

ЮСУПОВ МАХАММАДШУКУР МАМАДАЛИЕВИЧ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

ПОСОБИЕ ДЛЯ СТУДЕНТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА

ВЫПУСК 1

Андижан – 2022

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО
СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

*АНДИЖАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИНСТИТУТ*

ЮСУПОВ МАХАММАДШУКУР МАМАДАЛИЕВИЧ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

**УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ
К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ**

(для студентов – 5510500 – фармацевтического факультета)

Выпуск 1

Андижан – 2022

Рекомендовано центральным научно-методическим советом
АГМИ (протокол № ___ от _____).

АВТОР: *ЮСУПОВ МАХАММАДШУКУР
МАМАДАЛИЕВИЧ*

Рецензенты: 1. профессор кафедры зоологии и биохимии
Андижанского государственного университета доктор
биол. наук Тажибаев К.Т
2. доцент кафедры гистологии и биологии, кандидат биол.
наук Сайдуллаев Т.С.

В пособии представлены и систематизированы современные сведения по трём разделом биохимии. Рассматриваются основные положения статической, динамической и фундаментальной биохимии. Приведена характеристика метаболизма белков, ферментов, липидов, в норме и при некоторых патологических состояниях и приведены лабораторные работы. А также сущность лабораторных работ. Охарактеризованы особенности метаболизма в различных органах и тканях. Изложены современные представления о молекулярных основах нарушений при ряде патологических состояний и болезней. Таблица – 15, рисунки – 27.

Предназначено для студентов медицинских вузов,
биологов, врачей.

БЕЛКИ. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ.

Живой организм характеризуется высшей степенью упорядоченности составляющих его ингредиентов и уникальной структурной организацией, обеспечивающей как его фенотипические признаки, так и многообразие биологических функций. В этом структурнофункциональном единстве организмов, составляющем сущность жизни, белки (белковые тела) играют важнейшую роль, не заменяемую другими органическими соединениями.

Белки – это высокомолекулярные азотсодержащие органические вещества, молекулы которых построены из остатков аминокислот. Название «протеины» (от греч. Protos - первый, важнейший), по-видимому, более точно отражает первостепенное биологическое значение этого класса веществ. Принятые в отечественной литературе термины «белки» и «белковые вещества» связаны с обнаружением в тканях животных и растений веществ, имеющих сходство с белком куриного яйца. В наше время, когда абсолютно достоверно установлено, что наследственная информация сосредоточена в молекуле ДНК клеток любых живых организмов, не вызывает сомнения, что только белки являются теми молекулярными инструментами, при помощи которых реализуется генетическая информация. Без белков, в частности ферментов, ДНК не может реплицироваться, не может самовоспроизводиться, т.е. лишена способности передавать генетическую информацию.

Живая природа характеризуется рядом свойств, отличающих ее от неживой природы, и почти все эти свойства связаны с белками. Прежде всего для живых организмов характерны широкое разнообразие белковых структур и их высокая упорядоченность; последняя существует во времени и пространстве. Удивительная способность живых организмов к воспроизведению себе подобных также связана с белками. Сократимость, движение-непременные атрибуты живых систем -имеют прямое отношение к белковым структурам мышечного аппарата. Наконец, жизнь немыслима без обмена веществ, постоянного обновления составных частей живого организма, т. е. без процессов анаболизма и катаболизма (этого удивительного единства противоположностей живого), в основе которых лежит деятельность каталитически активных белков- ферментов. Таким образом, белки (белковые вещества) составляют основу и структуры, и функции живых организмов. По образному выражению одного из основоположников молекулярной биологии Ф. Крика, белки важны прежде всего потому, что они могут выполнять самые разнообразные функции, причем с необыкновенной легкостью и изяществом. Подсчитано, что в природе примерно 10^{10} - 10^{12} различных белков, обеспечивающих существование около 10^6 видов живых организмов различной сложности организации начиная от вирусов и кончая человеком. Из этого огромного количества природных белков известны точное строение и структура ничтожно малой части. Каждый организм характеризуется уникальным набором белков. Фенотипические признаки и многообразие функций обусловлены *специфичностью* объединения этих белков, во многих случаях в виде над- и мультимолекулярных структур, в свою очередь определяющих ультраструктуру клеток и их органелл.

В клетке *E. coli* содержится около 3000 различных белков, а в организме человека насчитывается *более* 100000 разнообразных белков. Самое удивительное, что все природные белки состоят из небольшого числа

сравнительно простых структурных блоков, представленных мономерными молекулами-аминокислотами, связанными друг с другом в полипептидные цепи. Природные белки построены из 20 различных аминокислот. Эти аминокислоты могут объединяться в самой разной последовательности, поэтому они могут образовывать громадное количество разнообразных белков. Число изомеров, которое можно получить при всевозможных перестановках указанного числа аминокислот в полипептиде, исчисляется огромными величинами. Так, если из 2 аминокислот возможно образование только двух изомеров, то уже из 4 аминокислот теоретически возможно образование 24 изомеров, а из 20 аминокислот - $2,4 \cdot 10^{18}$ разнообразных белков.

Нетрудно предвидеть, что при увеличении числа повторяющихся аминокислотных остатков в белковой молекуле число возможных изомеров возрастает до астрономических величин. Ясно, что природа не может позволить случайных сочетаний аминокислотных последовательностей и для каждого вида характерен свой специфический набор белков, определяемый, как теперь известно, наследственной информацией, закодированной в молекуле ДНК живых организмов. Именно информация, содержащаяся в линейной последовательности нуклеотидов ДНК, определяет линейную последовательность остатков аминокислот в полипептидной цепи синтезируемого белка. Образовавшаяся линейная полипептидная цепь сама теперь оказывается наделенной функциональной информацией, в соответствии с которой она самопроизвольно преобразуется в определенную стабильную трехмерную структуру. Таким образом, лабильная полипептидная цепь складывается, скручивается в пространственную структуру белковой молекулы, причем не хаотично, а в строгом соответствии с информацией, содержащейся в последовательности аминокислотных остатков. Учитывая ведущую роль белков в живой природе и тот факт, что белки, составляя почти половину сухой массы живого организма, наделены

удивительным разнообразием функций, изучение курса биохимии в высших учебных заведениях обычно начинают с этого класса органических веществ.

ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Белки выполняют множество самых разнообразных функций, характерных для живых организмов, с некоторыми из которых мы познакомимся более подробно

при изучении курса. Ниже рассматриваются главные и в некотором смысле уникальные биологические функции белков, несвойственные или лишь частично присущие другим классам биополимеров. **Каталитическая функция.** К 1995г.

было идентифицировано более 3400 ферментов. Большинство известных в настоящее время ферментов, называемых биологическими катализаторами, является белками. Эта функция белков, хотя и не оказалась уникальной, определяет скорость химических реакций в биологических системах.

Транспортная функция. Дыхательная функция крови, в частности перенос кислорода, осуществляется молекулами гемоглобина-белка эритроцитов. В транспорте липидов принимают участие альбумины сыворотки крови. Ряд других сывороточных белков образует комплексы с жирами, медью, железом, тироксином, витамином А и другими соединениями, обеспечивая их доставку в соответствующие органы-мишени.

Защитная функция. Основную функцию защиты в организме выполняет иммунная система, которая обеспечивает синтез специфических защитных белков- антител в ответ на поступление в организм бактерий, токсинов, вирусов или чужеродных белков. Высокая

специфичность взаимодействия антител с антигенами (чужеродными веществами) по типу белок - белковое взаимодействие способствует узнаванию и нейтрализации биологического действия антигенов. Защитная функция белков проявляется и в способности ряда белков плазмы крови, в частности фибриногена, к свертыванию. В результате свертывания фибриногена образуется сгусток крови, предохраняющий от потери крови при ранениях.

Сократительная функция. В акте мышечного сокращения и расслабления участвует множество белковых веществ. Однако главную роль в этих жизненно важных процессах играют актин и миозин - специфические белки мышечной ткани. Сократительная функция присуща не только мышечным белкам, но и белкам цитоскелета, что обеспечивает тончайшие процессы жизнедеятельности клеток (расхождение хромосом в процессе митоза).

Структурная функция. Белки, выполняющие структурную (опорную) функцию, занимают по количеству первое место среди других белков тела человека. Среди них важнейшую роль играют фибриллярные белки, в частности коллаген в соединительной ткани, кератин в волосах, ногтях, коже, эластин в сосудистой стенке и др. Большое значение имеют комплексы белков с углеводами в формировании ряда секретов: мукоидов, муцина и т.д. В комплексе с липидами (в частности, с фосфолипидами) белки участвуют в образовании биомембран клеток.

Гормональная функция. Обмен веществ в организме регулируется разнообразными механизмами. В этой регуляции важное место занимают гормоны, синтезируемые не только в железах внутренней секреции, но и во многих других клетках организма. Ряд гормонов представлен белками или полипептидами, например гормоны гипофиза, поджелудочной железы и др. Некоторые гормоны являются производными аминокислот.

Питательная (резервная) функция. Эту функцию выполняют так называемые резервные белки, являющиеся источниками питания для плода, например белки яйца (овальбумины). Основным белком молока (казеин) также выполняет главным образом питательную функцию. Ряд других белков используется в организме в качестве источника аминокислот, которые в свою очередь являются предшественниками биологически активных веществ, регулирующих процессы метаболизма.

Можно назвать еще некоторые другие жизненно важные функции белков. Это, в частности, экспрессия генетической информации, генерирование и передача нервных импульсов, способность поддерживать онкотическое давление в клетках и крови, буферные свойства, поддерживающие физиологическое значение pH внутренней среды, и др.

Таким образом, из этого далеко не полного перечня основных функций белков видно, что указанным биополимерам принадлежит исключительная и разносторонняя роль в живом организме. Если попытаться выделить главное, решающее свойство, которое обеспечивает многогранность биологических функций белков, то следовало бы назвать способность белков строго избирательно, специфически соединяться с широким кругом разнообразных веществ. В частности, эта высокая специфичность белков (сродство) обеспечивает взаимодействие ферментов с субстратами, антител с антигенами, транспортных белков крови с переносимыми молекулами других веществ и т.д. Это взаимодействие основано на принципе биоспецифического узнавания, завершающегося связыванием фермента с соответствующей молекулой субстрата, что содействует протеканию химической реакции. Высокой специфичностью действия наделены также белки, которые участвуют в таких процессах, как дифференцировка и деление клеток, развитие живых организмов,

определяя их биологическую индивидуальность.

Пластическая роль белков в биосинтезе структурных элементов организма придает им особое значение в питании человека и животных. Эта функция белка незаменима и имеет первостепенное значение как источник свободной химической энергии.

В организме человека, животных почти нет резерва белков, поэтому они совершенно незаменимы в ежедневном питании. Белковое голодание приводит к тяжелым расстройствам организма. Особенно чувствителен к недостатку белка растущий организм. Длительное безбелковое питание неизбежно приводит к смерти. Для возмещения ежедневных потерь организму человека требуется 1,1—1,3 г белков на килограмм массы или 80—100 г в суточном рационе, при этом не менее 50 % животных. Оптимальное содержание белка в рационе питания должно обеспечивать 14—16 % общей калорийности пищи из расчета калорийности белков 17600 Дж/г.

Белки содержатся во всех природных объектах, однако в результате многолетнего опыта в рацион питания были отобраны мясо и мясные продукты, молоко и молочные продукты, птица, яйца, хлебные злаки, а также бобовые. Этот выбор не случаен, именно в перечисленных продуктах наивысшее содержание белков, имеющих высокую биологическую ценность и обуславливающих специфические свойства (вкус, структура, цвет и т. д.) пищи в процессе технологической обработки сырья. Экзотрофическая эффективность использования сырья растительного и животного происхождения в питании человека зависит от приемов, способов и режимов специальных технологий производства пищевых продуктов.

**МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БИМОЛЕКУЛ
(БЕЛКОВ, ЛИПИДОВ, УГЛЕВОДОВ)
Хроматографические методы.**

Хроматографические методы разделения нашли признание и применение в анализе различных белков. Эти методы имеют множество модификаций, что расширяет область их применения и позволяет с одинаковым успехом работать как с большим (граммы), так и с малым (пикограммы) количеством исходного материала.

Все хроматографические системы состоят, как правило, из двух фаз. Одной из них является неподвижная фаза, которая бывает твердой, жидкой или смесью жидкой и твердой фаз. Вторая фаза может быть жидкой или газообразной.

Разделение может происходить за счет установления:

- адсорбционного равновесия между неподвижной жидкой и подвижной жидкой фазами (адсорбционная хроматография);
- равновесного распределения между неподвижной жидкой и подвижной жидкой фазами (хроматография на колонке или на бумаге и противоточная хроматография);
- равновесного распределения между неподвижной жидкой и подвижной газовой фазами (газожидкостная хроматография);
- ионообменного равновесия между ионообменной смолой (неподвижной фазой) и электролитом (подвижной фазой) — ионообменная хроматография;
- равновесия между жидкой фазой на внутренней и внешней поверхностях пористой структуры (проникающая хроматография).

Известны и другие подходы при разделении белков. Некоторые из них будут предложены к рассмотрению ниже.

Большинство хроматографических методов удобно проводить на специальных колонках, что явилось причиной их необычайной популярности в практике определения различных веществ.

Независимо от метода хроматографии при работе на колонках используют общие приемы. Стеклоанная хроматографическая колонка должна быть устроена так, чтобы неподвижная фаза доходила до самого

ее дна во избежание скопления и перемешивания уже разделившихся частиц. Для этого чаще всего в основание колонок впаивают пористую стеклянную пластинку, настилают съемную сетку из нейлона и наносят неподвижную фазу. Известен и более простой способ подготовки колонок к работе, заключающийся в том, что основание колонки заполняют пористым материалом, например стекловатой, и точно по размеру диаметра колонки вырезают кружок фильтровальной бумаги, который аккуратно помещают сверху, а затем наносят неподвижную фазу (твердый носитель).

