образования продуктов окисления тирозина типа меланинов.	

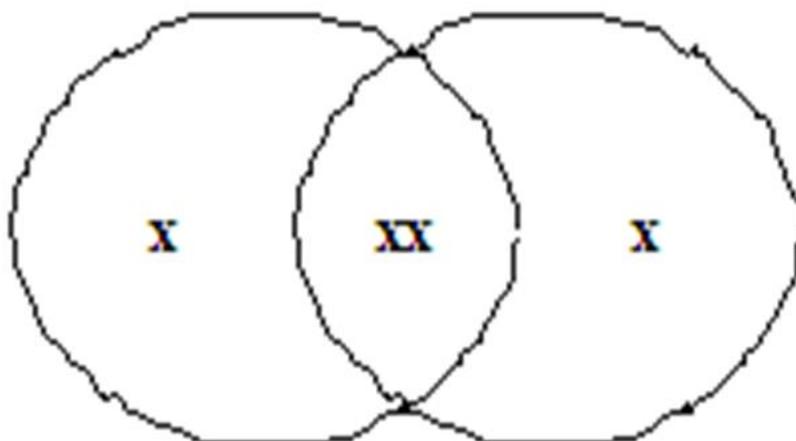
Ситуационные задачи:

1. Амилаза слюны расщепляет гликоген только до дисахарида. Какого? К какому классу ферментов относится амилаза? Какой фермент надо использовать для дальнейшего расщепления дисахарида? Как можно обнаружить продукты расщепления данного дисахарида?
2. При заболеваниях внутренних органов – сердца и печени – наряду с другими биохимическими показателями исследуют активность изоферментов ЛДГ (лактатдегидрогеназы). Объясните, почему? К какому классу относится этот фермент? Какой тип реакций он катализирует?

Покажите сходство и различие между ферментами и неферментными катализаторами

ДИАГРАММА

ВЕННА



ТЕСТЫ ПО ТЕМЕ:

1. Фермент это:

- А.небиологический катализатор
- Б. металл
- В. биологический катализатор
- Г. регулятор

2. Подобрать соответствующие пары вопрос –ответ:

- 1. Оксидоредуктазы
- 2. Трансферазы
- 3. Гидролазы
- 4. Изомеразы
- 5. Лиазы
- 6. Лигазы

- А. окисления-восстановления
- Б. перенос различных групп от одного субстрата к другому
- В. разрыв связей в субстратах с присоединением воды
- Г. превращение в пределах одной молекулы
- Д. соединения двух молекул с использованием энергии фосфатной связи
- Е. разрыв связей в субстратах без присоединения воды

3. Как называется белковая часть сложного фермента?

- А. холофермент
- Б. кофактор
- В. кофермент
- Г. апофермент

4. Как называется небелковая часть сложного фермента?

- А. кофактор
- Б. апофермент
- В. хиломикрон
- Г. холофермент

5. Апофермент с кофактором, объединяясь, дает активную молекулу фермента, которая называется:

- А. хиломикрон
- Б. холофермент
- В. апофермент
- Г. кофактор

6. Аллостерический центр фермента:

- А. регуляторный центр, который в молекуле фермента пространственно разделен с активным центром
- Б. функциональные группы в активном центре фермента
- В. кофактор
- Г. кофермент

7. Аллостерические эффекторы

- А. не вызывает изменений в структуре фермента
- Б. влияют на связывание и превращение субстрата в активном центре фермента, изменяя его конфигурацию
- В. денатурация фермента
- Г. нет правильного ответа

8. $E+S \leftrightarrow ES$ это:

- А. комплекс фермент- субстрат
- Б. комплекс фермент- продукт
- В. комплекс фермент-ингибитор
- Г. комплекс фермент-гормон

9. $E+S \leftrightarrow ES \leftrightarrow ES^* \leftrightarrow ES^{} \leftrightarrow EP \leftrightarrow E+P$ это:**

- А. уравнение механизма действия ферментов
- Б. комплекс фермент-медиатор
- В. комплекс фермент-ингибитор
- Г. комплекс фермент-гормон

10. $E+S \leftrightarrow ES$ } I стадия; $ES^* \leftrightarrow ES^{} \leftrightarrow EP$ } II стадия; $E+P$ } III стадия**

На какой стадии снижается энергия активации субстрата.

- А. II стадия
- Б. I стадия
- В. III стадия
- Г. не меняется

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Тема: Кинетика ферментативной реакции. Специфичность действия ферментов. Регуляция активности ферментов

Цель обучения: Сформировать знания о факторах влияющих на скорость ферментативной реакции, о специфичности ферментов; регуляции активности ферментов, действию активаторов и ингибиторов.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- производить сбор слюны;
- приготовить ферментные препараты различной концентрации;
- приготовить ферментативный препарат сахаразы;
- проводить ферментативные и цветные реакции на субстрат и на продукт реакции;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы.

Основные этапы занятия: Создание разных температурных режимов, препаратов с различной концентрации ферментов, приготовление растворов активаторов и ингибиторов.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Перечислите основные факторы, влияющие на скорости ферментативной реакции.

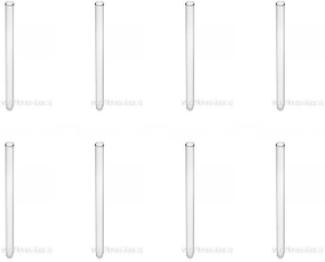
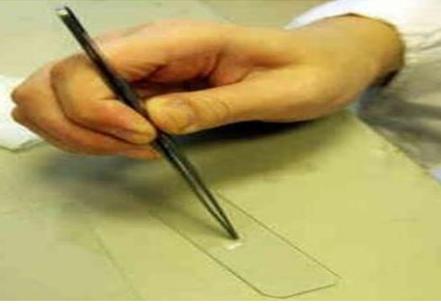
2. Каков характер зависимости скорости ферментативной реакции от температуры, рН, концентрации субстрата, концентрации фермента? Объясните причины изменения скорости реакции при изменении перечисленных факторов.
3. Чем обусловлено изменение активности фермента при изменении рН среды? Как определить оптимум рН для действия фермента?
4. Почему для сравнения ферментативной активности разных препаратов нужно проводить реакцию в одинаковых условиях?
5. Какие условия рекомендуется соблюдать при количественном изменении ферментов?
6. При каких условиях достигается максимальная скорость ферментативной реакции?
7. Какую концентрацию субстрата называют насыщающей?
8. Чем обусловлено специфичность ферментов?
9. Перечислите виды специфичности.
10. К какому типу по специфичности относятся ферменты: аргиназа, амилаза, сахараза, уреазы?
11. Как на опыте убедиться в специфичности фермента?
12. Какое биологическое значение имеет специфичность ферментов?

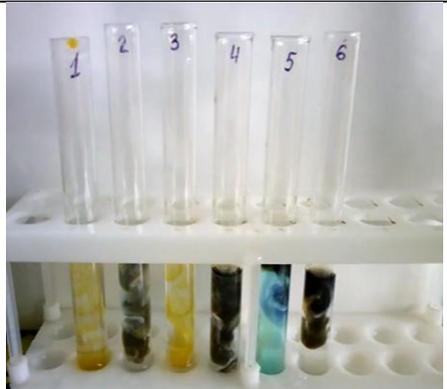
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

Лабораторная работа № 8. Влияние температуры на активность амилазы.

Принцип работы: Скорость химической реакции, как и любых других, увеличивается при повышении температуры. Но так как ферменты являются белками, повышение температуры может ускорить их денатурацию и привести к снижению скорости реакции. Расщепление крахмала амилазой можно наблюдать используя реакцию с иодом.

Реактивы		Оборудование
слюны (наклонив голову, приоткрывают рот, подносят пробирку к нижней губе и собирают слюну), 1%-ный раствор йода в KI; крахмал, 1%-ный раствор; дистиллированная вода.		пипетки; пробирки; термостат(40°C); водяная баня и баня со льдом; предметные стекла.
№	Процесс	

1	Наливают в четыре пробирки по 0,5 мл раствора крахмала. Еще в четыре пробирки наливают по 0,5 мл разбавленной (1:10) слюны.	
2	Берут первую пару пробирок (одна с ферментом, другая – с крахмалом) и помещают в баню со льдом.	
3	Вторую пару оставляют при комнатной температуре.	
4	Третью пару пробирок помещают в термостат (40°C)	
5	Четвертую – в кипящую водяную баню.	
6	Через 10 мин содержимое каждой пары пробирок сливают вместе, тщательно перемешивают и оставляют стоять еще 10 мин в тех же условиях.	
7	Из третьей пробирки отбирают 3 капли жидкости и прodelывают реакцию с каплей иода на стекле. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще 10 мин и после этого повторяют реакцию с иодом на стекле.	

8	Затем добавляют 2 капли раствора йода во все пробирки и наблюдают за появлением окрашивания.	
---	--	--

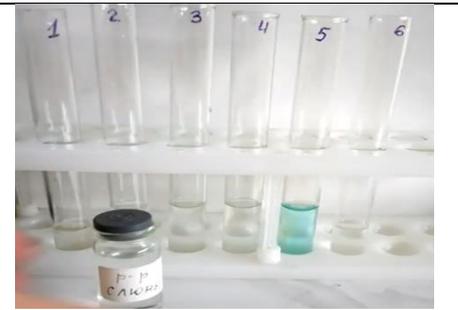
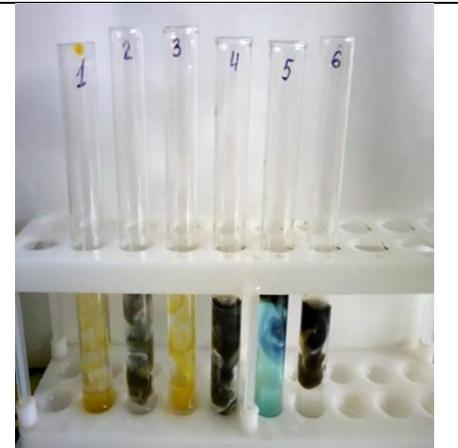
Результаты записывают в таблицу, делают выводы о характере влияния температуры на активность амилазы. Сравнивают результаты, полученные с разными образцами слюны.

№ пробирки	Температура инкубации, °С	Окрашивание с иодом
1	0	
2	20	
3	40	
4	100	

Лабораторная работа № 9. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

Принцип работы: В окружении различных веществ в клетке ферменты взаимодействуют не только с субстратами. При этом скорость превращения субстратов может увеличиваться или снижаться. Ионы хлора являются активаторами амилазы, соли тяжёлых металлов ингибитором фермента. Расщепление крахмала амилазой можно наблюдать используя реакцию с иодом.

Реактивы	Оборудование
слюны (наклонив голову, приоткрывают рот, подносят пробирку к нижней губе и собирают слюну). NaCl, 1%-ый раствор; сульфат меди (2), 1%-ый раствор; крахмал, 1%-ый раствор; 1%-ый раствор йода в йодиде калия; дистиллированная вода.	пробирки; пипетки вместимостью 1 мл, мерные цилиндры вместимостью 10 мл.
№	Процесс

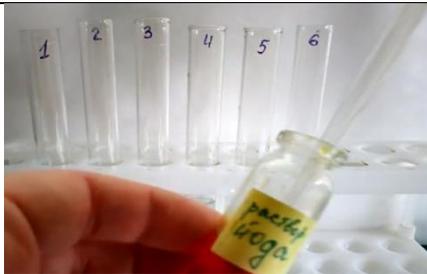
1	В одну пробирку вносят 10 капель дистиллированной воды, в другую – 8 капель воды и 2 капли 1%-ного раствора хлорида натрия, в третью - 8 капель воды и 2 капли 1%-ного раствора сульфата меди.	
2	В каждую пробирку добавляют по 20 капель разведенной (1:10) слюны, содержимое пробирки перемешивают, добавляют по 5 капель раствора крахмала и оставляют при комнатной температуре на 5 мин.	
3	Тем временем готовят три пробирки с водой (по 1 мл в каждой), подкрашенной каплей раствора йода, и добавляют в них по 2-3 капли содержимого опытных проб. Наблюдают окрашивание в зависимости от степени расщепления крахмала амилазой.	
4	В первой пробирке появляется фиолетовая или красно-бурая окраска, во второй пробирке, где ионы хлора играют роль активатора, появляется желтая окраска, а в третьей пробирке, где ионы меди тормозят действие амилазы, окраска остаётся синей. Если описанной картины не наблюдается, то опыт повторяют через 10-15 мин.	

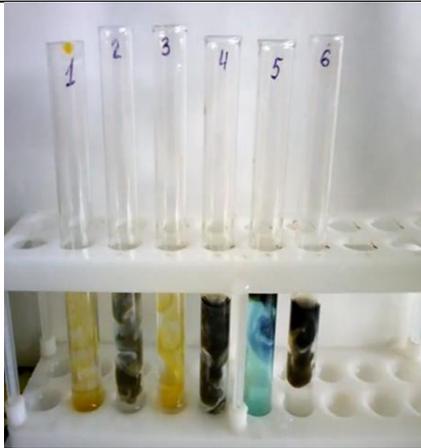
Результат вносят в таблицу:

Фермент	Субстрат	Время действия фермента (мин)	Окраска с йодом		
			Проба 1 (H ₂ O)	Проба 2 (NaCl)	Проба 3 (CuSO ₄)
Амилаза	Крахмал	5			
		10			

Лабораторная работа № 10. Специфичность действия сахарозы дрожжей.

Принцип работы: Фермент сахароза катализирует гидролитическое расщепление сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы. Действие сахарозы можно обнаружить по появлению в инкубационной среде свободной глюкозы, дающий положительную качественную реакцию. Троммера вследствие наличия в молекуле глюкозы свободного полуацетального гидроксила. Сахароза этой реакции не даёт так как полуацетальный гидроксил в ее глюкозном остатке участвует в соединении с фруктозой.

Реактивы		Оборудование
сахараза в сухих пекарских дрожжах крахмал, 1%-ный раствор; тростниковый сахар, 1%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфат меди (II), 1%-ный раствор; вода дистиллированная.		пробирки, пипетки вместимостью 2 мл; фарфоровые ступки; воронки; фильтры; термостат (37 °С); весы и разновес.
№	Процесс	
1	В одну пробирку вносят 10 капель дистиллированной воды, в другую – 8 капель воды и 2 капли 1%-ного раствора хлорида натрия, в третью - 8 капель воды и 2 капли 1%-ного раствора сульфата меди.	
2	В каждую пробирку добавляют по 20 капель разведенной (1:10) слюны, содержимое пробирки перемешивают, добавляют по 5 капель раствора крахмала и оставляют при комнатной температуре на 5 мин.	
3	Тем временем готовят три пробирки с водой (по 1 мл в каждой), подкрашенной каплей раствора йода, и добавляют в них по 2-3 капли содержимого опытных проб. Наблюдают окрашивание в зависимости от степени расщепления крахмала амилазой.	

4	<p>В первой пробирке появляется фиолетовая или красно-бурая окраска, во второй пробирке, где ионы хлора играют роль активатора, появляется желтая окраска, а в третьей пробирке, где ионы меди тормозят действие амилазы, окраска остаётся синей. Если описанной картины не наблюдается, то опыт повторяют через 10-15 мин.</p>	
---	---	---

Лабораторная работа № 11. Специфичность действия сахарозы дрожжей.

Принцип работы: Фермент сахаразы катализирует гидролитическое расщепление сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы. Действие сахаразы можно обнаружить по появлению в инкубационной среде свободной глюкозы, дающий положительную качественную реакцию Троммера вследствие наличия в молекуле глюкозы свободного полуацетального гидроксила. Сахараза этой реакции не даёт так как полуацетальный гидроксил в ее глюкозном остатке участвует в соединении с фруктозой.

Реактивы		Оборудование
сахаразы в сухих пекарских дрожжах крахмал, 1%-ный раствор; тростниковый сахар, 1%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфат меди (II), 1%-ный раствор; вода дистиллированная.		пробирки, пипетки вместимостью 2 мл; фарфоровые ступки; воронки; фильтры; термостат (37 °С); весы и разновес.
№	Процесс	
1	Для получения сахаразы из дрожжей навеску 0,5 г высушенных пекарских дрожжей тщательно растирают в ступке для разрушения дрожжевых клеток, затем добавляют 5 мл воды и растирают дрожжи с водой.	
2	Полученную суспензию фильтруют через складчатый фильтр. Фильтрат содержит фермент сахаразу.	



3	Берут две пробирки. Наливают по 1 мл сахарозы (фильрата). Затем в первую добавляют и 1 мл раствора сахарозы, во вторую 1 мл крахмала. Пробирки выдерживают в термостате 15 мин при 38 °С.	
4	К 5 каплям инкубационной смеси добавляют 10 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1-3 капли 1%-ного раствора сульфата меди(II) до появления не исчезающей мути.	
5	Жидкость перемешивают и нагревают до начала кипения. Выпадает красный осадок оксида меди(II) или желтый осадок гидроксида меди(I) вследствие окисления глюкозы и восстановления $\text{Cu}(\text{OH})_2$ до Cu_2O .	

Вопросы коллективного обсуждения

1-группа:

Кинетика ферментативных реакций.

2-группа:

Специфичность действия ферментов.