После заполнения колонок для уплотнения содержимого колонки пропускают растворитель. От правильного выбора соотношения между высотой колонки и диаметром, высотой и общим объемом наполнителя зависит количество материала, которое можно разделить. Например, для эффективного разделения частиц методом гель-фильтрации соотношение высоты колонки и ее диаметра лежит в пределах 10 : 1 — 20 : 1.

Образец наносят непосредственно на поверхность наполнителя при помощи капилляра, шприца или перистальтического насоса. Образец рекомендуется вносить в небольшом объеме растворителя. Это позволяет сосредоточить разделяемые частицы в узкой полосе уже в самом начале разделения.

Скорость протекания элюирующего раствора через колонку в ходе разделения должна быть постоянной, что достигается при подаче его на колонку самотеком из резервуара, расположенного над колонкой. Однако при соблюдении мер предосторожности можно использовать и перистальтический насос.

Элюат с колонки собирают в виде небольших фракций (2—5 % общего объема колонки) с помощью автоматических коллекторов или вручную. Фракции, содержащие одно и то же соединение, объединяют и анализируют.

Адсорбционная и распределительная

хроматографии. В основе этих методов лежит явление полярности.

Адсорбционная хроматография впервые была применена М. С. Цветом для разделения окрашенных веществ. *Адсорбент* — твердое вещество, способное удерживать на своей поверхности молекулы благодаря большому количеству мелких пор. В отличие от ионообменных смол притяжение молекул к поверхности адсорбента в идеальных условиях не является электростатическим. Сорбция веществ специфична, что позволяет избирательно адсорбировать одно вещество из смеси. В основе разделения методом адсорбционной хроматографии лежат различия в степени адсорбции данных веществ адсорбентом и растворимости их в соответствующем растворителе. Эти свойства определяются в основном молекулярной структурой соединения.

Адсорбционную хроматографию проводят на колонке или на специальных пластинах (тонкослойная хроматография). Последняя применяется для анализа очень малых количеств вещества.

Колонку заполняют адсорбентом и на него наносят смесь разделяемых веществ.

Разделение осуществляется за счет того, что вещества с более высоким эффективным коэффициентом распределения продвигаются по колонке с большей скоростью, отделяясь при этом от веществ с более низким коэффициентом. Если исследуемые соединения окрашены, то при разделении можно видеть движение по колонке окрашенных полос. После разделения колонку сушат, зоны вырезают и элюируют из них вещества. Другой наиболее предпочтительный способ заключается в том, что растворитель пропускают через колонку до тех пор, пока не соберут все фракции по мере их выхода. Если фракции не окрашены, весь выходящий из колонки материал собирают в виде фракций, а затем их анализируют. Эффективность разделения зависит от природы адсорбента. Обычно применяют кремниевую кислоту, окись алюминия, карбонат кальция, карбонат цинка, окись магния и др.

При тонкослойной хроматографии (ТСХ) слой адсорбента наносят на стеклянные пластинки. В отличие от классической хроматографии применяемые адсорбенты ТСХ содержат связывающие агенты, например сульфат кальция. Адсорбент наносится в виде кашицеобразной суспензии, затем пластины высушивают при 100—120 °С. Пробы в виде пятна наносят на пластинку при помощи микропипетки или шприца на расстоянии 2,5 см от нижнего края и боковых сторон и высушивают. Разделение проводят в специальной камере, на дно которой наливают растворитель слоем 1,5 см, затем закрывают стеклянной крышкой и оставляют на 1 ч для насыщения камеры парами растворителя. По достижении равновесия снимают крышку и хроматографическую пластинку помещают в камеру. Для этого ее устанавливают вертикально так, чтобы место нанесения пробы было выше уровня растворителя. Затем камеру снова накрывают крышкой, растворитель поднимается вверх по пластинке, и таким образом происходит разделение.

Многие фирменные адсорбенты для ТСХ содержат флуоресцирующие красители. После разделения пластинки просматривают в ультрафиолетовом свете, и отдельные компоненты выявляются на них в виде синих, зеленых или темных пятен. Эти пятна соскабливают, а затем элюируют с помощью специфических растворителей, вымывающих соединения, но не растворяющих краситель. Это особенно важно в количественном анализе. Если адсорбенты не содержат красителей, то при опрыскивании пластинок раствором серной кислоты с массовой долей 50 % и последующем их нагревании большинство соединений обугливается. На пластинке появляются коричневые пятна. Затем пластинки просматривают в УФ-свете либо анализируют каким-либо другим методом.

Метод распределительной хроматографии основан на распределении между двумя жидкими фазами. Метод имеет две основные разновидности: хроматография на колонке или на бумаге.

Хроматография на бумаге. Основана на распределении соединения между двумя жидкими фазами.

Хроматографическая бумага обладает свойствами поглощать воду из атмосферы и задерживать ее между своими целлюлозными волокнами. Одним из растворителей является вода — неподвижная фаза. Под действием капиллярных сил бумаги движется неводный растворитель — подвижная фаза. Молекулы вещества, нанесенного на бумагу, распределяются между фазами в соответствии с их коэффициентом распределения Rf .

$$Rf = S_{раств} / S_{фр}$$

где $S_{раств}$ — расстояние, пройденное растворенным соединением;

$S_{фр}$ — расстояние, пройденное фронтом растворителя.

Чем выше растворимость вещества в подвижной фазе, тем дальше оно продвинется на бумаге вместе с растворителем, и наоборот.

При использовании хроматографии на колонке в качестве носителя часто применяют целлюлозу, крахмал, кремниевую кислоту или какие-либо другие соединения. При этом неподвижная фаза, как правило, является водной (некоторые из них содержат до 50 % воды). Гидратированный носитель смешивают с растворителем до образования суспензии. Суспензию помещают в колонку, разделяемую смесь наносят сверху и проводят хроматографию. Вещества с разными эффективными коэффициентами распределения движутся по колонке с разными скоростями и поэтому элюируются в разное время, что дает возможность собирать и анализировать состав смесей частиц.

Хроматографию на бумаге проводят восходящими и нисходящими способами (см. рис. 1).

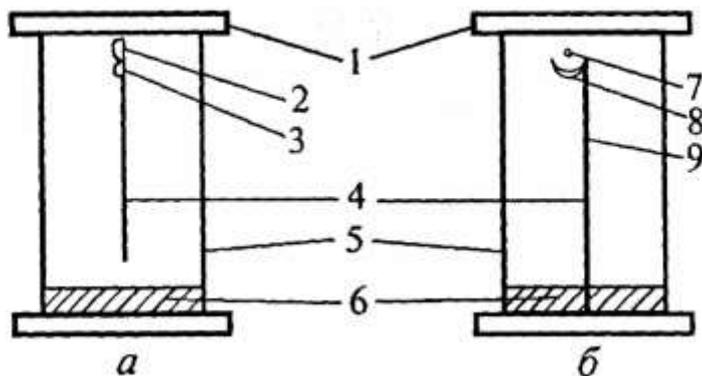


Рис. 1. Восходящая (а) и нисходящая (б) хроматография на бумаге:

1 — крышка; 2 — держатель; 3 — зажим; 4 — бумага;

5 — стеклянная камера; 6 — растворитель; 7 — стеклянная палочка; 8 — лоток с растворителем; 9 — место нанесения пробы

В обоих случаях на дно герметичного стеклянного резервуара наливают растворитель для насыщения атмосферы парами растворителя, а затем помещают в камеру бумагу.

При восходящей хроматографии (рис.1, а) бумажную полосу подвешивают так, чтобы нижний конец полосы бумаги был погружен в растворитель. Место нанесения пробы должно находиться на определенном расстоянии от поверхности растворителя, по мере продвижения растворителя под действием капиллярных сил вертикально вверх происходит разделение веществ.

При нисходящей хроматографии (рис.1, б) верхний конец бумажной полосы с образцом, нанесенным недалеко от кромки бумаги, закрепляют в лотке, находящемся в верхней части камеры, а нижний конец бумаги опускают вниз так, чтобы он не соприкасался с налитым на дно камеры растворителем. Перед началом хроматографирования лоток заполняют растворителем. Под действием капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает двигаться вниз по бумажной полосе, в результате чего и происходит разделение.

Для определения местоположения соединений хроматограммы просматривают в ультрафиолетовом свете или опрыскивают специальными растворами. В настоящее время этот вид хроматографии используется для количественного анализа ограниченно. Но в том случае, когда он применяется, участки хроматограммы, содержащие интересующее вещество, вырезают, а затем элюируют материал при помощи соответствующих растворителей и анализируют.

Хроматография в тонком слое основана на принципах распределительной и адсорбционной хроматографии.

В качестве носителей в тонкослойной хроматографии чаще всего используют измельченный силикагель или порошок целлюлозы, а также оксид алюминия, кизельгур, крахмал, сефадекс и др. Широкое распространение получил метод разделения аминокислот на пластинках, покрытых ионообменной смолой. В качестве растворителей используют системы с органическими растворителями различной степени полярности.

Тонкослойная хроматография имеет ряд преимуществ по сравнению с хроматографией на бумаге: она характеризуется быстротой разделения (30—60 мин в зависимости от размеров пластинки), большей чувствительностью метода (примерно в 10 раз) и устойчивостью слоя сорбента по отношению к агрессивным проявителям и нагреванию.

Хроматографию на пластинках проводят в закрытых стеклянных камерах, предварительно насыщенных парами растворителя, восходящим способом при комнатной температуре или при нагревании одномерно или двумерно. При одномерной хроматографии пробы на пластинку наносят в виде полос. Двумерный способ (второй растворитель движется по пластинке в направлении, перпендикулярном первому) используют для повышения эффективности метода.

Часто тонкослойную хроматографию сочетают с электрофорезом (метод пептидных карт). В этом случае пробу на пластинку наносят в

виде небольшого пятнышка (d

~ 2—3 мм) в одном из углов пластинки на расстоянии 20 мм от ее краев.

Многие коммерческие сорбенты для тонкослойной хроматографии содержат флуоресцентные красители, что позволяет идентифицировать разделяемые соединения, поглощаемые в ультрафиолетовой области спектра.

Разделение аминокислот (гидролизатов белков) методом тонкослойной хроматографии осуществляют на пластинках, покрытых тонким слоем ионообменной смолы полистирольной природы с сульфокислотными группировками (типа Дауэкс 50x8) или ионообменной целлюлозой. Такие пластинки выпускаются промышленностью, например «Фиксион 50x8» (Венгрия), или могут быть приготовлены в лаборатории.

Сочетание на пластинках «Фиксион» процессов ионообменной и тонкослойной хроматографии при разделении обуславливает высокую разрешающую способность этого метода.

Пластинки могут быть использованы для разделения аминокислот, олигопептидов, аминов и др.

Противоточная хроматография. Этот метод разделения основан на распределении соединений между двумя несмешивающимися жидкими фазами. Он отличается от обычной распределительной хроматографии тем, что ни одна из фаз не фиксируется на сорбенте или бумаге, однако в основе его лежит тот же принцип, что и в традиционной распределительной хроматографии, а именно различие в коэффициентах распределения соединений между двумя несмешивающимися фазами. В качестве фаз для противоточного разделения применяют смеси растворителей, буферов, солей и различные комплексообразующие реагенты.

Для проведения такого разделения пользуются специальным прибором для противоточного распределения

веществ, состоящим из большого количества соединенных между собой ячеек. Число переносов проб варьирует в весьма широких пределах (от 30 до 1000). Благодаря особой конструкции ячеек перенос верхней фазы из одной ячейки в другую осуществляется за счет простого вращения прибора.

Коэффициент распределения вещества выражается отношением концентрации растворенного вещества в верхней фазе к концентрации растворенного вещества в нижней.

Если коэффициенты распределения равны единице, то 50 % вещества будет находиться в верхней фазе, а 50 % — в нижней при условии, что объемы обеих фаз равны.

Процесс противоточного распределения повторяют много раз и проводят количественный анализ содержания растворенного вещества в каждой из них, т. е. дают оценку общего содержания вещества в верхней и нижней фазах. В результате получится распределение, изображенное на рис. ниже: растворенное вещество находится во всех пробирках, однако в пробирке 4 концентрация его максимальна. Если коэффициент распределения вещества больше или меньше 1 и равен, например, 0,3 или 3, то распределение будет выглядеть иначе.



Рис. 95. Распределение растворимых веществ с разными коэффициентами:

I — 0,3; II — 1,0; III — 3,0

Газожидкостная хроматография. Метод основан на распределении соединений между жидкой и газовой фазами. Благодаря высокой чувствительности и скорости распределения этот метод используется для количественного и качественного анализа широкого круга соединений. Принципиальная схема показана на рис.3.

Неподвижную фазу из жидкого материала закрепляют на инертном гранулированном твердом носителе и помещают в узкую стеклянную или стальную колонку, через которую пропускают инертный газ (подвижная фаза), например аргон или азот. Колонку помещают в термостат, в котором исследуемое вещество испаряется. В основе разделения анализируемых соединений по мере их продвижения по колонке с газом-носителем лежит различие в коэффициентах распределения испарившихся анализируемых веществ между жидкой и газовой фазами. После выхода из колонки вещества попадают в детектор, связанный через усилитель с самописцем.