3- группа:

Регуляция активности ферментов

№		
1	Фермент	
2	Апофермент	
3	Кофактор	
4	Холофермент	

5	Активный центр	
6	Аллостерический фермент	
7	Аллостерический эффект	
8	Оксидоредуктазы	
9	Трансферазы	
10	Гидролазы	
11	Лиазы	
12	Изомеразы	
13	Лигазы	
14	Кофермент	
15	Конкурентный ингибитор	
16	Неконкурентный ингибитор	
17	Аллостерическое ингибирование	
18	Изоферменты	
19	Иммобилизованные ферменты	
20	Органоспецифические ферменты	

Заполните таблицу «Применение ферментов в медицине»

Основные разделы	Ферменты. Название	Примеры использования в медицинской практике
Диагностика		
Лечения		
Использование ферментов в качестве аналитических реактивов		

ТЕСТЫ ПО ТЕМЕ

1. Подобрать соответствующие пары вопрос-ответ:

1. Стереохимическая субстратная специфичность действия ферментов
2. Абсолютная субстратная специфичность действия ферментов
3. Абсолютная групповая субстратная специфичность действия ферментов
4. Относительная групповая субстратная специфичность действия ферментов
5. Относительная субстратная специфичность действия ферментов

- А. превращение только одного из возможных стереоизомеров субстрата
- Б. превращение одного субстрата
- В. превращение сходной группы субстратов
- Г. специфическое действие на отдельные связи определенной группы субстратов
- Д. превращение субстратов, принадлежащих к разным группам химических соединений

2. Гипотеза «ключа и замка» объясняет:

- А. соответствие субстрата к активному центру фермента
- Б. соответствие ингибитора к активному центру фермента
- В. соответствие медиатора к активному центру фермента
- Г. соответствие гормона к рецептору

3. Гипотеза «вынужденного соответствия» объясняет:

- А. соответствие субстрата к активному центру фермента
- Б. соответствие ингибитора к активному центру фермента
- В. соответствие медиатора к активному центру фермента
- Г. соответствие гормона к рецептору

4. Ингибитор фермента это:

- А. вещество, специфически снижающее активность фермента
- Б. кофермент
- В. кофактор
- Г. апофермент

5. Подобрать соответствующие пары вопрос-ответ:

1. Конкурентное ингибирование
2. Бесконкурентное ингибирование
3. Субстратное ингибирование
4. Аллостерическое ингибирование
5. Неконкурентное ингибирование

- А. торможение ферментативной реакции, вызванное связыванием с активным центром фермента ингибитора
- Б. торможение, связанное с влиянием ингибитора на каталитическое превращение
- В. торможение ферментативной реакции, вызванное присоединением ингибитора только к комплексу фермент-субстрат
- Г. торможение ферментативной реакции, вызванное избытком субстрата
- Д. отрицательные эффекторы, которые тормозят превращение субстрата, связываясь с регуляторным центром фермента

6. К полиферментным системам, которые могут закрепляться на биологической мембране и выстраиваться в цепь относятся:

- А. ферменты, участвующие в транспорте электронов и протонов и образовании энергии
- Б. ферменты цикла Кребса
- В. пальмитат синтетазный комплекс
- Г. ферменты гликолиза

7. Иммуобилизационные ферменты это:

- А. искусственно полученный комплекс фермента с нерастворимым носителем
- Б. ферменты, возникшие вследствие генетических различий в первичной структуре ферментного белка
- В. негенетически возникшие модификации одного и того же фермента
- Г. структурно-функциональная организация фермента

8. Множественные формы ферментов это:

- А. негенетически возникшие модификации одного и того же фермента
- Б. ферменты, возникшие вследствие генетических различий в первичной структуре ферментного белка
- В. искусственно полученный комплекс фермента с нерастворимым в воде носителем
- Г. структурно-функциональная организация фермента

9. Изоферменты это:

- А. ферменты, возникшие вследствие генетических различий в первичной структуре ферментного белка
- Б. негенетически возникшие модификации одного и того же фермента
- В. искусственно полученный комплекс фермента с нерастворимым в воде носителем
- Г. структурно-функциональная организация фермента

10. Иммуобилизационные ферменты получают путем:

- А. все ответы верны
- Б. физической адсорбции фермента на нерастворимом материале
- В. включением фермента в ячейки геля

- Г. ковалентным связыванием фермента с нерастворимым материалом
- Д. связыванием молекул фермента между собой с образованием нерастворимых полиферментных комплексов

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

Тема: Структурная организация нуклеиновых кислот. Реакции на структурные компоненты нуклеопротеидов.

Цель обучения: Сформировать знания о структуре нуклеиновых кислот. Гидролиз компонентов нуклеопротеидов, выделенных из дрожжей.

Целевые задачи : к концу занятия студент должен уметь:

- проводить экстракцию нуклеопротеидов из дрожжей;
- проводить гидролиз нуклеопротеидов ;
- провести качественные реакции на компоненты нуклеопротеида;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы.

Основные этапы занятия: Экстракция нуклеопротеида из дрожжей. Гидролиз нуклеопротеида и проведение качественных реакций на его компоненты.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. История открытия и изучения нуклеиновых кислот.
2. Химическая природа нуклеиновых кислот. Различия между ДНК и РНК
3. ДНК, виды, локализация в клетке, биологические функции .
4. Первичная и вторичная структура ДНК.
5. Структурная организация ДНК в хромосомах.
6. РНК, виды, локализация в клетке, биологические функции. Особенности структурной организации РНК: первичная и вторичная структуры.
7. Роль белков в структурной организации нуклеиновых кислот. Нуклеопротеины.
8. Структура хромосом. Строение рибосом эукариот.
9. Денатурация и ренатурация ДНК. Гибридизация нуклеиновых кислот: гибридизация ДНК-ДНК; ДНК-РНК.
10. Виды переноса генетической информации. Механизм репликации.
11. Механизм транскрипции. Посттранскрипционные изменения пре-РНК

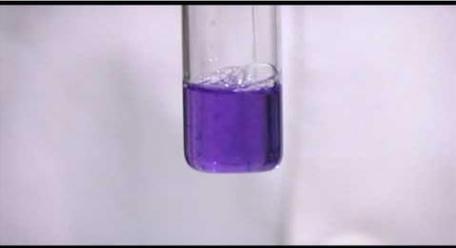
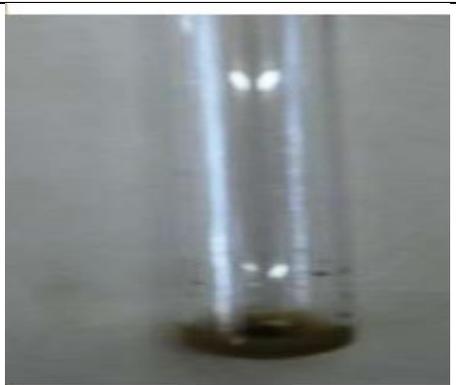
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

Лабораторная работа № 12. Реакция на компоненты нуклеопротеинов в гидролизе дрожжей

Принцип работы: Для качественного анализа химического состава нуклеопротеинов может быть использован гидролизат

дрожжей как объект, богатый нуклеопротеинами. При частичном гидролизе нуклеопротеины распадаются на белок (протамины или гистоны) и нуклеиновые кислоты. При полном гидролизе нуклеиновые кислоты распадаются на составляющие их компонентов. Продукты кислотного гидролиза нуклеопротеинов могут быть обнаружены специфическими реакциями: биуретовой реакцией обнаруживают наличие полипептидов в гидролизате, пуриновые основания дают специфическую реакцию образования осадка солей серебра, фосфорную кислоту обнаруживают по реакции с молибдатом аммония, рибозу или дезоксирибозу - с помощью реакции Троммера.

Реактивы		Оборудование
Свежие пекарские дрожжи, H_2SO_4 , 10%-ный раствор; NaOH, 10%-ный и 30%-ный растворы; $CuSO_4$, 1%-ный и 7%-ный растворы; аммиак, концентрированный раствор; $AgNO_3$, 1%-ный раствор; молибденовый реактив.		широкие пробирки с обратным холодильниками; песчаные бани или асбестовые сетки; воронки; фильтры.
№	Процесс	
1	В широкую пробирку для гидролиза помещают 0,5 г свежих пекарских дрожжей и заливают 4 мл 10%-ного раствора серной кислоты. Пробирку закрывают пробкой, в которую вставлен обратный холодильник (стеклянная трубка длиной 25-30 см), и ставят на песчаную баню или асбестовую сетку.	
2	Через 1 ч после начала кипения жидкости гидролиз прекращают, дают содержимому пробирки остыть и фильтруют через бумажный фильтр. В фильтрате открывают продукты гидролиза нуклеопротеинов качественными реакциями на компоненты нуклеопротеинов.	