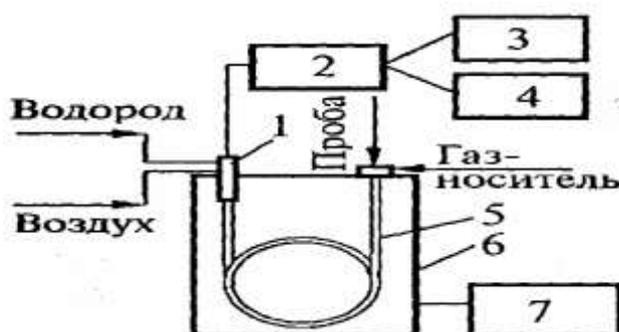


Рис. 3. Схема прибора для газожидкостной хроматографии:

1 — детектор; 2 — усилитель; 3 — самописец; 4 — интегратор; 5 — хроматографическая колонка; 6 — термостат; 7 — устройство, регулирующее температуру термостата.

Ионообменная хроматография. Данный вид хроматографии основан на притяжении противоположно заряженных частиц, имеющих способные к ионизации группы, которые обуславливают суммарный положительный или отрицательный заряд соединения. Величина заряда зависит от рН и изоионной точки (рI).

Величина рI различна в зависимости от характера данного белка. Для определения рI белков часто используют химический метод: предварительно готовят растворы белка, кислоты и щелочи. Раствор

белка разливают в несколько пробирок и вносят растворы щелочи и кислоты. Там, где помутнение среды максимальное, рН раствора будет соответствовать изоионной точке. Степень взаимодействия амфотерной молекулы белка с матрицей ионного обмена зависит:

- от рН рабочей среды, который предопределяет число заряженных групп твердой фазы, способных реагировать, и суммарного электрического заряда молекулы, содержащей ионы противоположного заряда;
- от концентрации других ионов того же заряда, что и подлежащая выделению молекула, которые вступают с ней в конкуренцию за связывание.

Чтобы адсорбировать и избирательно элюировать подлежащие выделению молекулы, пользуются изменениями взаимодействий в зависимости от рН и концентрации молекулярных ионов в растворе.

При возрастании ионной силы повышается концентрация противоионов, которая усиливает конкуренцию между разделяемыми частицами и солями по отношению к заряженным группам носителя. Молекулы с самым слабым суммарным зарядом замещаются противоионами и отделяются от носителя (см. рис. ниже).

На практике в качестве элюента используется раствор с возрастающей ионной силой. Матрица может нести либо отрицательные, либо положительные группы (см. рис.4). В случае отрицательно заряженной матрицы будут адсорбироваться компоненты образца, имеющие положительный заряд.

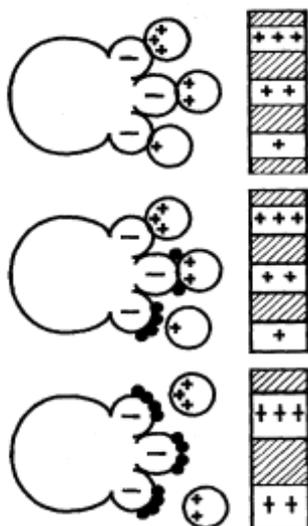


Рис.4. Ионообменная хроматография

При десорбции положительно заряженные компоненты образца будут обмениваться на ионы, содержащиеся в элюенте. При этом каждый компонент образца будет десорбироваться при определенной ионной силе и непрерывно вымываться из колонки.

Разделение веществ при помощи ионообменной хроматографии обычно проводят на колонках, заполненных специальными ионообменными смолами (катионообменниками или анионообменниками). Катионообменные смолы содержат отрицательно заряженные группы, которые притягивают положительно заряженные молекулы. Анионообменные смолы содержат положительно заряженные группы, притягивающие отрицательно заряженные молекулы.

Многие ионообменные смолы, которые применяются для разделения биологических соединений, получают путем сополимеризации стирола и дивинилбензола.

Катионообменные и анионообменные смолы разделяют в зависимости от силы их кислых и основных групп. В качестве полярных групп в катионообменных смолах выступают либо $—SO_3H$ -группы (сильнокислые), либо $—COOH$ -группы (слабокислые). Полярными

группами в анионообменниках являются третичные или четвертичные аммонийные группы $—CH_2 NR^2—$ (слабоосновные) или $—CH_2 N^+R^2—$ (сильноосновные).

В буферном растворе ионообменная смола набухает, а частицы ее образуют структуру в виде решетки. Смолы с

большим количеством поперечных стенок образуют матрицу, внутрь которой могут проникать лишь очень мелкие молекулы, а крупные не достигают ионообменного участка. Смолы с небольшим числом поперечных связей имеют «ячейки» большого размера, позволяющие крупным молекулам проникать внутрь гранул смолы к заряженным группам на ионообменном участке. Ионный обмен, как правило, происходит очень быстро, поэтому скорость всего процесса в целом лимитируется скоростью диффузии ионов через смолу. Процесс ионного обмена состоит из нескольких этапов, основными из которых являются: диффузия иона к поверхности смолы; диффузия иона внутрь границ смолы к ионообменному участку (лимитирует весь процесс ионного обмена); обмен ионов на ионообменном участке; диффузия ионообменника; десорбция элюентом и диффузия об-менявшегося иона в окружающий раствор.

Смолу оставляют набухать в стакане с дистиллированной водой, при этом ненабухшие частицы удаляют. Набухшую смолу помещают в колонку и подвергают регенерации, пропуская через колонку раствор HCl концентрацией 1 моль/дм³ (в случае катионообменника) или NaOH (в случае анионообменника). Затем колонку промывают дистиллированной водой до полного удаления колонку пропускают буферный раствор, рН и ионную силу которого постепенно повышают, смешивая в особой градиентной камере 1 растворы с различными значениями рН и ионной силы. К выходящему из колонки элюату до-бавляют краситель, например

нингидрин, и насыщают азотом; газ пропускают осторожно, чтобы не происходило слишком интенсивного перемешивания элюируемых веществ. Смесь нагревают на масляной бане 5 до получения интенсивного окрашивания, затем охлаждают, пропуская через змеевик 6, и колориметрируют в колориметре при 570 нм для измерения интенсивности синей окраски, обусловленной реакцией аминокислоты с нингидрином. Колориметр связан с двухканальным самописцем 9, который постоянно регистрирует выход элюата из колонки. Аминокислоты пролин и оксипролин окрашиваются нингидрином в желтый цвет, поэтому их пропускают через второй колориметр 8, настроенный на 440 нм, который также соединен с самописцем 9. Многие аминокислоты имеют две колонки для отделения смеси аминокислот от аммиака. В настоящее время созданы различные современные конструкции прибора.

Для разделения методом ионообменной хроматографии высокомолекулярных соединений, например, белков широко используют модифицированную целлюлозу. Последняя служит хорошим ионообменником, так как имеет волокнистую структуру, а также потому, что большинство функциональных групп у нее расположено на поверхности волокон, в результате чего они легко достигают макромолекул. Особенно хорошим катионообменником является карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза), к эффективным анионообменникам относится также диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза).

Проникающая хроматография. Разделение молекул по размерам и форме основано на свойствах молекулярного сита, которыми обладают многие пористые материалы. Наиболее часто для этой цели используют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой, придающей им свойства гелей. Разделение веществ при помощи гелей, основанное на различиях в размере молекул, называется гель-фильтрацией. К

материалам для проникающей хромато-графии относятся гели, в том числе и декстрины, с поперечными сшивками (сефадексы), агарозные гели (сефарозы, биогель А, са-гавак), полиакриламидный гель (биогель Р), полиакрило-ил-морфин и полистеролы (БИО- Бидз S), пористые стеклянные шарики (гранулы), известные под названием биоглас, пористый кварц— порасил.

Декстриновые гели получают поперечным сшиванием полисахаридных цепочек декстрина, благодаря чему растворимый в воде декстрин становится водонерастворимым, сохраняя при этом гидрофильные свойства и способность к быстрому набуханию в водной среде. Варьируя число поперечных сшивок, можно получить несколько различных типов сефадексов, различающихся степенью пористости частиц, что позволит применять их для разделения веществ с различными размерами молекул. Гели сефадекса нерастворимы и стабильны в воде, солевых растворах и органических растворителях, а также в щелочных и слабокислых растворах.

Агарозные гели готовят из агара — линейного полисахарида, состоящего из чередующихся остатков *D*- галактозы и 3,6-ангидро-*Z*- галактозы. Свойства гелей им придают водородные меж- и внутримолекулярные связи. Благодаря своей гидрофильной природе и почти полному отсутствию заряженных групп агарозные гели подобно декстриновым лишь в первоначальной степени вызывают денатурацию и адсорбцию лабильных биохимических соединений. Агарозные гели отличаются высокой степенью пористости, хорошо дополняют декстриновые. Они представляют собой густые суспензии в дистиллированной воде, содержащей бактериостатическое вещество.

Полиакриламидные гели получают путем полимеризации акриламида и метилен-бис-акриламида. Изменяя соотношение между этими двумя полимерами, удастся получить гели с различной степенью пористости. По своим свойствам они очень близки к декстриновым и

агарозным гелям — стабильны в водных буферах в интервале значений рН от 1 до 10, практически нейтральны и обладают одинаковой способностью связывать воду.

При гель-фильтрации гель действует подобно «молекулярному» сити, разделяя молекулы в зависимости от молекулярной массы и размера. Матрица представляет собой множество пористых частиц, между которыми находится элюент. Если в верхнюю часть колонки (см. рис. 6) внести анализируемую смесь, то большие молекулы не смогут войти в поры и будут выходить первыми. Молекулы меньшего размера, имеющие доступ к порам, задерживаются на некоторое время в геле и поэтому выходят после больших молекул в порядке уменьшения молекулярной массы и размера.

На практике часто возникает необходимость сконцентрировать водные растворы макромолекул и удалить из них мелкие неорганические ионы. Иногда для этих целей применяют сухой гель, например G-25, однако самый распространенный способ концентрирования веществ — использование специальных мембран.

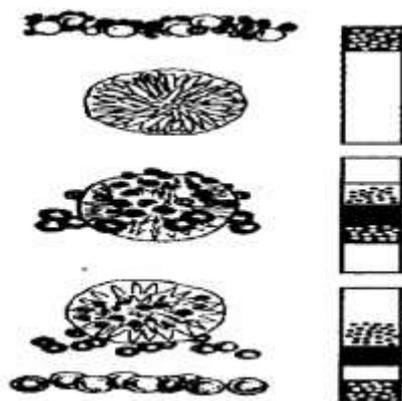


Рис.6. Гель-фильтрация на сефадексс G-25

Аффинная и ковалентная хроматографии. Аффинная хроматография основана на установлении обратимых молекулярных взаимодействий, присущих биологически обладают: иммунные, ферментные и

гормональные системы; белки, которые могут переносить различные малые молекулы (витамины, жирные кислоты и др.) после связывания этих молекул за счет сродства, и нуклеиновые кислоты, способные соединяться между собой или с некоторыми белками.

В аффинной хроматографии используется нерастворимый носитель, на котором иммобилизуется соединение, называемое лигандом; он особым образом связывает подлежащий очистке продукт, находящийся в подвижной, обычно жидкой фазе. Лиганд удерживается за счет ковалентных связей, иногда пользуются ионным обменом, адсорбцией, микроинкапсулированием и др.

Аффинная хроматография — разновидность адсорбционной, при которой связывание происходит в соответствии со специфическими свойствами двух молекул. Она основана на разных взаимодействиях: ионных, водородных, гидрофобных и других в зависимости от конформации и размера молекул.

Раствор, в котором находятся молекулы, вступает в контакт с неподвижным лигандом. Из всех веществ удерживаются те, чьи молекулы способны соединиться с лигандом.

Разрыв связей может происходить за счет действия агента, связывающегося с молекулой вместо лиганда, или агента, способного связываться с лигандом вместо молекулы. В обоих случаях элюирование называется *специфическим*.

Ковалентная хроматография представляет собой вид хроматографии по неизбирательному сродству, при которой матрица, богатая сульфгидрильными SH-группами и активированная путем обмена сульфгидрильных и дисульфидных групп, избирательно связывает все вещества, тоже содержащие SH-группы, посредством образования смешанного дисульфида.

Так как реакция присоединения обратимая, то продукт, содержащий SH-группы, может быть элюирован при восстановлении

дисульфидной связи после удаления незафиксированных веществ отмывкой.

Эту хроматографию можно применять во всех случаях, когда белки и частицы содержат сульфгидрильные группы, чтобы их изолировать, разделить и удержать(закрепить).

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Электрофорез—это движение частиц, находящихся во взвешенном состоянии в жидкой или газообразной среде, под действием электрического поля. По общему правилу подвижность молекул и частиц при электрофорезе предопределяется только потенциалом их поверхности и не зависит от их размера и формы. Во время передвижения частицы подвержены действию антагонистических сил, одни из которых зависят от их заряда и величины поля, вынуждая частицы перемещаться, другие связаны с формой частиц и с характеристиками среды и носителя, оказывая тормозящее действие. Данный метод можно применять для разделения белков, так как молекулы амфотерны.

В процессе перемещения на молекулу (сферу) действуют силы трех типов (рис. 7):

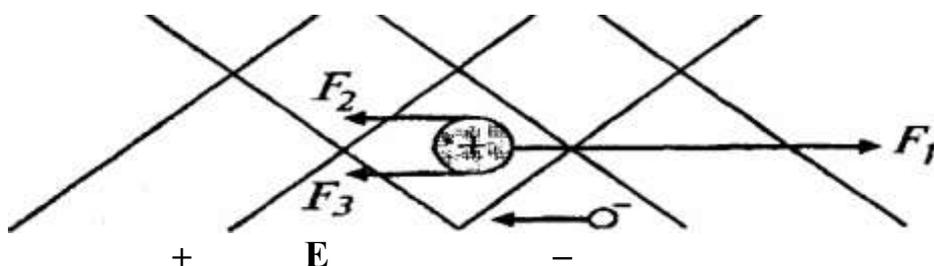


Рис.7. Силы, действующие на белки при электрофорезе

- 1) притягивающие силы электрического поля

$$F_1 = + n_e E,$$

где, n_e - эффективный электрический заряд частицы; E — электрическое поле;

2) гидродинамические силы

$$F_2 = 6 \pi \eta \alpha V_1,$$

где η — вязкость среды; α — радиус или другое выражение размера частиц; V_1 — предельная скорость частицы при электрофорезе;

3) силы электрофорезного трения, вызываемые движением в обратном направлении ионов, имеющих заряд, противоположный заряду частицы:

$$F_3 = E(\epsilon_r \rho - n_e),$$

где ϵ — диэлектрическая постоянная среды; ρ — потенциал частицы на ее поверхности.

При ограничении скорости перемещения

$$F_1 + F_2 + F_3 = 0$$

получают значение электрофоретической подвижности, т. е. совокупной скорости:

$$U = V/E = \epsilon_r \rho / 6 \pi \eta.$$

Из формулы видно, что перемещение молекул зависит от прикладываемого напряжения, ионной силы буферного раствора и времени.

Другой наиболее употребляемый тип электрофореза осуществляется на носителе: это классические носители для хроматографического разделения (бумага, ацетат целлюлозы, гели из крахмала и полиакриламида), выбираемые в соответствии с

характеристиками (размер, форма) молекул, подлежащих разделению, и их собственными параметрами структуры (пористость, вязкость).

В некоторых случаях белки можно также разделить по их изоэлектрическим точкам (pI), т. е. электрофокусированием. Если заставить белки мигрировать в среде, имеющей градиент pH , то каждый белок остановится в той зоне, где pH будет равен его изоэлектрической точке. Для этого используют смесь амфолитов — низкомолекулярных носителей под воздействием разности потенциалов при условии отсутствия конвекционного тока в растворе. Белки,

представляющие собой высокомолекулярные амфолиты, концентрируются в узких зонах соответствующих им pI .

Для получения наиболее точных и достоверных результатов часто комбинируют различные методы, используя всевозможные различия в свойствах молекул. После применения какого-либо одного из них применение другого, основывающегося на тех же физических свойствах, нецелесообразно, так как это скорее даст всего лишь относительно небольшую дополнительную очистку.

Как правило, используют схему: предварительно готовят биологический материал путем механического измельчения, затем взятый образец гомогенизируют, что позволяет повысить эффективность извлечения искомого белка. Белок переводят в растворимое состояние путем экстракции водой, буферными растворами солей и детергентов, иногда — неполярными растворителями. Затем белок фракционно осаждают нейтральными солями, обычно $(NH_4)_2 SO_4$, или органическими растворителями: этанолом, ацетоном и изопропанолом. При этом важным условием здесь является определение оптимальных значений pH , ионной силы и температуры. Величина pH должна соответствовать pI выделяемого белка. Для предотвращения денатурации, как правило, создают низкую ионную силу раствора, осаждение проводят при пониженной

температуре (около 4 °С); для стабилизации исследуемого белка в раствор иногда вводят ионы металлов. Следующая стадия очистки — освобождение от низкомолекулярных примесей веществ, использованных при экстракции и грубой очистке белков; раствор подвергают диализу (электродиализу) и ультрафильтрации.

Дальнейшую более тонкую очистку проводят по схемам, специально разработанным для отдельных белков с учетом их физико-химических и биологических свойств. Широко распространенными методами являются кристаллизация и перекристаллизация исследуемого белка, адсорбционная и ионообменная хроматография; гель- фильтрация; электрофорез; особенно эффективны следующие методы: жидкостная хроматография высокого разрешения и аффинная хроматография.

Степень очистки белка проверяют по так называемой *удельной активности* (его специфической биологической функции), т. е. по активности, приходящейся на 1 мкг (мг, г) белка. Критерием гомогенности идентифицированного белка являются неизменяющаяся удельная активность при попытках дальнейшей очистки, одна полоса или пик при ультрацентрифугировании, электрофорезе, хроматографии. Одноцепочечный белок должен быть гомогенным при N-, C- концевом анализе. Примеси сопутствующих белков определяют по их специфической биологической функции.

При конкретном выборе метода (или методов) следует иметь в виду, что в принципе можно применять несколько методов, но предпочтительными являются лишь некоторые из них.

При этом следует принимать во внимание:

- 1) цель (аналитическая или препаративная) проводимого разделения;
- 2) физические свойства вещества (например, растворимость, летучесть, молекулярная масса и размеры, заряд);
- 3) стабильность исследуемого белка в данных условиях;

- 4) информацию о разделении сходных соединений;
- 5) доступность оборудования;
- 6) стоимость и продолжительность процедуры.

РАЗДЕЛЕНИЕ НА МЕМБРАНАХ И ВОЛОКНАХ

Мембраны обладают хорошей проницаемостью для небольших молекул и практически непроницаемы для крупных. Диффузия небольших молекул через мембраны обеспечивается рядом факторов:

— разностью концентраций подлежащих удалению веществ в исследуемом растворе и чистом растворителе, находящихся по разные стороны мембраны (диализ);

— разностью гидростатических давлений по обе стороны мембраны, обеспечивающей диффузию молекул растворителя через мембрану (ультрафильтрация);

— при переносе ионов через мембрану приложенным внешним электрическим полем (электродиализ).

Используются полимерные мембраны неодинаковой степени проницаемости и целлюлозные трубки с различным диаметром пор. Степень пористости мембран можно изменять путем механического растягивания или обработки раствором едкого натра, а также за счет добавления к исследуемому раствору следовых количеств поверхностно-активных веществ. Мембраны применяются исключительно для ультрафильтрации и выпускаются с различным диаметром пор. Полые волокна по сравнению с мембранами имеют преимущества, обусловленные увеличением площади фильтрации за счет увеличения соотношения между площадью поверхности волокон и их объемом.

Диализ. Чтобы удалить из исследуемого раствора молекулы растворимого вещества, его помещают в целлюлозный мешочек и погружают в чистый растворитель (воду или буферный раствор), малые молекулы при этом будут выходить из мешочка в растворитель до тех пор, пока их концентрации по обе стороны мембраны не сравняются. Для интенсификации диффузии площадь поверхности диализного мешочка делают как можно больше. Однако следует учитывать, что при этом в результате сорбции на мембране могут теряться макромолекулы, поэтому слои раствора, примыкающего к мембране, постоянно заменяют, перемешивая растворитель или раствор. Растворитель рекомендуется менять регулярно, лучше непрерывно.

При одинаковом осмотическом давлении в исследуемом растворе и растворителе по мере выхода из диализного мешочка растворенного вещества молекулы чистого растворителя будут проникать внутрь мембраны (явление осмоса), что приведет к разведению исследуемого раствора. Растворы макромолекул можно концентрировать путем диализа раствора высокомолекулярных веществ, таких, как, например, полиэтиленгликоль.

В современной экспериментальной практике применяется метод электродиализа. Принципиально этот метод аналогичен электрофорезу с той лишь разницей, что движение макромолекул ограничивается мембраной. Приборы для электродиализа различаются расположением электродов и типом применяемых мембран.

Ультрафильтрация. Это разделение на полупроницаемой мембране с помощью давления. Разность давлений по обе стороны мембраны создается путем повышения давления со стороны фильтруемого раствора или понижения его в ультрафильтрате. Фирменные приборы для ультрафильтрации состоят из камеры особой конструкции, в которой создается положительное давление, и магнитных мешалок. При УФ-концентрировании небольших объемов материала

разность давлений может создаваться при центрифугировании образца. При этом ультрафильтрацию можно проводить непрерывно и фильтровать большие объемы.

Мембранные методы широко используются в промышленной и исследовательской практике для очистки, концентрирования и разделения дисперсных систем на основе баромембранных процессов: микро- и ультрафильтрации, обратного осмоса. Применение этих методов позволяет вести процессы в компактных, автоматически действующих и легко обслуживаемых аппаратах. Разделение протекает без энергоемких фазовых переходов, при невысокой температуре, с получением интересующих веществ, находящихся в нативном состоянии. Эти вещества безрегентны, позволяют создавать замкнутые технологические циклы с высокой степенью экологической безопасности за счет высокой селективности мембран к микрофлоре.

Однако мембранные методы имеют ряд ограничений и недостатков: невысокий предел концентрирования, который для гидрофильных веществ обычно не превышает 20—30 %, а для гидрофобных — 50—60 %; сравнительно небольшой срок службы мембраны вследствие образования осадка в порах и на поверхности.

Рабочая установка состоит из мембранного модуля, насоса для создания рабочего давления жидкости, подаваемой на разделение и очистку, запорной регулирующей аппаратуры и трубопроводов. Основным узлом установки является мембранный аппарат, в который раствор для разделения подается с рабочей поверхности. Модуль ультрафильтрации (рис.8) состоит из двух металлических прижимных фланцев. На нижнем фланце расположена коллекторная пластмассовая плита с двумя штуцерами для ввода исходного продукта и отбора пермеата. На плите находятся параллельно уложенные рамки подложки

с дренажными каналами: с верхней стороны — для исходного раствора, а с нижней — для ультрафильтрата.

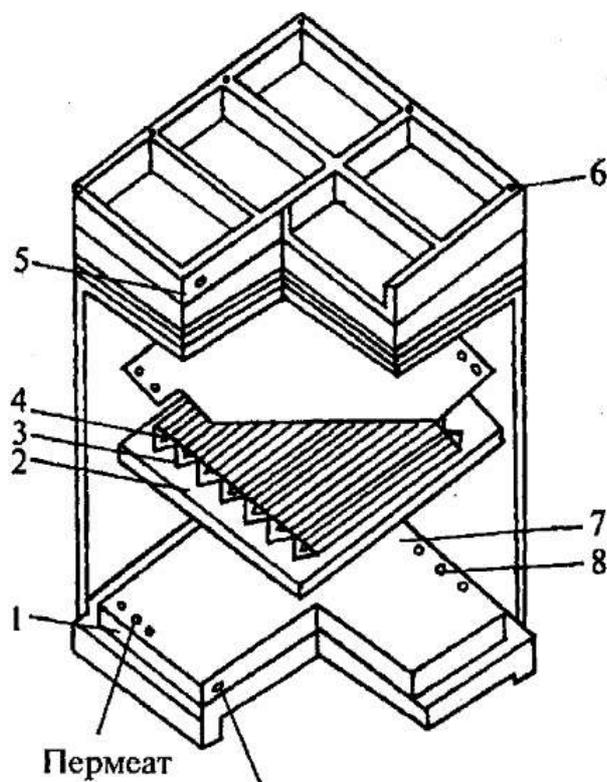


Рис.8. Плоскокамерный аппарат для ультраfiltrации:

1 — фланец; 2 — рамка-подложка; 3 — коллекторное отверстие; 4 — дренажные каналы; 5 — коллекторная сеть сбора концентрата; 6 — шпилька; 7 — коллекторная плита; 8 — коллекторное отверстие для исходного продукта.

Исходный продукт подается в мембранный аппарат снизу, равномерно разделяется коллекторной сетью в надмембранных каналах, а высокомолекулярная фракция концентрируется по мере проникновения низкомолекулярной фракции через мембрану. Прошедший

через мембрану ультрафильтрат по дренажным бороздкам на нижней поверхности опорной пластины поступает в общий коллектор сбора пермеата.

При обычной ультрафильтрации изменение общего объема не приводит к существенному изменению концентраций малых молекул растворенного вещества в удерживаемой жидкости. Повысить скорость обессоливания раствора можно за счет многократного и непрерывного разведения раствора свежим растворителем (путем диафильтрации).

В настоящее время разработаны различные модификации установок и мембран.

Разделение с помощью полых волокон. Применяется в виде ячеек, состоящих из пучка длинных полых волокон с внутренним диаметром около 200 мкм, рабочая поверхность каждого волокна около 1 см². Волокна с закрепленными в патроне концами погружают в чистый растворитель. Раствор, подвергаемый диализу, поступает внутрь волокон. Обессоливание растворов на 99 % происходит очень быстро — менее чем за 1ч. С помощью этого метода можно быстро концентрировать растворы. При этом исследуемый раствор помещают снаружи волокон, а затем создают разность давлений либо за счет частичного вакуума внутри волокон, либо за счет повышения давления в самом растворе. Этот метод также успешно применяется для концентрирования элюатов после хроматографии на колонках, что особенно важно при работе с термолабильными соединениями, такими, как белки и нуклеиновые кислоты.

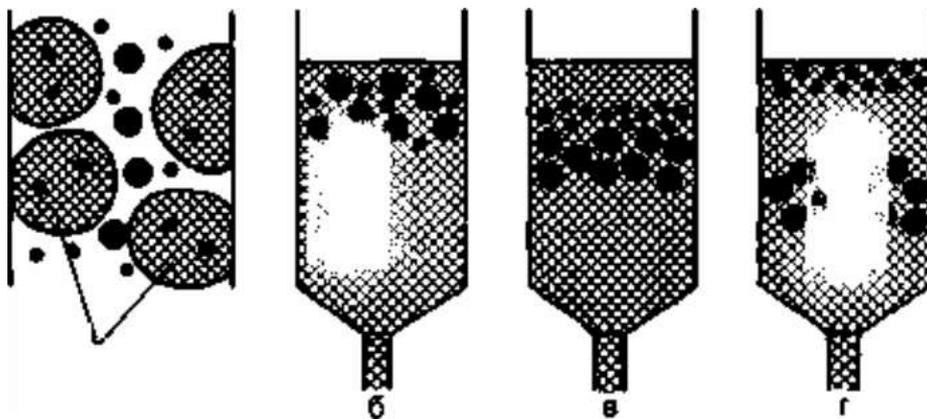
Полые волокна выпускаются с отверстиями различных диаметров, что позволяет использовать их для фракционирования веществ, например для очистки аминокислот или белков, концентрирования плазмы крови, а также при изучении связывания лекарственных веществ сывороточным альбумином и для других целей.

**ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ:
«БЕЛКИ»
Лабораторная работа: Обессоливание белкового
раствора методом гель-фильтрации**

Низкомолекулярные вещества из белкового раствора можно удалить достаточно быстро и полно с помощью гель-фильтрации. Принцип, лежащий в основе этого метода, весьма прост. Хроматографическую колонку заполняют гелем, набухшим в воде или буферном растворе.

Разделение веществ основано на различии размеров молекул. Крупные молекулы не проникают в поры гранул геля и выходят из колонки в первую очередь, а небольшие молекулы через поры попадают в гранулы, вследствие чего задерживаются на колонке и движутся с меньшей скоростью (рис. 1, а). Метод гель-фильтрации часто называют разделением веществ по принципу молекулярного сита. Три стадии такого разделения показаны на рис. 9 (б, в, г).

Свойствами молекулярного сита обладают многие пористые материалы. Наиболее часто для этой цели применяют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой: например, гели полисахарида декстрана (коммерческое название



Гранулы геля а

Рис. 9. Разделение веществ методом гель-фильтрации (схема).

"сефадексы"). При изготовлении сефадексов полисахаридные цепи декстрана соединяются поперечными шивками. Существует несколько типов сефадексов, различающихся как размером и количеством пор, так и величиной гранул. Это позволяет применять их для разделения веществ с молекулами разного размера. Благодаря высокому содержанию гидроксильных групп гранулы сефадекса легко набухают, образуя гель. Чем выше скорость набухания геля, тем больше номер сефадекса. Для освобождения белковых растворов от солей обычно используют сефадекс марки G-25.

Материал для исследования. Яичный альбумин, 1 % раствор. **Реактивы.** Биуретовый реактив; хромат калия K_2CrO_4 , сухой порошок; гель сефадекса G-25; дистиллированная вода.

Оборудование. Колонка с краном размером 1 x 25 см; делительные воронки или склянки с тубусом; воронки, химические стаканы; стеклянные палочки; штативы с пробирками; пипетки на 1 мл; стеклянная вата.

1. *Приготовление геля:* 4 г порошка сефадекса G-25 суспендируют в 200 мл дистиллированной воды в химическом стакане. После отстаивания

основной массы порошка воду с мелкими частицами осторожно сливают. Эту процедуру повторяют до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. При комнатной температуре весь процесс полного набухания геля занимает 3 ч. Если нагреть суспензию на водяной бане до температуры 100 °С, то это время сокращается до 1 ч.

2. *Подготовка колонки:* в колонку с закрытым краном наливают небольшое количество дистиллированной воды. На дно колонки помещают кусочек стеклянной ваты, при этом необходимо удалить пузырьки воздуха. Затем в колонку через воронку вливают густую суспензию геля сефадекса.

Ход работы. 1. Нанесение раствора белка. Колонка подготовлена заранее. Перед нанесением раствора открывают кран на колонке и наблюдают за уменьшением столбика воды над слоем сефадекса. Как только над поверхностью геля остается слой жидкости толщиной 1—2 мм, кран закрывают и при помощи пипетки аккуратно наносят на гель 1 мл белкового раствора, в который предварительно добавляют 5 мг K_2CrO_4 . Кран открывают и следят за проникновением раствора в гель. Снова закрывают кран, стенки колонки ополаскивают 1 мл дистиллированной воды при помощи пипетки, открывают кран и позволяют жидкости впитаться в гель. Затем кран закрывают и, стараясь не взмучивать гель, добавляют из пипетки аккуратно по стенке 4—6 мл дистиллированной воды.

2. **Сбор фракций.** В 14 пробирок отмеривают по 1 мл биуретового реактива. К колонке присоединяют делительную воронку с водой и открывают кран. Собирают фракции с колонки по 20 капель (1 мл) в пробирки, содержащие биуретовый реактив. Наблюдают изменение окраски на фиолетовую в порциях элюата, содержащего белок.

Выход хромата калия отмечают по появлению желтого окрашивания раствора в очередной пробирке.

Гель в колонке отмывают водой до полного удаления K_2CrO_4 . После этого колонка снова готова к употреблению. **Оформление работы.**

Описывают принцип метода; результаты опыта заносят в таблицу.

Форма записи

Номер пробир	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
фракция														
Белок														
K_2CrO_4														

Отсутствие

окраски обозначают знаком минус (—), появление окраски — знаком плюс (+), а несколько знаков плюс указывает на значительную интенсивность окраски. Выводы, полученные при анализе результатов опыта, также заносят в протокол.

Лабораторная работа: Обессоливание растворов белка методом диализа

Осадки белков, полученные при высаливании, обычно очищают от примеси солей методом диализа или гельфильтрации. В основе этих методов лежит различие в молекулярной массе белка и соли.

Диализом называется процесс разделения высоко- и низкомолекулярных веществ с помощью полупроницаемых мембран (коллодий, целлофан, пергамент и др.). Белковые молекулы имеют большой диаметр и не способны проникать через такие мембраны, в то время как частицы низкомолекулярных веществ легко проходят через них.

Материал для исследования. Яичный альбумин, 3 % раствор.

Реактивы. $(NH_4)_2SO_4$ - насыщенный раствор; $BaCl_2$ - 5 % раствор; $CuSO_4$ - 1 % раствор; $NaOH$ - 10 % раствор. явление окраски — знаком плюс (+), а несколько знаков плюс указывает на значительную интенсивность окраски. Выводы, полученные при анализе результатов

опыта, также заносят в протокол.

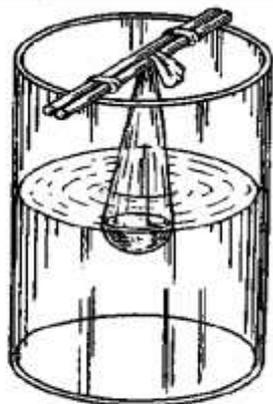
Оборудование. Стаканы вместимостью 100 мл; целлофан в виде квадратов размером 150 x 150 мм; стеклянные палочки; резиновые колечки; штатив с пробирками; пипетки с делениями.

Ход работы. 1. В пробирку наливают 2 мл раствора яичного альбумина и добавляют 1 каплю насыщенного раствора сульфата аммония.

Из листа целлофана, предварительно смоченного дистиллированной водой, делают мешочек (диализатор) и выливают в него содержимое пробирки. Края мешочка зажимают между двумя стеклянными палочками, прижатыми друг к другу резиновыми колечками, надетыми на концы палочек.

Мешочек помещают в стакан с дистиллированной водой, укладывают палочки на края стакана. Следят, чтобы уровень жидкости в мешочке был ниже уровня жидкости в стакане (рис. 10).

2. Через 1 ч от начала диализа в 2 пробирки берут по 1 мл жидкости из



ют две реакции:

иона SO^{2-} : в 1-ю пробирку добавляют 3—4 капли 5 % раствора бария хлорида; наблюдают образование осадка BaSO_4 в виде белой мути;

белка: выполняют

ю.

3. Жидкость (диализат) сливают в отдельную пробирку,

с помощью диализата и с ним тоже выполняют биуретовую реакцию.

4. **Оформление работы.** В тетрадь записывают результаты реакций; зарисовывают диализатор; делают выводы.

Лабораторная работа: Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза на бумаге

Исследование соотношения белков в сыворотке крови используется с диагностическими и прогностическими целями.

Распространенным методом разделения белков сыворотки крови является электрофорез. В настоящее время существуют высокоэффективные разновидности электрофореза: диск-электрофорез в полиакриламидном геле, электрофорез в крахмальном блоке, иммуноэлектрофорез. Самым простым по технике выполнения является электрофорез на бумаге, посредством которого можно разделить белки сыворотки крови на 5 фракций: альбумины, α_1 , α_2 , β - и γ глобулины. Необходимо помнить, что в каждую фракцию входят несколько индивидуальных белков, сходных по физико-химическим свойствам.

Белки — амфотерные электролиты. Если смесь белков поместить в электрическое поле, отрицательно заряженные белки будут передвигаться к аноду, положительно заряженные — к катоду. Нейтральные белки останутся на месте. На этом принципе разработан ряд методов электрофоретического разделения белков, ферментов, аминокислот и других веществ, обладающих зарядом; величина и знак заряда зависят от природы белка, рН и ионной силы используемого буферного раствора. В качестве адсорбента применяют хроматографическую бумагу, силикагель, агар, крахмал и т. п. Рассматриваемым методом можно получить до 9 фракций белков, содержащихся в сыворотке крови.

Оборудование: ФЭК, СФ или денситометр; камера для электрофореза со стабилизатором и выпрямителем; холодильник; сушильный шкаф; весы; ножницы; деревянная рама; хроматографическая бумага; линейка; карандаш; вазелиновое масло; фильтровальная бумага; кнопки; карандаш по стеклу; кюветы; пробирки; микропипетки; пипетки на 10 мл.

Реактивы: 0,05 М трис-НС1-буфер рН 8,9; проявитель (растворяют в воде 0,1 г бромфенолового синего, 50 г $ZnSO_4$ * $7H_2O$ и 50 мл ледяной уксусной кислоты и доводят водой до 1 л); 2%-ный раствор уксусной кислоты (20 мл ледяной уксусной кислоты, воды до 1 л); 0,01 н. раствор NaOH.

Материал: сыворотка крови.

Ход работы: На полосках хроматографической бумаги размером 3 X 26 см делают простым карандашом отметки на расстоянии 7 см от каждого конца. Бумажные полоски смачивают буферным раствором, немного подсушивают на фильтровальной бумаге и закладывают в камеру для электрофореза. В электродные кюветы наливают буферный раствор, отделения кювет соединяют полосками фильтровальной бумаги. После этого на место отметки на каждой полоске наносят из микропипетки 0,01 мл сыворотки в виде тонкой полосы, не достигающей до края с каждой стороны на 2 мм. Крышку камеры закрывают и включают электрический ток. Электрофорез проводят при градиенте потенциала 4—6 В/см. Например, если длина бумаги равна 26 см, градиент потенциала 5 В/см, то напряжение составит $26 \times 5 = 130$ В. Сила тока должна соответствовать 0,1—0,3 мА на каждый сантиметр бумажной полосы. Работу проводят при 4°С в холодильнике или в холодной камере. Продолжительность электрофореза составляет 18—24 ч. По окончании электрофореза бумажные полоски вынимают из прибора (концы полосок по 7 см с каждой стороны отрезают), закрепляют на деревянной раме и помещают на 15 мин в сушильный шкаф при 100° С. Высушенные полоски кладут в сухие кюветы, заливают раствором проявителя (бромфеноловый синий) и оставляют на 8—20 ч.

Избыток краски удаляют путем промывания бумажных полосок 2%-ным раствором уксусной кислоты до тех пор, пока их фон не станет белым. Затем полоски вывешивают на раме и сушат при комнатной температуре. После высушивания на электрофореграммах обнаруживаются 5 окрашенных полос различных фракций белков:

(см. рис. 11) первая слева интенсивно окрашенная полоса — альбуминов, вторая, наименее окрашенная, — α_1 - глобулинов, третья — α_2 - глобулинов, четвертая — β - глобулинов и, наконец, пятая (крайняя справа) — γ - глобулина.

Количественное определение каждой фракции белков проводят с использованием денситометра или путем извлечения краски из бумаги и определения ее количества. В последнем случае разрезают электрофореграммы на участки, соответствующие отдельным фракциям. Каждый участок измельчают и помещают в отдельные пробирки, в которые приливают по 10 мл элюирующего раствора 0,01 н. NaOH. Для определения фона вырезают полоску бумаги шириной 2 см из участка, свободного от белка, и также заливают элюирующим раствором. Элюцию проводят в течение 30 мин, изредка встряхивая пробирки. Окрашенный раствор колориметрируют на ФЭКе против элюирующего раствора или на СФ при длине волны 595 нм. Для выяснения истинной оптической плотности каждой фракции (D_{α}) из полученных цифровых значений оптической плотности вычитают величину оптической плотности фона с учетом ширины фракций на бумаге по формуле:

$$D_{\alpha} = D_1 - D_0 * l_1 / l_2,$$

где D_1 — измеренная оптическая плотность; D_0

— оптическая плотность фона; l_1 — ширина полоски фракции, см;

l_2 — ширина полоски фона, см.

Величины истинной оптической плотности всех фракций складывают, сумму принимают за 100% и затем вычисляют процентное содержание каждой фракции белков по формуле:

$V = D_{\alpha} * 100 / \Sigma D$, где D_{α} — оптическая плотность анализируемой фракции; ΣD — сумма оптических плотностей всех фракций.

Зная абсолютное содержание общего белка сыворотки (в данном объеме), легко вычислить и абсолютное содержание каждой фракции по формуле:

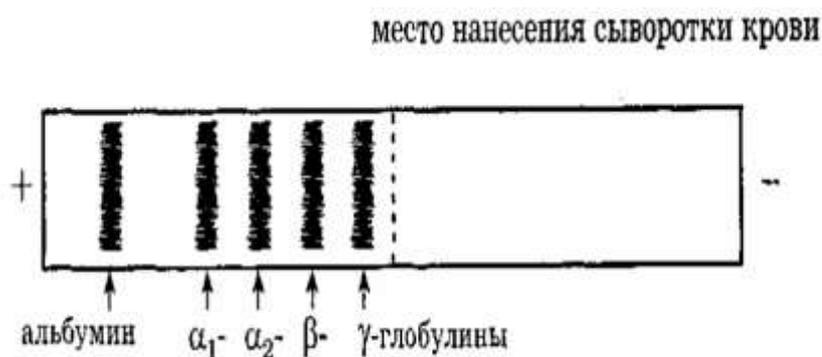
$$X = AV / 100$$

где A — абсолютное содержание белка, %; V — относительное содержание данной фракции, %.