3	<p>Биуретовая реакция на полипептиды. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10%-ного раствора NaOH и 1 каплю 1%-ного раствора сульфата меди (II). Жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.</p>	
4	<p>Серебряная проба на пуриновые основания. 10 капель гидролизата нейтрализуют 1 каплей концентрированного аммиака и добавляют 5 капель 1%-ного раствора нитрата серебра. При стоянии через 3-5 мин выпадает небольшой рыхлый осадок серебряных соединений пуриновых оснований (аденина, гуанина), окрашенный в бурый цвет.</p>	
5	<p>Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 30%-ного раствора NaOH и 1-3 капли 7%-ного раствора сульфата меди (II) до появления не исчезающей мути гидроксида меди (II). Жидкость перемешивают и верхний слой её нарезают до начала кипения. Выпадает красный осадок оксида меди (I) или желтый осадок гидроксида меди (I) вследствие окисления рибозы и восстановления $\text{Cu}(\text{OH})_2$ до Cu_2O.</p>	
6	<p>Молибденовая проба на фосфорную кислоту. К 20 каплям молибденового реактива (раствор молибдата аммония в азотной кислоте) добавляют 2-3 капли гидролизата и кипятят несколько минут на открытом огне. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет.</p>	

**Лабораторная работа № 13. Выделение дезоксирибонуклеопroteина из
ткани зубной железы или селезенки.**

Принцип работы: Метод основан на способности ДНП растворяться в солевых растворах большой ионной силы и выпадать в осадок при снижении их концентрации.

Реактивы		Оборудование
5% раствор NaCl, стеклянный порошок, 0.4% и 10% раствор CuSO ₄ , раствор NaOH, дифениламинный реактив, дистиллированная вода.		Пробирки, ступки, воронки, марлевые фильтры, стеклянные палочки, стеклянные стаканы вместимостью 100-150мл, водяная баня, весы и разновесы, цилиндр вместимостью 25 мл и 100мл.
№	Процесс	
1	0.5 г зубной железы или селезенки растирают в ступке со 100 мг стеклянного порошка	
2	Постепенно добавляя небольшими порциями 15мл 5% раствора NaCl	
3	Фильтруем содержимое ступки через марлевый фильтр	
4	Затем в стакан наливаем 80-90мл дист. воды и медленно помешивая выливаем готовый фильтрат	

5	Нерастворимый в воде ДНП выпадает в осадок, нити его наматываем в палочку и переносим в чистую пробирку.	
---	--	--

Ситуационные задачи:

1. Через 1 час после внутривенного введения животным аспартата, содержащего изотоп ^{15}N , радиоактивная метка была обнаружена в РНК и ДНК разных органов и тканей. Как объяснить результаты этого эксперимента? Для ответа:

- а) напишите формулы азотистых оснований, в составе которых окажется метка, и отметьте в них радиоактивный атом;
- б) для пиримидиновых нуклеотидов правильность вашего выбора докажете схемой соответствующего метаболического пути.

2. Антибиотик азасерин — структурный аналог глутамина, являющийся мощным ингибитором синтеза пуриновых нуклеотидов, нашел применение в экспериментальных работах. Зная происхождение атомов гетероциклического кольца пурина, определите, какие этапы синтеза пуриновых нуклеотидов будут ингибированы при введении азасерина.

3. У новорожденного на первой неделе жизни обнаружили двустороннюю пневмонию. Внимательно обследовав маленького пациента, врачи выяснили, что он страдает врожденным иммунодефицитом. У больного была снижена скорость дезаминирования адениловых и дезоксиадениловых нуклеотидов. Малышу повезло: врачи вовремя приняли необходимые меры и ввели ему генную конструкцию, содержащую необходимый ген. Однако большинство детей с подобной генетической патологией погибают в раннем возрасте. Объясните причину высокой смертности детей с такой патологией. Для этого:

- а) напишите схемы реакций, скорость которых снижена у данного пациента, и участвующие в них ферменты;
- б) укажите вещество, накапливающееся при снижении скорости дезаминирования адениловых нуклеотидов, и фермент, активность которого ингибирует это вещество. Представьте схему реакции, катализируемую этим ферментом;

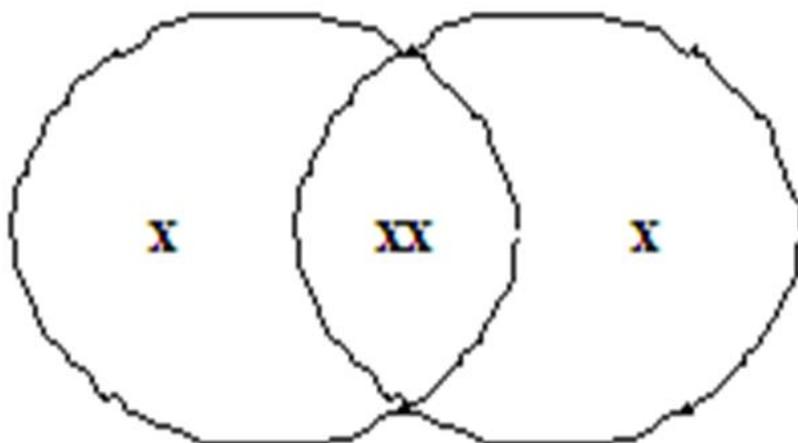
в) объясните, пролиферация и созревание каких клеток снижается при ингибировании этой реакции и почему.

4. В клинику обратился мужчина с жалобой на острую боль в суставе большого пальца левой ноги, возникшую два дня назад. При осмотре отмечалась отечность плюснефалангового сустава, покраснение и местное повышение температуры. В ходе сбора анамнеза выяснилось, что пациент употребляет много мясной пищи. Биохимический анализ крови показал: содержание мочевой кислоты — 0,51 ммоль/л (норма — 0,17—0,42 ммоль/л). Каков наиболее вероятный диагноз в данном случае и каковы причины возникновения этого заболевания? Для ответа на вопрос:

- а) приведите схему синтеза мочевой кислоты;
- б) объясните механизм развития указанных симптомов;
- в) укажите, какие лечебно-профилактические мероприятия необходимо провести в данном случае;
- г) объясните, почему вещество, используемое для лечения указанной патологии, облегчает состояние больного.

Покажите особенности структурной организации ДНК и РНК

ДИАГРАММА ВЕННА



ТЕСТЫ ПО ТЕМЕ

1. Какую функцию выполняет ДНК?

- А. переносит генетическую информацию из поколения в поколение
- Б. переносит аминокислоты в рибосомы

- В. переносит информацию о белке
- Г. составляет скелет рибосом

2. Какую функцию выполняет мРНК?

- А. переносит информацию о белке
- Б. переносит аминокислоты к рибосомам
- В. переносит генетическую информацию из поколения в поколение
- Г. составляет скелет рибосом

3. Репликация это:

- А. перенос информации между одними классами нуклеиновых кислот
- Б. перенос информации между разными классами нуклеиновых кислот
- В. перенос информации между разными классами макромолекул
- Г. ферментативный катализ

4. Транскрипция это:

- А. перенос информации между разными классами нуклеиновых кислот
- Б. перенос информации между одними классами нуклеиновых кислот
- В. перенос информации между разными классами макромолекул
- Г. ферментативный катализ

5. Трансляция это:

- А. синтез белка
- Б. перенос информации между разными классами макромолекул
- В. перенос информации между одними классами нуклеиновых кислот
- Г. перенос информации между разными классами нуклеиновых кислот

6. Какой связью соединены мононуклеотиды?

- А. 3` -5` фосфодиэфирной
- Б. ионной, дисульфидной
- В. пептидной
- Г. 0-гликозидной

7. Какую функцию выполняет ДНК лигаза?

- А. образует фосфодиэфирные связи в направлении 31-51
- Б. образует фосфодиэфирные связи в направлении 51-31
- В. расщепляет водородные связи между азотистыми основаниями
- Г. образует репликативную вилку

8. Какой связью соединены мононуклеотиды?

- А. 31 -51 фосфодиэфирной
- Б. ионной, дисульфидной
- В. пептидной
- Г. 0-гликозидной

9. Акцепторный участок во вторичной структуре РНК выполняет следующую функцию:

- А. присоединяет аминокислоту
- Б. антикодон по принципу комплементарности спаривается с кодоном мРНК
- В. связывается с рибосомой
- Г. связывается с аминоацил т РНК синтетазой

10. Антикодоновая петля во вторичной структуре РНК выполняет следующую функцию:

- А. антикодон по принципу комплементарности спаривается

- с кодоном мРНК
- Б. присоединяет аминокислоту
- В. связывается с рибосомой
- Г. связывается с аминоацил т РНК синтетазой

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

Тема: Метаболизм белков. Методы количественного определения ДНК и РНК.

Цель обучения: Сформировать знания о способах переноса генетической информации, о механизмах репликации, транскрипции и трансляции. Колориметрическое определение ДНК и РНК.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- приготовление растворов ДНК и РНК разных концентраций;
- построение калибровочного графика;
- Умение работать на ФЭК;
- измерение оптической плотности исследуемых растворов на ФЭК;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы.

Основные этапы занятия: приготовление растворов ДНК и РНК разных концентраций, построение калибровочного графика, измерение оптической плотности исследуемых растворов на ФЭК.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

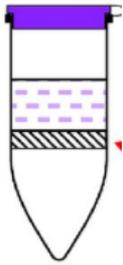
1. Виды переноса генетической информации. Перенос генетической информации в пределах одного класса нуклеиновых кислот.
2. Виды переноса генетической информации. Перенос генетической информации между разными классами нуклеиновых кислот.
3. Виды переноса генетической информации. Перенос генетической информации в пределах разных классов макромолекул.
4. Условия и механизм репликации ДНК у прокариотов.
5. Условия и механизм транскрипции ДНК.
6. Посттранскрипционные изменения РНК. Стадии процессинга.
7. Трансляция. Рекогниция.
8. Механизм биосинтеза белка на рибосомах.
9. Посттрансляционные изменения белка.
10. Регуляция биосинтеза белков у прокариотов. Опероны бактерий.
11. Какими качественными реакциями можно обнаружить структурные составные части нуклеотида?
12. В чем заключается принцип метода выделения ДНК из ткани и ее обнаружение?
13. Какие методы позволяют определить молекулярную массу ДНК?
14. С помощью какого метода можно наблюдать денатурацию ДНК?

15.С помощью какого метода можно наблюдать ренативацию ДНК?

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

Лабораторная работа № 14. Количественное определение ДНК колориметрическим методом.

Принцип работы: Метод основан на способности дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, давать синее окрашивание с дифениламиновым реактивом.

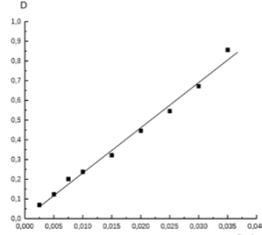
Реактивы		Оборудование	
1) дифениламиновый реактив, 1% раствор; 2) водный раствор ДНК		1) пробирки обычные и мерные; 2) кипящая водяная баня (!); 3) КФК, кюветы шириной 5 мм.	
№	Процесс		
1	В опытную пробирку наливают 1 мл исследуемого водного раствора ДНК и 2 мл дифениламинового реактива.		
2	В контрольную пробирку наливают 1 мл дистиллированной воды и 2 мл дифениламинового реактива.		
3	Обе пробирки нагревают на кипящей водяной бане 10 мин.		
4	После охлаждения измеряют оптическую плотность при красном светофильтре (КФК, кюветы шириной 5 мм) против контроля.		

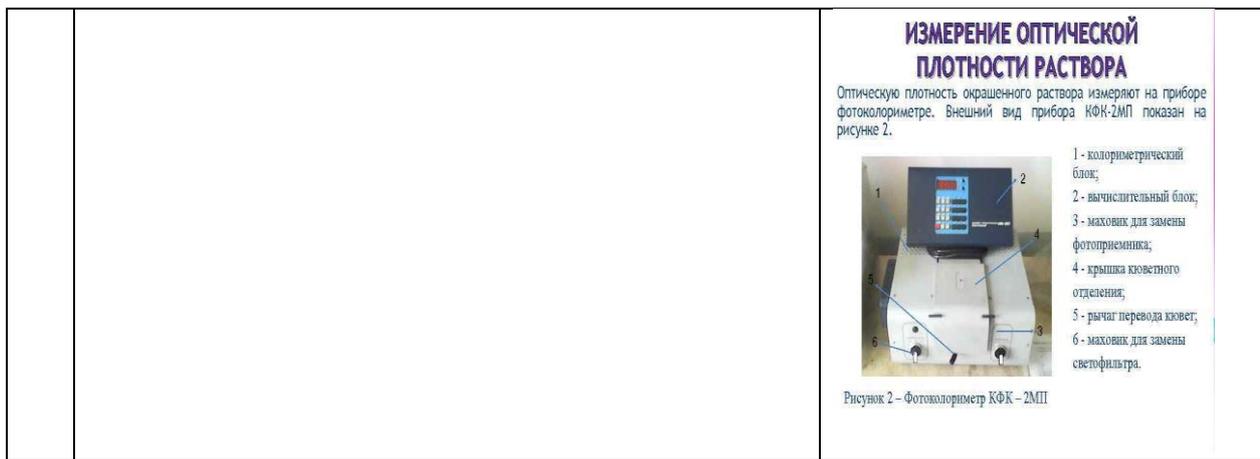
5	Построение калибровочного графика: В 3 пробирки помещают по 1 мл раствора ДНК с концентрациями 50, 100 и 200 мкг/мл соответственно. Добавляют в каждую пробирку по 2 мл дифениламинового реактива и нагревают на кипящей водяной бане 10 мин. После охлаждения измеряют оптическую плотность (см. п. 4). Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс концентрации использованных растворов ДНК, а на оси ординат - значения оптической плотности. Данные для построения калибровочного графика:			
	Пробирка №1	Пробирка №2	Пробирка №3	
Станд. р-р ДНК	1 мл	1 мл	1 мл	
Концентрация ДНК	50 мкг/мл	100 мкг/мл	200 мкг/мл	
Дифениламиноновый реактив	2 мл	2 мл	2 мл	
Оптическая плотность				

Лабораторная работа № 15. Метод количественного определения РНК колориметрическим методом

Принцип работы: Метод основан на цветной реакции орцинового реактива с пентозой, входящей в состав РНК.

Реактивы		Оборудование
Орциновый реактив (50 мг $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 250 мл концентрированной HCl и перед опытом к нужному количеству этого раствора добавляют орцин из расчета 4,76 мг/мл); водный раствор РНК;		пробирки обычные и мерные; кипящая водяная баня; КФК, кюветы шириной 5 мм.
№	Процесс	

1.	В опытную пробирку помещают 1 мл исследуемого раствора РНК и 1 мл орцинового реактива.																					
2.	В контрольную пробирку помещают 1 мл дистиллированной воды и 1 мл орцинового реактива.																					
3.	Обе пробирки нагревают на кипящей водяной бане 20 мин.																					
4.	После охлаждения измеряют оптическую плотность при красном свето фильтре (КФК, кюветы шириной 5 мм) против контроля.	<p style="text-align: center;">ИЗМЕРЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ РАСТВОРА</p> <p>Оптическую плотность окрашенного раствора измеряют на приборе фотоколориметре. Внешний вид прибора КФК-2МП показан на рисунке 2.</p>  <ul style="list-style-type: none"> 1 - колориметрический блок; 2 - вычислительный блок; 3 - маховик для замены фотоприемника; 4 - крышка кюветного отделения; 5 - рычаг перевода кювет; 6 - маховик для замены светофильтра. <p style="text-align: center;">Рисунок 2 – Фотоколориметр КФК – 2МП</p>																				
5.	Построение калибровочного графика. Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс концентрации использованных растворов РНК, а на оси ординат - значения оптической плотности.	 <table border="1"> <caption>Data points from the calibration graph</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (mg/ml)</th> <th>Optical Density (D)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.000</td><td>0.00</td></tr> <tr><td>0.005</td><td>0.10</td></tr> <tr><td>0.010</td><td>0.20</td></tr> <tr><td>0.015</td><td>0.30</td></tr> <tr><td>0.020</td><td>0.40</td></tr> <tr><td>0.025</td><td>0.50</td></tr> <tr><td>0.030</td><td>0.60</td></tr> <tr><td>0.035</td><td>0.70</td></tr> <tr><td>0.040</td><td>0.80</td></tr> </tbody> </table>	Concentration (mg/ml)	Optical Density (D)	0.000	0.00	0.005	0.10	0.010	0.20	0.015	0.30	0.020	0.40	0.025	0.50	0.030	0.60	0.035	0.70	0.040	0.80
Concentration (mg/ml)	Optical Density (D)																					
0.000	0.00																					
0.005	0.10																					
0.010	0.20																					
0.015	0.30																					
0.020	0.40																					
0.025	0.50																					
0.030	0.60																					
0.035	0.70																					
0.040	0.80																					
6	В 3 пробирки помещают по 1 мл раствора РНК с концентрациями 50, 100 и 200 мкг/мл соответственно. Добавляют в каждую пробирку по 1 мл орцинового реактива. Нагревают на кипящей водяной бане 20 мин. После охлаждения измеряют оптическую плотность																					



Ситуационные задачи:

1. Молодая мама обнаружила на пеленках своего сына розовые и оранжевые разводы; этот факт удивил женщину, и она решила обратиться в детскую поликлинику. После проведения анализов вердикт педиатров был неутешителен: у малыша обнаружилась тяжелая форма гиперурикемии — синдром Леша-Нихена. Объясните, чем было вызвано данное заболевание. Для ответа на вопрос:

- представьте схему метаболического пути, при нарушении которого наблюдается синдром Леша-Нихена;
- напишите реакцию, дефект которой явился причиной данного заболевания; укажите фермент, который ее катализирует;
- объясните причину появления розовых и оранжевых разводов на пеленках.