Содержание каждой фракции электрофореграммы можно рассчитать

с помощью денситометра. Для этой цели бумажную полоску пропитывают вазелиновым маслом, избыток которого удаляют путем закладки электрофореграммы между листами фильтровальной бумаги. Затем помещают электрофореграмму в денситометр и записывают кривую. Площадь бумаги, ограниченную кривой, вырезают и взвешивают, разрезают ее на отдельные участки, соответствующие отдельным фракциям белка, и также взвешивают. Принимая массу площади электрофореграммы за 100%, рассчитывают процентное содержание каждой, фракции белка. В последнее время нашло широкое применение для указанных выше целей сочетание различного рода денситометров с цифropечатающими блоками, выдающими сразу площади пиков, соответствующих окрашенным зонам белков на электрофореграмме.

Зарисуйте электрофореграмму:



Объясните, почему электрофорез белков сыворотки крови осуществляют в среде с $pH = 8,6$. Обозначьте белковые фракции, охарактеризуйте их, используя данную таблицу.

Название белковой фракции	ИЭТ pI	Молекул ярная масса (средняя)
Альбумин	4,64	67 000
Глобулины: α_1 -	4,80	55 000
α_2 -	4,80	150 000
β -	5,40	75 000
γ -	6,30 ⁴⁵	160 000

Лабораторная работа: Диализ белка.

Сущность метода: Очень удобным методом очистки белковых растворов от низкомолекулярных примесей, например от избытка солей после высаливания, является диализ.

Диализом называется процесс разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ с помощью полупроницаемых мембран /Коллодий, целлофан, пергамент и др./.

Обладая большим диаметром, белковые молекулы не способны проникать через мембраны, а частицы низкомолекулярных веществ легко проходят через них.

Ход работы: 1. В пробирку наливают 2 мл р-ра яичного альбумина и прибавляют к р-ру 1 каплю насыщенного р-ра сульфата аммония. Из листа целлофана, предварительно намоченного водной делают мешочек «диализатор» и выливают в него содержимое пробирки. Края мешочка зажимают между двумя стеклянными палочками, прижатыми друг к другу, резиновыми колечками, надетыми на концы палочек. Мешок помещают в стакан с дистиллированной водой, укладывая палочки зажимающие мешок, на края стакана. Нужно проследить за тем, чтобы уровень жидкости в мешочке был ниже уровня жидкости в стакане.

2. Через 1 час от начала диализа берут в 2 пробирки по 1 мл жидкости из стакана и проделывают две реакции.

А/. На присутствие ионы сульфата, добавляют в 1-ю пробирку 3-4 капли 5% р-ра хлорида бария и наблюдают образование осадка сульфата бария в виде белой муки.

Б/. На присутствие белка, проделывают биуретовую реакцию.

3. Жидкость из мешочка сливают в пробирку /диализата/, отмеривают 10 капель диализата, и с ним тоже проделывают реакцию. Оформление работы: Записывают в тетрадь результаты реакций, записывают диализаторы, делают выводы.

Лабораторная работа: Разделение аминокислот методом

хроматографии.

Принцип метода: Отдельные аминокислоты обладают различной растворимостью в двух частично смешивающихся жидкостях, одной из которых является вода, а другой водонасыщенный органический растворитель, например фенол.

Из двух частично смешивающихся жидкостей один растворитель должен быть полярным /неподвижная фаза/, а другой неполярным - подвижная фаза. Гидрофобная кислота или другое вещество, лучше растворяющееся в неполярном растворителе, движется с большей скоростью от линии старта, чем гидрофильная аминокислота. В результате этого смесь аминокислот по окончании хроматографического разделение оказывается на разном расстоянии от линии старта.

Радиальную хроматографию проводят на бумаге в чашке Петри. Растворитель перемещается от центра к периферии и захватывает аминокислоты, которые распределяются концентрированными кругами и обнаруживается после высушивания бумаги и проведения нингидриновой реакции. Порядок выполнения работы:

1. В центре бумажного диска или квадрата из хроматографической бумаги, стороны которой на 1 см в диаметре. Простым карандашом диск делят на 4 части по диагоналям, затем помешают его на ножку, сделанную из фильтровальной бумаги в виде трубочки высотой 2 см, вставленной в вырез диска. Диск следует держать за края, чтобы избежать появления отпечатков пальцев на хроматограме.

2. Отступив от центра на 1 см. в каждом секторе диска обводят простым карандашом кружки и обозначают их цифрами 1,2,3,4. Наносят капилляром небольшое количество 1-2 капли исследуемых раствором аминокислот: аланина /1/. глутамина /2/, лейцина /3/. При нанесении исследуемых аминокислот в каждый кружок, следят за тем, чтобы капля наносимого раствора не заходила за кружок. После нанесения раствора бумагу необходимо просушить на воздухе, в течение 10 мин. Чтобы не

было влажных пятен.

3. В одну чашку Петри /одного диаметра с крышкой/ наливают 10 мл водонасыщенного раствора фенола так, чтобы ножки диска погружались в раствор. Чашку Петри накрывают крышкой и проводят хроматографическое разделение в течение 40-50 мин. При комнатной температуре.

По ножке растворитель поднимается вверх и распределяется по окружности бумажного диска, увлекая за собой нанести аминокислоты. При этом происходит разделение исследуемой взвеси на отдельные аминокислоты, движущиеся с разной скоростью соответственно коэффициентам их распределения между водой и фенолом. Когда фронт растворителя дойдет почти до края бумажного диска, крышку чашки Петри снимают, на нее кладут бумажный диск, удерживая пинцетом его края, и помещают в термостат при температуре 90-100⁰С на 10 мин. С целью устранения растворителя- фенола и фиксации аминокислот.

4. Для выявления пятен аминокислот хроматограмму опрыскивают 0,2% р-ром нингидрина /ацетонным или спиртовым/, либо сухую хроматограмму быстро одним движением смачивают раствором нингидрина налитым в чашку Петри, и вновь высушивают в сушильном шкафу при температуре 90-100 с в течение 5 мин. При этом проявляются аминокислоты в виде отдельных 3-х полос, окрашенных в розово-фиолетовый цвет, где каждое пятно соответствует определенной аминокислоте.

Сравнивая расположение пятен в исследуемой смеси с положением пятен в отдельных аминокислотах, устанавливают присутствие в смеси определенных аминокислот. Для каждой аминокислоты рассчитывают коэффициент распределения- R_f или скорость перемещения по формуле: R_f , где a -расстояние в мм., пройденное аминокислотой от места нанесения аминокислоты до середины ее пятна: R_f в -расстояние в мм. От места нанесения аминокислоты /линии старта/ до фронта. Чем меньше

растворимость аминокислот в H_2O , растворимость в феноле или другом органическом растворителе, тем быстрее она движется вслед за фронтом органического растворителя, тем больше величина R_f и наоборот, чем больше ее растворимость в H_2O и меньше в органическом растворителе, тем медленнее аминокислота будет передвигаться и тем меньше величина.

Коэффициент распределения R_f величина постоянная для каждой аминокислоты при постоянных условиях опыта /температура, сорт бумаги, растворитель/. Сравнивают коэффициент распределения известных стандартных аминокислот с коэффициентом распределения аминокислот, полученных для исследуемой смеси и определяют наличие отдельных аминокислот в исследуемом материале.

Указания к составлению отчета:

Студенты записывают принцип хроматографического метода, подчеркивают в тетрадь полученную хроматограмму с указанными аминокислотами. С помощью линейки измеряют расстояния a и b в R_f мм и вычисляют коэффициенты распределения R_f для каждой аминокислоты.

Выводы:

Лабораторная работа: Количественное определение белки биуретовым методом.

Сущность метода: В основе метода лежит биуретовая реакция. Все белки обладают способностью в щелочной среде давать с раствором сульфата меди фиолетовое окрашивание, Интенсивность развивающейся окраски пропорциональна концентрации белка в растворе.

Ход работы:

1. В 4 сухие пробирки отмеривают из бюреток по 1 мл р-ра белка. В первые пробирки помещают стандартные растворы с содержанием белка 0, 5; 1 и 1,5%. Эти пробирки служат для построения калибровочной кривой. В 4 пробирки наливают раствор с неизвестной концентрацией, белки, которую нужно определить.

2. В каждую пробирку наливают по 4 мл биуретового реактива. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 20 мин для развития окраски. Окрашенные растворы колориметрируются на ФЭКе в кюветах толщиной слоя 1 см пользуясь зеленым светофильтром. В качестве контрольного раствора при измерении на ФЭК берут биуретовый реактив.

3. Строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс известные концентрации стандартных растворов белка, а на оси ординат соответствующие значения оптической плотности. Зная оптическую плотность белка с неизвестной концентрацией калибровочной кривой находят в нем содержание белка.

Лабораторная работа. Колориметрическое определение концентрации белка по методу Лоури.

Сущность метода. Метод Лоури в настоящее время получил наибольшее распространение вследствие высокой чувствительности метода и простоты выполнения. Метод основан на образовании окрашенных продуктов синего цвета, образующихся в результате самостоятельных реакций:

А) биуретовой реакции белка с ионами меди в щелочной среде.

Б) реакции восстановления фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой солей реактива фолина аминокислотами тирозином и триптофаном присутствующим в испытуемом белке.

МЕТОД ЛОУРИ.

Ход работы: 1. Устанавливают в штатив 6 сухих пробирок. Первая и вторая пробирки предназначены для контрольных растворов. 3,4 и 5-я для стандартного раствора белка. Так как общий объем опытной пробы должен быть равен 1 мл, в том случае когда для определения приходится брать меньший объем белкового раствора добавляют дистиллированной воды до 1 мл.

В каждую пробирку к уже имеющемуся здесь 1 мл раствора добавить по 5 мл реактива С перемешивают а затем по, 0, 5 мл реактива.

Смесь еще раз быстро перемешивают и оставляют на 30 мин.

3. После этого растворы колориметрируют в ФЭКе красным светофильтром в кюветах толщиной слоя 1 см либо измеряют поглощение на спектрофотометре при 660 нм.

4. По данным проб №3-5 строят калибровочный график зависимости от концентрации белка. Пользуясь, оптическим графиком ходят содержание белка в растворе.

Лабораторная работа. Спектрофотометрический метод определения белки.

Из аминокислот входящих в состав белка лишь триптофан тирозин и в меньшей степени фенилаланина. Оптическая плотность растворов белков при 280нм прямо пропорциональна их концентрации в растворе. Так как большинство белков содержит остатки тирозина, измерения поглощения при 280 нм с помощью спектрофотометра подставляют собой быстрый и удобный способ определения содержания белков в растворе. Этот метод дает хорошие результаты с гетерогенной смесью белка, а также с препаратами индивидуальных белков, молярная абсорбция которых может быть точно измерена или вычислена исходя из аминокислотного состава.

Ход работы: 1. Бесцветный раствор белка помещают в кювету спектрофотометра с толщиной слоя 1 см и определяют его оптическую плотность при длине волны 280 нм. Концентрацию белка рассчитывают исходя из известного коэффициента оптической плотности.

2. Если коэффициент неизвестен, можно пользоваться номограммой Адамса. На номограмме на шкалах 2-3 отложены значения оптической плотности растворов белка соответственно при 280 и 260 нм. А на шкале 1 концентрация белка /в мг мл/ определяют оптическую плотность исследуемого раствора белка при 280 и 260 нм. Через соответствующие точки на шкалах 2 и 3 проводят воображаемую прямую. Точка ее пересечения со шкалой 1 дает концентрацию белка в исследуемом растворе.

Использование номограммы Адамса удобно еще и потому что при этом учитывается загрязнение раствора белка нуклеиновыми кислотами которые имеют максимум поглощения при 280 нм.

Номограмма для определения концентрации белка.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ И КОНТРОЛЯ УСВОЕНИЯ ТЕМЫ «БЕЛКИ»

1. Аминокислоты содержат одновременно две группы: – COOH и – NH₂, обе они способные к ионизации. Поэтому аминокислоты обладают свойствами и кислот, и оснований, они являются амфолитами. Напишите в виде амфионов формулы: а) аланина; б) серина; в) фенилаланина; г) треонина.
2. Напишите формулы и назовите дипептиды, которые могут быть получены из следующих аминокислот: а) аланин и треонин; б) фенилаланин и глутамин.
3. Используя обычные сокращения для аминокислот, напишите все возможные трипептиды, содержащие аланин, метионин и аспарагин. Приведите структурные формулы.
4. Приведите классификацию белков, основанную на их биологических функциях.
5. Охарактеризуйте физические свойства белков.
6. Дайте характеристику химическим свойствам белков.
7. Гидролиз белков. Виды гидролиза.
8. Дайте краткую характеристику конъюгированным белкам. Кооперативность белков.
9. Что понимают под вторичной структурой белка? Какие связи

стабилизируют ее?

10. Что понимают под третичной структурой белка? Какие связи принимают участие в поддержании третичной структуры?
11. Что подразумевают под четвертичной структурой белка? Приведите примеры. Дайте определение понятиям: протомер, субъединица, мультимер.
12. Что такое денатурация белка? Дайте характеристику денатурирующим агентам. Ренатурация.
13. Дайте общую характеристику и напишите схему выделения и очистки белков.
14. Опишите этапы выделения белков — гомогенизацию и экстракцию.
15. Опишите методы высаливания, электрофореза и ультрацентрифугирования, используемые для разделения белков.
16. Опишите хроматографический метод разделения белков на сефадексах.
17. Опишите хроматографический метод разделения белков на ионообменниках.
18. Дайте характеристику метода аффинной хроматографии.
19. Какие методы используются для определения гомогенности выделенных белков? Опишите их.