2. В процессе лечения подагры аллопуринолом у больного обнаружили накопление оротовой кислоты в тканях и крови. Содержание оротовой кислоты в моче значительно превосходило норму (600 мг/сут). Врач поставил диагноз оротацидурия. Почему развилась эта патология? Для ответа:

- укажите, при нарушении какого метаболического пути для лечения используют аллопуринол;
- вспомните, дефектом какого фермента обмена нуклеотидов вызвана наследственная оротацидурия;
- объясните, почему в процессе лечения аллопуринолом у больного развилась оротацидурия.

3. У ребенка по результатам анализов на фоне мегалобластной анемии содержание оротовой кислоты в моче составляет более 1 г/сут (в норме синтезируется 600 мг/сут) и отмечено резкое снижение активности фермента УМФ-синтазы. Какое заболевание мы можем диагностировать? Для ответа на вопрос:

- приведите реакции, которые катализирует бифункциональный фермент УМФ-синтаза;
- укажите возможные последствия данного заболевания;
- объясните, почему для лечения этой болезни используют уридин;
- напишите схему реакции, в которую вовлекается уридин, и опишите механизм действия полученного продукта на метаболизм пири-мидинов.

4. При назначении больному сульфаниламидных препаратов остро развился психоз, моча окрасилась в винно-красный цвет, приобрела способность к

флюоресценции в ультрафиолете, при пребывании на свету у больного развились острые изъязвления кожи, в затемненном помещении наблюдалось улучшение состояния. Поясните ситуацию

ТЕСТЫ ПО ТЕМЕ

1. Указать особенности процесса репликации:

1. Матрицей служит.....
2. Субстраты....
3. Источники энергии процесса....
4. Процесс катализирует репликативный комплекс, содержащий:
1....., 2....., 3....., 4.....
5. Продукт комплементарен (не комплементарен) матрице....
6. Процесс локализован в....
7. Процесс происходит в фазу клеточного цикл.

2. Выбрать компоненты, характерные для процессов репликации и репарации:

- | | |
|---|--|
| 1. Матрицей является одна из цепей ДНК. | 7. Процесс протекает постоянно на всех стадиях жизнедеятельности клетки. |
| 2. Матрицей для синтеза служат оба нити ДНК. | |
| 3. Субстратами является д-НТФ. | А. Характерно для репликации. |
| 4. Субстратами является НТФ. | В. Характерно для репарации. |
| 5. Процесс локализован в хроматине ядра. | С. Характерно для обоих процессов. |
| 6. Процесс протекает в период клеточного цикла. | Д. Не характерно ни для одного из процессов. |

3. Выбрать особенности, характерные для процессов репликации и транскрипции:

1. Матрицей служит ДНК.
 2. Продукт комплементарен матрице.
 3. Продукт идентичен матрице.
 4. Субстратами служат дезокси-рибонуклеозидтрифосфаты.
 5. Субстратами служат рибо-нуклеозидтрифосфаты.
 6. Матрицей служат РНК.
- А. характерно для репликации.
В. Характерно для транскрипции.
С. Характерно для обоих процессов.
Д. Не характерно ни для одного из процессов.

4. Выбрать свойства, характерные для биологического кода:

1. Смысл кодонов одинаков для организмов всех видов.
2. Каждый триплет кодирует одну аминокислоту.
3. Каждая аминокислота кодируется одним или несколькими триплетами нуклеотидов.
4. Каждой аминокислоте соответствует лишь один кодон.

5. Указать основные особенности процессов транскрипции и трансляции:

1. Матрица- ДНК.
 2. Матрица-мРНК.
 3. Источники энергии для синтеза- НТФ.
 4. Процесс катализируется РНК-полимеразой.
 5. Продукт комплементарен матрице.
 6. Продукт не комплементарен матрице.
 7. Процесс локализован в ядре.
 8. Процесс локализован в цитоплазме.
- А. Характерно для транскрипции.
В. Характерно для трансляции.
С. Характерно для обоих процессов.
Д. Не характерно ни для одного из процессов.

6. Подобрать каждому определению соответствующий ответ:

1. Участок ДНК, кодирующий структуру одного белка.
2. Участок ДНК, кодирующий структуру функционально связанных белков и содержащий регуляторную зону.
3. Участок ДНК, связывающийся с белком- регулятором.
4. Участок ДНК, обладающий сродством к РНК –полимеразе.

- А. Оператор.
В. Оперон.
С. Промотор.
Д. Ген.
Е. Кодон.

7. Факторы в синтезе белка:

- A) F1, F2, F3
- B) Mg²⁺, F2
- C) F2, F1, K⁺
- D) F2, F3, ГТФ

8. Ферменты, участвующие в рекогниции:

- A) ARS-аза
- B) гексокиназа
- C) лиаза
- D) примаза

9. Кодоны начинающие иннициацию:

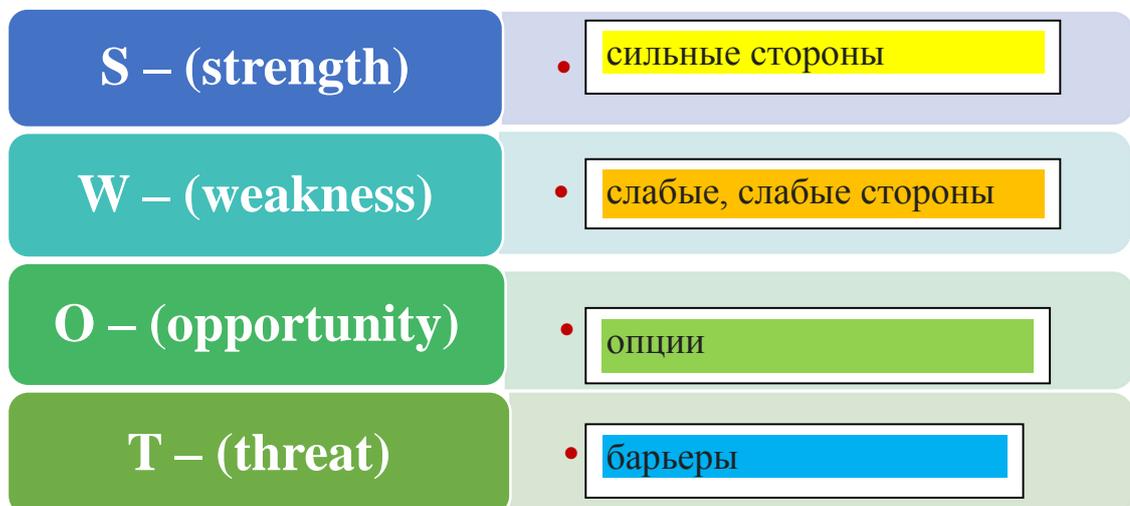
- A) AUG, GUG
- B) UUG, TUG
- C) AAG, GUG
- D) GUU, AUG

10. Кодоны терминации:

- A) UAA, UAG, UGA
- B) AUG, GUG
- C) UUG, TUG
- D) AAG, GUG

Метод «SWOT-анализ»

Целью этого метода является анализ существующих теоретических знаний и практического опыта, поиск путей решения проблем, укрепление знаний, повторение, оценка, формирование независимого, критического мышления и нестандартного мышления.



ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 7

Тема: Биоэнергетика и метаболизм. Определения активности сукцинатдегидрогеназы мышц.

Цель обучения: Сформировать знания о катаболизме и анаболизме, расщеплении высокомолекулярных веществ на разных уровнях ж.к.т, о фазах освобождения энергии из питательных веществ, образовании ацетил-КоА.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- приготовление препарата сукцинатдегидрогеназы;
- проведение ферментативной реакции с различными субстратами;
- проведение окислительно-восстановительной реакции с красителем;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы;

Основные этапы занятия: выделение сукцинатдегидрогеназы из ткани мышц. Проведение инактивации фермента. Проведение ферментативной реакции с различными субстратами.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. К какому классу относятся сукцинатдегидрогеназа ?
2. В каком биохимическом процессе участвуют фермент сукцинатдегидрогеназа, Сущность принципа обнаружения активности сукцинатдегидрогеназы?
3. Какие вещества служат источником энергии в работающей мышце?
4. Катаболизм основных пищевых веществ (углеводы, жиры, аминокислоты, белки). Понятие о специфических путях катаболизма. Специфические пути катаболизма пищевых веществ. Образование пирувата из углевода и большинства аминокислот.
5. Общий путь катаболизма: окисления пирувата и ацетил КоА до конечных продуктов распада. Биологическое значение и локализация компонентов общего пути катаболизма в клетке.
6. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты: биологическое значение, последовательность реакций, строение пируватдегидрогеназного комплекса, коферменты реакций, механизм катализа. Механизмы регуляции скорости окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты.
7. Цикл лимонной кислоты: биологическая роль, последовательность реакций, характеристика ферментов. Ключевые реакции цикла лимонной кислоты. Реакции, пополняющие цикл лимонной кислоты (анаэробные реакции)
8. Связь между общим путем катаболизма и цепью переноса электронов и протонов. Анаболические функции цикла лимонной кислоты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

Лабораторная работа №15 Сукцинатдегидрогеназа мышц и конкурентное торможение ее активности

Принцип работы: Сукцинатдегидрогеназа катализирует окисление (дегидрирование) янтарной кислоты в фумаровую. Коферментом служит флавинадениндинуклеотид (ФАД). В качестве акцептора водорода используется окисленная форма 2,6-дихлорфенол-индофенола (его натриевой соли), водный раствор которого окрашен в синий цвет. Восстановленная форма этого соединения бесцветна. Источником фермента служит мышечная кашица. Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназы вызывает малоновая кислота ($\text{HOOC-CH}_2\text{-COOH}$), являющаяся структурным аналогом янтарной кислоты.