ПОНЯТИЯ О ФЕРМЕНТАХ

Ферменты, или энзимы, представляют собой высокоспециализированный класс веществ белковой природы, используемый живыми организмами для осуществления с высокой скоростью многих тысяч взаимосвязанных химических реакций, включая синтез, распад и взаимопревращение огромного множества разнообразных химических соединений. Жизнь и многообразие ее проявлений - сложная совокупность химических реакций, катализируемых специфическими ферментами. И. П. Павлов считал ферменты «возбудителями всех химических превращений» у живых существ. Как известно, важнейшим свойством живого организма является обмен веществ, ускоряющим аппаратом, основой молекулярных механизмов интенсивности которого, являются ферменты. «Вся тайна животной жизни, - писал Д. И. Менделеев, - заключается в непрерывных химических превращениях веществ, входящих в состав животных тканей».

В настоящее время теоретические и практические достижения энзимологии используются в решении многих проблем биохимии и молекулярной биологии, включая их сравнительное и эволюционное рассмотрение.

Ферменты обеспечивают осуществление таких важнейших процессов жизнедеятельности, как экспрессия (реализация) наследственной информации, биоэнергетика, синтез и распад биомолекул (обмен веществ). Изучение их способствует проникновению в суть и сокровенные тайны того загадочного явления, которое мы называем жизнью. Этими обстоятельствами может быть объяснено пристальное внимание исследователей к проблемам структуры, функций и молекулярных механизмов действия ферментов.

От неорганических катализаторов ферменты отличаются рядом характерных особенностей. Прежде всего, ферменты чрезвычайно эффективны и проявляют в миллионы и миллиарды раз более высокую каталитическую активность в условиях умеренной температуры (температура тела), нормального давления и в области близких к нейтральным значениям pH среды.

Ферменты отличаются высокой специфичностью действия в отношении как химической природы субстрата, так и типа реакции, т. е. каждый фермент катализирует в основном только определенную химическую реакцию. Для каждого фермента характерны специфическая последовательность расположения аминокислотных остатков и пространственная конформация. Существенной особенностью ферментов является также то, что их активность в клетках строго контролируется как на генетическом уровне, так и посредством определенных низкомолекулярных соединений, в частности субстратов и продуктов реакций, катализируемых этими же ферментами, ингибиторов и др. Таким образом, молекула фермента характеризуется уникальностью структуры, которая и определяет уникальность ее функции.

Учение о ферментах выделено в самостоятельную науку - **энзимологию**. Термин «энзим» (от греч. *enzyme* - в дрожжах), так же как и «фермент» (от лат. *fermentatio* - брожение), означает процесс, связанный с выделением газов, брожением.

В настоящее время учреждены научно-исследовательские институты по изучению ферментов, издаются специальные журналы, созываются национальные и международные симпозиумы и конференции, посвященные проблемам энзимологии. Наука о ферментах интенсивно развивается в тесной связи со многими науками, в частности с органической, неорганической и физической химией,

физиологией, токсикологией, микробиологией, генетикой, фармакологией и др. Таким образом, эта область знаний находится на стыке химических, биологических и биологических и медицинских наук.



Рис. 12. Области применения ферментов в биологии и медицине

Энзимология в ее современном физико-химическом и молекулярном понимании решает две главные, неразрывно связанные между собой проблемы: определение структурной макромолекулярной организации ферментов и изучение природы химических взаимодействий, лежащих в основе ферментативного катализа. Накопление экспериментальных данных и развитие теоретических представлений происходят настолько быстро, что любой учебник к моменту выхода в свет уже не отражает достаточно полно современное состояние вопроса о структуре и функциях ферментов.

Важно подчеркнуть, что изучение ферментов имеет огромное значение для любой фундаментальной и прикладной области биологии,

а также для многих практических отраслей химической, пищевой и фармацевтической индустрии, занятых приготовлением катализаторов, антибиотиков, витаминов и многих других биологически активных веществ, используемых в народном хозяйстве и медицине (см. рис.12).

Многие отрасли промышленности — виноделие, пивоварение, производство спирта, хлебопечение, сыроделие, производство органических кислот, чая, аминокислот, витаминов и антибиотиков, основаны на использовании различных ферментативных процессов. Поскольку каталитическое действие ферментов отличается исключительной эффективностью и специфичностью, не имеющей себе равных при неферментативном катализе, свойства ферментов и механизм их действия привлекают к себе пристальное внимание химиков, стремящихся на основе познания сущности ферментативного катализа создать новые, более совершенные катализаторы для химической промышленности.

Действие различных физиологически активных соединений, применяемых в медицинской и агрономической практике — лекарственных веществ, стимуляторов роста растений, гербицидов, фунгицидов и инсектицидов, в конечном счете сводится к тому, что эти соединения стимулируют или ингибируют то или иное звено в обмене веществ, тот или иной ферментативный процесс. Поэтому совершенно очевидно, что изучение закономерностей действия ферментов и влияния на них различных стимуляторов и ингибиторов имеет первостепенное значение для медицины и сельского хозяйства.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ: «ФЕРМЕНТЫ»

Лабораторная работа: Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов

Оборудование: Баня водяная; термометр лабораторный; штатив лабораторный с пробирками стеклянными химическими; пипетки с одной меткой на 1 мл (3 шт.); **Реактивы** крахмал (1 %-ный) в хлориде натрия (0,3%-ном); соляная кислота (10%-ная); иод (0,3%-ный) в иодиде калия(3%-ном); гидроксид натрия (10%-ный); сульфат меди(3%ный).

Ход работы: В три пробирки наливают по 5 мл 1%-ного раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую 1 - мл 10%-ной соляной кислоты, а в третью - 1 мл слюны. Пробирки 1 и 3 после перемешивания помещают в водяную баню при 38 ° С, а пробирку 2 - в кипящую водяную баню. Через 15-20 мин все пробирки вынимают из водяной бани, охлаждают и из каждой берут пробы для определения в них крахмала и глюкозы: первого - по реакции с иодом, второй - по реакции Троммера.

Стеклянной палочкой наносят по капле раствора из каждой пробирки на фарфоровую пластинку рядом с ранее нанесенной каплей раствора иода в иодиде калия, после чего капли соединяют и перемешивают. По интенсивности окраски пробы делают заключение о степени гидролиза крахмала. Для определения глюкозы из каждой пробирки берут по 3 мл раствора, добавляют 1 мл –10%ного раствора гидроксида натрия и несколько капель 3%-ного раствора сульфата меди. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появление желтого осадка оксида меди (I) или красного металлической меди указывает на наличие глюкозы.

Результаты опыта заносят в таблицу:

№ проб	Субстрат	Катализатор	Проба с иодом	Проба Троммера
1	Крахмал	-		
2	Крахмал	соляная кислота		
3	Крахмал	Амилаза слюны		

Лабораторная работа: Специфичность действия амилазы (α-1,4-глюкан - 4-глюканогидролаза; КФ 3. 2. 1. 1.) и сахаразы (3-О-фруктофуранозид - фруктогидролаза;

КФ 3. 2. 1. 26)

Оборудование. Термометр лабораторный; баня водяная; пипетки с одной меткой на 2 мл (4 шт.);

Реактивы: раствор слюны разбавленной препарат дрожжевой сахаразы (1%-ный), тростниковый сахар (2%-ный); сульфат меди (1%-ный); гидроксид натрия (10%-ный); иод (0,3%-ный) в иодиде калия (3%-ном); фелинговажидкость.

Ход работы: Нумеруют четыре пробирки. В пробирки 1 и 2

наливают по 2 мл раствора крахмала; в пробирки 3 и 4 - по 2 мл раствора сахарозы. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 0,5 мл раствора слюны, а в пробирки 2 и 4 - по 0,5 мл 1%-ного раствора препарата дрожжевой сахаразы. Перемешивают содержимое и ставят на 10 мин в водяную баню, нагретую до 38-40°C. После охлаждения проводят реакции (см. предыдущую работу.) с иодом на присутствие крахмала в пробах 1 и 2 и глюкозы - в пробах 3 и 4. Делают заключение о специфичности изученных ферментов.

Лабораторная работа: Специфичность действия

сукцинатдегидрогеназы

Оборудование: Термометр лабораторный: баня водяная; пипетки градуированные на 1 мл (3 шт.);

Реактивы: кашлица мышечная; янтарная кислота (3%-ная, нейтрализованная); яблочная кислота (3 %-ная нейтрализованная); метиленовый синий (0,02%-ная).

Ход работы: В три пронумерованные пробирки помещают 3-4 мл мышечной кашицы и добавляют: в первую - 0,5 мл 3 %-ного раствора янтарной кислоты, во вторую - 0,5 мл 3%- ного раствора яблочной кислоты и в третью - 0,5 мл воды. В каждую пробирку вносят по 2-3 капли 0,02%-ного раствора метиленового синего (до окрашивания смеси в голубой цвет). Содержимое пробирок перемешивают и одновременно помещают их в водяную баню при температуре 37-40°C. Через 5-10 мин наблюдается обесцвечивание метиленового синего в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания в двух других. Первую пробирку сильно взбалтывают, вновь появляется синее окрашивание вследствие окисления лейкооснования метиленовой сини кислородом воздуха.

Сукцинатдегидрогеназа (флавопротеид) окисляет янтарную кислоту в фумаровую. В роли промежуточного акцептора водорода в данном опыте выступает метиленовая синь, которая далее (при встряхивании) отдает принятый водород кислороду воздуха.

Лабораторная работа: Групповая специфичность действия сахаразы

(В-D-фруктофуранозид - фруктогидролаза; КФ 3. 2. 1. 26)

Оборудование:. Баня водяная; термометр лабораторный; пипетки градуированные на 2 мл. (3 шт.), 5 мл (2 шт.);

Реактивы: мука соевая (1%-ная); дрожжевая сахароза; сахароза (1%-ная); раффиноза (1%-ная); фелингова жидкость.

Ход работы: В одну пробирку наливают 2 мл 1%-ного раствора

сахарозы, а в другую - 2 мл 1%-ного раствора раффинозы. Добавляют в обе пробирки по 1 мл 1%-ного раствора препарата дрожжевой сахаразы и, перемешав содержимое каждой пробирки, ставят их на 5-10 мин в водяную баню при 35-40°C. Затем исследуют содержимое обеих пробирок на присутствие восстанавливающих углеводов. Для этого в обе пробирки наливают по 3 мл фелинговой жидкости, хорошо промешивают и смесь нагревают до кипения. В обеих пробирках проба с фелинговой жидкостью положительна, так как β - гликозидная связь гидролизуется в присутствии сахарозы, так и раффинозы.

Лабораторная работа: Абсолютная специфичность действия уреазы

(карбамидамидогидролаза; КФ 3. 5. 1. 5)

Оборудование: Пипетки с одной меткой на 5 мл (2 шт.);

Реактивы: соевая мука); красная лакмусовая бумажка, мочевины (5%-ная); ацетамид (5%-ный).

Ход работы: В одну пробирку наливают 5%-ный раствор мочевины, в другую - 5%-ный раствор ацетамида. Добавляют при помешивании в каждую пробирку около 1 г соевой муки. В отверстие каждой из пробирок помещают полоску влажной красной лакмусовой бумажки. Через несколько минут лакмусовая бумажка в пробирке с мочевиной синееет от выделяющегося аммиака, который можно обнаружить и по запаху. В пробирке с ацетамидом изменения окраски лакмусовой бумажки не наблюдается, что доказывает абсолютную специфичность действия уреазы. Напишите уравнение реакции.

Лабораторная работа: Влияние температуры на

активность амилазы слюны

Температура, соответствующая максимальной скорости ферментативной реакции, называется оптимальной ($T_{\text{опт}}$). Для большинства ферментов, выделенных из теплокровных животных, она равна 37-40°C. Как правило, ферментативные процессы не могут протекать при температуре выше 70°C. При переходе к субоптимальным температурам скорость ферментативного катализа падает, достигая при 0°C минимальной величины.

Оборудование: *Баня водяная; термометр лабораторный; пипетки на 1 мл, 2 мл; палочки стеклянные; пластинка фарфоровая;*

Реактивы: *слюна разбавленная, крахмал (1%-ный); иод (0.3 %-ный) в ио-диде калия (3 %-ном); гидроксид натрия (10 %-ный); сульфат меди (1%-ный).*

Ход работы: В четыре пронумерованные пробирки наливают по 2 мл 1%-ного раствора крахмала. Пробирку 1 помещают в кипящую водяную баню, пробирку 2 - в водяную баню при 40°C, пробирку 3 оставляют при комнатной температуре и пробирку 4 помещают в лед.

Через 10 мин, когда содержимое пробирок примет заданную температуру, во все пробирки добавляют по 0,5 мл разбавленной в 10 раз слюны, перемешивают с помощью стеклянной палочки и оставляют в тех же условиях. Наблюдение за ходом гидролиза крахмала ведут по реакции с иодом. Для этого наносят на фарфоровую пластинку несколько капель раствора иода в иодиде калия и смешивают их с каплями гидролизуемой смеси из каждой пробирки, беря пробы через 1, 2, 4, 6, 10 и 12 мин. По изменению окраски крахмала с иодом судят о степени гидролиза крахмала в каждой пробирке. Результаты наблюдений заносят в таблицу, пометчая буквой "с" (синяя окраска) положительную пробу с иодом на крахмал, буквой "к" - положительную пробу на декстрины (окраска красных тонов) и буквой "ж" - отрицательную пробу (желтая окраска иода).