Реактивы	Оборудование
мышечная кашица, янтарная кислота 1%, малоновая кислота 1%, 2,6-дихлорфенолиндофенол 0,1 %, дистиллированная вода	пробирки, воронки, стеклянные палочки, бюретки, ступки, пинцеты, водяная баня, термостат.

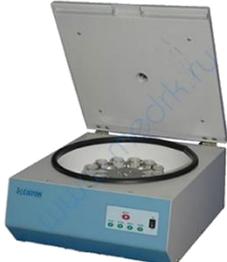
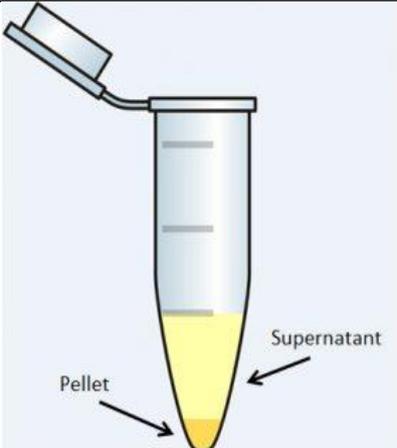
№	Процесс
1	<p>Для получения ферментного препарата 1-2 гр свежей мышцы, измельченной ножницами, растирают в ступке</p> 
2	<p>зачем мышечную кашицу переносят на двойной слой марли, помещенной в воронку, и промывают 25 мл дистиллированной воды.</p>
3	<p>Промытую кашицу отжимают, переносят в пробирку и суспендируют стеклянной палочкой с 4 мл воды. Полученную суспензию равномерно разливают в 4 пробирки.</p>

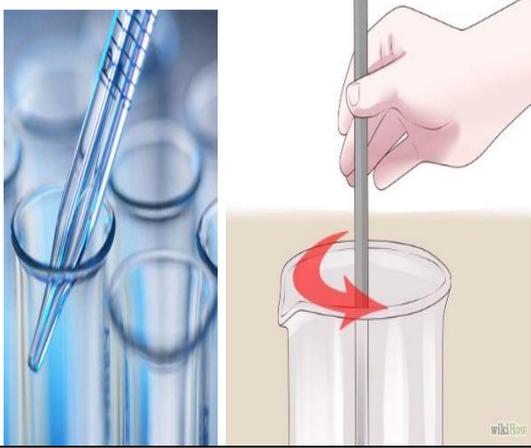
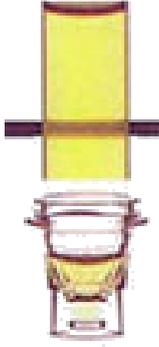
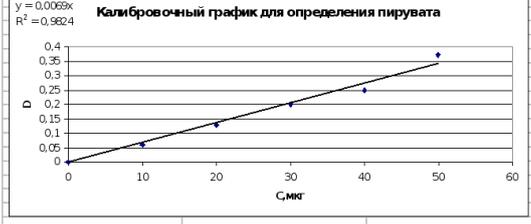
4	Содержимое первой пробирки кипятят в течении 1-2 мин для инактивации фермента.																										
5	Затем в пробирки приливают реактивы по схеме: <table border="1" data-bbox="308 432 936 732"> <thead> <tr> <th>№</th> <th>Сукци нат</th> <th>Вода</th> <th>Мало нат</th> <th>Краситель</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td>0,5</td> <td>-</td> <td>2 капли</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>1</td> <td>0,5</td> <td>-</td> <td>2 капли</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>-</td> <td>1,5</td> <td>-</td> <td>2 капли</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>1</td> <td>-</td> <td>0,5</td> <td>2 капли</td> </tr> </tbody> </table>	№	Сукци нат	Вода	Мало нат	Краситель	1	1	0,5	-	2 капли	2	1	0,5	-	2 капли	3	-	1,5	-	2 капли	4	1	-	0,5	2 капли	
№	Сукци нат	Вода	Мало нат	Краситель																							
1	1	0,5	-	2 капли																							
2	1	0,5	-	2 капли																							
3	-	1,5	-	2 капли																							
4	1	-	0,5	2 капли																							
6	Через 15 мин наблюдается исчезновение синей окраски только во второй пробирке.																										

Лабораторная работа №16 Определение содержания пирувата.

Принцип работы. Пировиноградная кислота при взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразоном в щелочной среде образуется 2,4-динитрофенилгидразоны пировиноградной кислоты желто-оранжевого цвета, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации пировиноградной кислоты.

Реактивы	Оборудование
Кровь; трихлоруксусная кислота (ТХУ), 100 г/л; 3) 2,4-динитрофенилгидразин, 1 г/л (в 2 н растворе соляной кислоты); NaOH, 120 г/л; стандартные растворы пировиноградной кислоты или пирувата натрия, 40, 80, 120 и 160	центрифужные пробирки; пробирки; центрифуга; КФК или ФЭК.

МКМОЛЬ/Л.		
№	Процесс	
1.	0,3 мл крови смешивают в центрифужной пробирке с 0,7 мл дистиллированной воды.	
2.	К гемолизату приливают 1 мл раствора ТХУ, перемешивают палочкой.	
3.	Через 2-3 мин центрифугируют в течение 15 мин при 1500 об/мин.	
4.	Надосадочную жидкость полностью сливают в пробирку.	

<p>5.</p>	<p>К ней приливают 0,4 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Содержимое пробирки смешивают и на 20 мин помещают в темное место при комнатной температуре.</p>																						
<p>6.</p>	<p>По истечении этого срока.</p>																						
<p>7.</p>	<p>В пробирку приливают 1 мл раствора NaOH.</p>																						
<p>8.</p>	<p>Через 5 мин определяют на КФК оптическую плотность окрашенного продукта.</p>																						
<p>9.</p>	<p>Измерение ведут против дистиллированной воды. Определение оптической плотности производится при синем светофилтре в кювете шириной 5 мм. Количество пировиноградной кислоты в исследуемой пробе рассчитывают по калибровочному графику,</p>	<table border="1" data-bbox="911 1659 1442 1771"> <thead> <tr> <th>Количество р-ра пирувата, мл</th> <th>Концентрация пирувата, С, мкг</th> <th>Оптическая плотность, D</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>0.2</td> <td>10</td> <td>0.06</td> </tr> <tr> <td>0.4</td> <td>20</td> <td>0.13</td> </tr> <tr> <td>0.6</td> <td>30</td> <td>0.2</td> </tr> <tr> <td>0.8</td> <td>40</td> <td>0.25</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>50</td> <td>0.372</td> </tr> </tbody> </table> 	Количество р-ра пирувата, мл	Концентрация пирувата, С, мкг	Оптическая плотность, D	0	0	0	0.2	10	0.06	0.4	20	0.13	0.6	30	0.2	0.8	40	0.25	1	50	0.372
Количество р-ра пирувата, мл	Концентрация пирувата, С, мкг	Оптическая плотность, D																					
0	0	0																					
0.2	10	0.06																					
0.4	20	0.13																					
0.6	30	0.2																					
0.8	40	0.25																					
1	50	0.372																					

	<p>построенному по стандартным растворам пирувата. Из каждой концентрации стандартного раствора берут три пробы по 0,3 мл и обрабатывают так же, как опытные. Средние значения оптических плотностей для каждой концентрации стандартного раствора пирувата используют для построения калибровочного графика.</p>	
<p>10. Результаты и выводы</p>		<p>Содержание пировиноградной кислоты в крови здоровых людей — 45,6-114 мкмоль/л. Содержание пирувата в крови увеличивается при недостатке в пище тиамин, заболеваниях печени, сахарном диабете, гиперфункции гипофизарно-адреналовой системы, а также при больших физических нагрузках (в 10 раз и более).</p>

Ситуационные задачи

1. Определите количество молей АТФ, синтезируемое за счет дегидрирования 1 моль пирувата. Для этого:

А. Опишите механизма окислительного декарбоксилирования пирувата.

Б. Покажите путь от восстановленного кофермента до кислорода.

В. Рассчитайте коэффициент окислительного фосфорилирования для данной реакции.

2. К каждому коферменту подберите реакцию из ЦТК, в которой он принимает участие:

1. ТДФ

А. Окислительное декарбоксилирование α -кетоглутарата (с помощью α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса)

2. ФАД⁺

В. Окисление сукцината

3. НАД⁺

С. Окисление малата

4. HS-CoA

Д. Дегидрирование изоцитрата.

В. Определите, какое количество АТФ может синтезироваться за счет каждой реакции. Ответ поясните.

С. Назовите витамины, входящие в состав данных коферментов. Опишите функции коферментов

ТЕСТЫ ПО ТЕМЕ

1. Катаболизм-это:

- А.совокупность внутриклеточных процессов, ведущих к расщеплению отдельных молекул, освобождению энергии и синтезу макромолекул
- Б.совокупность ферментативных реакций, обеспечивающих расщепление макромолекул и мономеров до конечных продуктов, идущих с выделением энергии
- В.совокупность биохимических реакций, обеспечивающих процессы жизнедеятельности, рост и воспроизведение, обмен с окружающей средой
- Г.совокупность биохимических реакций, включающих процессы синтеза различных веществ в организме

2. Общие ключевые метаболиты обмена:

- А.ПВК
- Б.ацетил К_оА
- В.оксалоацетат
- Г.малат

3. Конечными продуктами обмена являются:

- А.ацетил - К_оА
- Б.мочевина
- В.пируват
- Г.Н₂О,СО₂

4. В молекуле АТФ макроэргической является связь:

- А.гликозидная
- Б.фосфоэфирная
- В.фосфоангидридная
- Г. пептидная

5. Простетической группой первичных флавиновых дегидрогеназ является:

- А.НАДФ⁺
- Б.ФАД
- В.убихинон
- Г.гем

6. Ингибиторами переноса электронов в дыхательной цепи от первого ферментного комплекса на убихинон является:

- А.цианиды
- Б.угарный газ
- В.барбитураты
- Г.кислород

7. Субстратное фосфорилирование -это:

- А.образование АТФ, происходящее с потреблением кислорода
- Б.образование АТФ, сопряженное с переносом электронов по дыхательной цепи
- В.образование АТФ в процессе биологического окисления
- Г.образование АТФ с использованием энергии субстратов

8. Фермент сукцинатдегидрогеназа:
А.входит в состав дыхательной цепи
Б.катализирует гидратацию фумарата
В.имеет кофактор ФАД
Г.образует фумарат
9. К специфическим метаболическим путям окисления относятся:
А.цикл трикарбоновых кислот
Б.окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты
В.гликолиз
Г.бета- окисление высших жирных кислот
10. Реакции синтеза сопряженные с гидролизом АТФ, катализируют:
А.оксидоредуктазы
Б.изомеразы
В.лигазы
Г.трансферазы

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 8

Тема: Структура и функция дыхательной цепи. Определение активности цитохромоксидазы.

Цель обучения: Сформировать знания о структуре и функциях митохондрий. Тканевое дыхание и окислительное фосфорилирование Структура и функции дыхательной цепи.

Целевые задачи:к концу занятия студент должен уметь:

- приготовление препарата цитохромоксидазы;
- проведение ферментативной реакции с активном и денатурированным ферментами;
- проведение окислительно-восстановительной реакции с красителем;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы.

Основные этапы занятия: Экстракция фермента из мышечной ткани. Инактивация фермента. Проведение ферментативной реакции с активным и денатурированным ферментами.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Структура и функция дыхательной цепи.
2. Организация компонентов дыхательной цепи.

3. Характеристика переносчиков дыхательной цепи.
4. Окислительное фосфорилирование, локализация пунктов фосфорилирования в дыхательной цепи.
5. Механизм сопряжения дыхания и фосфорилирования в митохондриях
6. Механизм фосфорилирования.
7. К какому классу относятся ферменты, с которыми вы познакомились при выполнении практических работ?
8. В каком биохимическом процессе участвуют ферменты сукцинатдегидрогеназа, цитохром С и цитохромоксидаза?
9. Сущность принципа обнаружения активности сукцинатдегидрогеназы?
10. Какие вещества служат источником энергии в работающей мышце?

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

Лабораторная работа № 17 Цитохромоксидаза мышц

Принцип работы: Этот фермент является заключительным звеном цепи переноса электронов и катализирует перенос электронов на кислород воздуха. По химической природе цитохромоксидаза является медьгемопroteinом, т.е. белком, содержащем гем и медь в составе простетической группы.

Реактивы	Оборудование
мышечная кашица, п-фенилендиамин 1% водный, α-нафтол 1% спиртовый, дистиллированная вода	пробирки, воронки, стеклянные палочки, бюретки, ступки, пинцеты, водяная баня, термостат, фильтры

а.

№	Процесс
1	<p>Для получения ферментативного препарата 0,3-0,5 г свежей мышцы растирают в ступке с 20-кратным объемом дистиллированной воды</p> 
2	<p>Воду осторожно сливают, после мышечную кашицу отжимают между листиками фильтровальной бумаги.</p>

3	Отмытую от редуцированных веществ и водорастворимых ферментов мышечную кашу делят на 2 части. Одну часть на фильтровальную бумагу, а другую - в пробирку, добавляют 1 мл дистиллированной воды и кипятят в течение 1 мин. После остывания жидкость осторожно сливают, а мышцу переносят на фильтровальную бумагу.	
4	На обе порции наносят по 1-2 капли индофенольного реактива «Нади» смесь п-фенилендиамина и α -нафтола.	
5	Через 5-10 мин на одной порции мышечной кашицы появляется синеватое окрашивание, обусловленное образованием индофенолового синего – продукта окисления и конденсации α -нафтола и п-фенилендиамина. Реакция катализируется цитохромоксидазой мышц.	
6	На прокипяченной порции мышечной кашицы окрашивания не появляется вследствие тепловой денатурации фермента.	

Ситуационные задачи:

1. Рассчитать энергетический эффект окисления 1 моль пирувата до ацетил –КоА.
2. Рассчитать энергетический эффект окисления 1 моль ацетил КоА до CO_2 и H_2O .
3. Если к суспензии митохондрий, использующих в качестве единственного субстрата дыхания пировиноградную кислоту, добавить малоновую кислоту, то поглощения O_2 митохондриями резко снизятся, в то же время, увеличится концентрация одного из метаболитов цитратного цикла. Какой метаболит ЦТК накапливается? Представьте уравнения реакций.

4. При передозировки барбитуратов значительно снижается скорость реакции ЦТК. Используя схему ЦПЭ и ЦТК объяснить:

а) Какие реакции цитратного цикла окажутся заблокированными в этих условиях?

б) Какова причина снижения скорости реакции ЦТК?

Заполните таблицу

Промежуточные метаболиты общего пути катаболизма	Источники образования	Возможные продукты превращения
Пировиноградная кислота		
Ацетил – КоА		
Промежуточные метаболиты цикла Кребса:		

Заполните таблицу:

Комплекс дых. путей	Название фермента	Участвует ли в переносе:		Кофермент (название, формула)	Акцептор электронов	Донор электронов
		Электронов	Протонов			
I						
II						
III						
IV						

Заполните таблицу.

Энергетический эффект и регуляция ЦТК

фермент ЦТК	тип реакции	кофакторы	количество моль АТФ	для регуляторных ферментов	
				активаторы	ингибиторы

Литература

1. Биохимия. Учебник под редакцией проф. Е.С.Северина. –М.: Геотар-Мед 2004.779 с.
- 2.Биологическая химия с упражнениями и задачами. Учебник под редакцией проф. Е.С.Северина. –М.: Геотар-Мед 2011.609 с.
- 3.В.П.Комов., В.Н.Шведова. Биохимия.М.: Дрофа 2008. 640с.
- 4.Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox. Principles of Biochemistry.New York. 2013. 1336 p.
- 5.Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. “Биологическая химия” – М., «Медицина 1998
- 6.Методы клинических лабораторных исследований: учебник / под ред. В.С.Камышникова. – М.: МЕДпресс-информ,2009
7. Клиническая биохимия. Учебное пособие для вузов /Под редакцией В.А.Ткачука/ . – Из-во «ГЕОТАР-МЕД» .- Москва, 2002 – 358 с.
8. Гринштейн В., Гринштейн А.Наглядная биохимия. М. 2004.
- 9.А.Я. Николаев “ Биологическая химия” М.: Высш. шк. 2004.
- 10.Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии // Ростов-на Дону: Феникс, 1999. 540 с.