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

NN пробиро к	T ⁰ С.в пробир .	Реакция с иодом по истечении времени(в мин.)							
		1	2	4	6	8	1	1	
							0	2	
1	100								
2	40								
3	15-20								
4	0								

Лабораторная работа: Определение оптимального значения рН для амилазы слюны

Оборудование: Фотозлектроколориметр; термостат; пипетки на 1 мл (2 шт.); бюретки прямые с краном на 50 мл (5 шт.); колбы конические на 100 и 250 мл; воронка;

Реактивы: иод (0,3%-ный в иодиде калия (3%-ном)); крахмал (0,1%-ный); дигидрофосфат калия (1/15 М) и гидрофосфат натрия (1/15 М); слюна, разбавленная в 40 раз.

Ход работы: Пробирки устанавливают в два ряда: по 5 шт. в каждом ряду. В пробирки первого ряда вносят по 0,2 мл разбавленного раствора слюны, в пробирки второго ряда - по 0,2 мл дистиллированной воды. Затем в каждую пробирку приливают из бюретки по 4 мл фосфатного буферного раствора таким образом, чтобы первые пробирки обоих рядов содержали буферный раствор с рН 5,59; вторые пробирки с рН 6,24; третьи с рН 6,98; четвертые с рН 7,38;

пятые с рН 8,04. Пробирки закрывают пробками и помещают в термостат при температуре 37°C на 10 мин, после чего во все пробирки вносят по 0,2 мл раствора крахмала, нагретого до 37°C. Содержимое пробирок перемешивают и пробы инкубируют в термостате в течение 10-15 мин при 37°C. Далее пробирки помещают в лед и в каждую пробирку прибавляют по 3-4 капли раствора иода, перемешивают содержимое и колориметрируют со светофильтром N 7.

Активность амилазы рассчитывают по разнице экстинкций между контрольной и опытной пробамии (с раствором слюны). $E_f = E_k - E_{оп}$, где, E_f - экстинкция, соответствующая активности амилазы в исследуемом растворе, E_k - экстинкция контрольной пробы; $E_{оп}$ - экстинкция опытной пробы.

На основании полученных данных строят график зависимости активности амилазы от величины рН и находят на нем оптимальное значение рН фермента, для чего на оси ординат откладывают значения E_f , на оси абсцисс - значение рН.

Лабораторная работа: Действие активаторов и ингибиторов на амилазу слюны

Большое влияние на активность ферментов оказывает присутствие в растворе некоторых химических соединений. Одни из них повышают активность ферментов (активаторы), другие понижают (ингибиторы). К активаторам относят многие ионы Na^+ , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} и др. Из ингибиторов ферментов известны соли синильной кислоты, угнетающие некоторые геминовые ферменты, моноиодусная кислота, приостанавливающая спиртовое и молочнокислое брожение, фосфорорганические соединения, необратимоинактивирующие ряд эстераз и др.

Оборудование: Термостат на 40°C; бюретки прямые с краном на 50 мл (2 шт.); пипетки с одной меткой на 1 мл (4 шт.); штатива

лабораторных с пробирками;

Реактивы: *слюна неразбавленная профильтрованная; крахмал (0,5%-ный); хлорид натрия (1%-ный); сульфат меди (1%-ный); иод (0,3%-ный) в иодиде калия (3 %-ном).*

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

Во все пробирки первого ряда наливают по 1 мл воды (контрольный ряд); в пробирки второго ряда - по 1 мл раствора хлорида натрия и в пробирки третьего ряда - по 1 мл раствора сульфата меди. Далее во все пробирки приливают из бюретки по 2 мл раствора крахмала в следующем порядке: сначала в первые номера всех рядов, затем во вторые и т.д. Содержимое пробирок перемешивают и ставят штативы с пробирками в термостат при 40°C на 15 мин.

По охлаждению в каждую из них добавляют по капле раствора иода в иодиде калия и отмечают в каждом ряду номер пробирки, в который реакция на крахмал отрицательна.

Для степени разведения контрольной пробы, в которой реакция с иодом отрицательна, на степень разведения соответствующих проб с исследуемыми эффекторами, вычисляют, во сколько раз активатор (NaCl.) или ингибитор (CuSO₄) стимулирует или тормозит действие амилазы слюны.

Ферментативный гидролиз белков

Степень распада белка при действии на него ферментов

(пептидогидролаз) можно проследить по увеличению количества α -аминных групп, освобождающихся при гидролизе пептидных связей белка в его растворе. Чем больше освободилось α -аминных групп, тем соответственно больше распалось пептидных связей и тем выше, следовательно, степень деструкции белковой молекулы.

Лабораторная работа: Накопление свободных α – аминок групп в процессе гидролиза белка при участии трипсина.

Трипсин представляет собой пептид-пептидогидролазу и специфически ускоряет реакцию гидролиза пептидных связей в тех точках полипептидной цепи белка, где расположены остатки аргинина и лизина. Наличие положительного заряда в аминокислотном радикале, расположенном рядом с пептидной связью, является причиной специфического ускорения трипсином гидролиза именно тех пептидных связей, которые образованы указанными аминокислотами:

Строение трипсина хорошо изучено. Этот белок с относительной молекулярной массой, равной 23 950, состоит из 228 аминокислотных остатков. Первичная структура трипсина полностью выяснена, и многое известно о его вторичной и третичной структурах. В частности, важнейшую роль в его каталитической активности играет активный центр, в состав которого входят радикалы серина (183-й аминокислотный остаток в молекуле) и гистидина (29-й и 46-й аминокислотные остатки в молекуле). Именно благодаря сочетанию перечисленных аминокислотных остатков в молекуле трипсина и осуществляется гидролиз пептидной связи. Механизм этого процесса выяснен.

Оборудование: Фотоэлектродколориметр; термостат; баня водяная; пробирки стеклянные (10 шт.); штатив лабораторный; пипетки

градуированные на 1 и 5 мл;

Реактивы: раствор казеина (10 мг в 1 мл). Навеску казеина растворяют в небольшой порции 0,1%-ного раствора карбоната натрия при осторожном нагревании, разбавляют дистиллированной водой и осторожно нейтрализуют 0,1 н. раствором соляной кислоты; раствор трипсина (0,25 мг в 1 мл); 0,2М трис-НСl буфер (рН 8,0) смешивают 50 мл 0,4М раствора триоксиметил-аминометана с 26,8 мл 0,4 н. раствора соляной кислоты и доводят до 100 мл дистиллированной водой; буферный раствор для проведения нингидриновой реакции (рН 5,3—5,4 растворяют 270 г ацетата натрия в 200 мл дистиллированной воды, добавляют 50 мл перегнанной уксусной кислоты и доводят до 750 мл дистиллированной водой); нингидрин (3%-ный) в свежеперегнанном метилцеллозольве; изопопиловый спирт (50%-ный).

В две пронумерованные пробирки вносят по 1 мл 0,2М трис-НСl буфера, рН 8,0 и по 1 мл 1%-ного раствора казеина. В одну из пробирок (опыт) приливают 1 мл 0,025%-ного раствора трипсина, в другую (контроль) — 1 мл 0,025%-ного раствора трипсина, заранее инактивированного длительным (не менее 1 ч) нагреванием на кипящей водяной бане. Растворы хорошо перемешивают и немедленно берут из каждой пробирки (в первую очередь из опытной, потом из контрольной) по 0,5 мл содержимого в две тщательно вымытые пробирки. Опытную и контрольную пробы ставят в термостат и инкубируют в течение 2 ч, отбирая из них аликвоты по 0,5 мл через 0,5; 1 и 2 ч.

В отобранных аликвотах проводят реакцию на наличие свободных α -аминогрупп, для чего их помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем охлаждают до комнатной температуры, после чего прибавляют по 0,5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл ацетатного буфера (рН 5,4) и 0,5 мл нингидринового реактива. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и помещают для развития окраски

в водяную баню при температуре 95°C на 7—10 мин. Затем, не вынимая пробирок из бани, прибавляют в каждую из них 5 мл 50%-ного раствора изопропанола.

Оптическую плотность опытной пробы измеряют против контроля на фотоэлектроколориметре при длине волны 507 нм (зеленый светофильтр).

Полученные результаты выражают графически, откладывая по оси абсцисс время инкубации, по оси ординат — значения оптических плотностей. Полученная кривая наглядно демонстрирует динамику высвобождения во времени свободных аминокрупп в процессе гидролиза казеина в присутствии трипсина.

Лабораторная работа: Исследование действия липазы поджелудочной железы

Жиры, или триацилглицерины, практически не всасываются в пищеварительном тракте. В тонкой кишке происходит их гидролиз, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой. Существует несколько типов панкреатических липаз. Одни из них специфичны в отношении эфирных связей в α -положении триацилглицерина, а другие гидролизуют связи в β -положении. Полный гидролиз триацилглицеринов происходит поэтапно: сначала ферментами атакуются

β - и β -связи, а затем более медленно гидролизуются α -моноацилглицерины. Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, а также ди- и моноацилглицерины) всасываются в стенки кишечника.

В процессе переваривания и всасывания липидов важную роль играют желчные кислоты. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов

переваривания.

Оборудование. Колбы вместимостью 25 мл; мерные цилиндры вместимостью 10 мл; пипетки на 2 мл; стаканчики для титрования; термостат (38—40 °С); кипящая водяная баня; микробюретки; бюретки.

Реактивы. 1. Молоко, разбавленное в соотношении 1:10. 2. 0,1 % раствор фенолфталеина в растворе 60 % этилового спирта. 3. 0,01 % раствор гидроксида натрия.

Материал для исследования. *Приготовление вытяжки из поджелудочной железы.* Поджелудочную железу сразу после забоя животного измельчают на мясорубке, добавляют 3—4 мл желчи и растирают в фарфоровой ступке стеклянным пестиком в течение 30 мин. Смесь переносят в посуду из темного стекла и заливают 4 объемами водного глицерина (2 части глицерина + 1 часть воды). Добавляют несколько кристаллов тимола и оставляют на 2—3 дня. Затем смесь фильтруют через марлю. Экстракт хранят в холодильнике (в этих условиях активность сохраняется в течение 1 года). Перед употреблением вытяжку разводят 4 объемами воды (рН раствора 7,0-8,0).

В качестве источника липазы могут служить таблетки панкреатина, которые смачивают водой и после удаления оболочки растирают в ступке. Для работы используется 10 % водная суспензия.

Ход работы. 1. Готовят 2 колбы (или стаканчика) для опытной и контрольной проб. Для контрольной пробы липазу предварительно кипятят в течение 10 мин на кипящей бане. В каждую колбу наливают молоко и препарат липазы, как указано в таблице 1.

Таблица 1

Компоненты инкубационной смеси	Опыт, мл	Контроль, мл
Молоко (разведенное в соотношении 1:10)	10	10
Препарат липазы (прокипяченный)	1	1

2. Приготовленные инкубационные смеси тщательно перемешивают. Затем из каждой колбы отбирают по 2 мл смеси в заранее приготовленные стаканчики для титрования. В каждый стаканчик добавляют по 1—2 капли раствора фенолфталеина и титруют раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания. При первом титровании нейтрализуются органические кислоты — молочная и другие, которые присутствовали в молоке до начала действия липазы.

3. Оставшуюся в колбах смесь помещают в термостат, температура которого 38—40°C, и через определенные интервалы (15, 30, 90 мин) из каждой пробы отбирают (не вынимая из термостата) по 2 мл смеси и титруют 0,01 моль/л раствором гидроксида натрия. Время титрования и объем израсходованного гидроксида натрия фиксируют в таблице 2.

Таблица 2.

Время инкубации,	Объем 0,01 моль/л NaOH, пошедшего на титрование, мл

мин	Опытная проба	Контрольная проба
0		
15		
30		
60		
90		

4. Результат первого титрования, полученного до начала действия липазы, вычитают из результатов последующих титрований.

5. На основании полученных данных строят график, где по оси абсцисс откладывают время (в минутах), а по оси ординат — активность липазы, выраженную объемом 0,01 моль/л раствора гидроксида натрия (в миллилитрах), пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени.

Оформление работы. В рабочую тетрадь записывают принцип метода и сделанные выводы, рисуют график.

Лабораторная работа Влияние температуры на активность амилазы слюны.

Ход работы.

1. Наливают в четыре пробирки по 0,5 мл раствора крахмала. Еще в 4 пробирки наливают по 0,5 мл разбавленной /1:10/ слюны.

2. Берут 1 пару пробирок /одна с ферментом, другая с крахмалом / и помешают в баню со льдом. Вторую пару оставляют при комнатной температуре. Третью пару пробирок помешают в термостат /40 градус С / а четвертую в кипящую водяную баню.

3. Через 10 минут содержимое каждой пары пробирок сливают вместе, тщательно перемешивают и оставляют стоять еще 10 мин в тех же условиях.

4. Из 3 пробирки отбирают 3 капли жидкости и проделывают реакцию с каплей йода на стекле. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще 10-мин и после этого повторяют реакцию йодом на стрелке. Затем добавляют 2 капли раствора йода во все пробирки и наблюдают за появлением окрашивания.

Лабораторная работа: Влияние рН на активность амилазы слюны.

Оптimum рН для действия амилазы слюны можно определить при взаимодействии ее с крахмалом при различных значениях рН среды. О степени расщепления крахмала можно судить по реакции крахмала с раствором йода с течением времени. При оптимальном значении рН расщепление крахмала произойдет полностью /окраска с йодом отсутствует/. По мере удаления от точки оптимального рН в кислую или щелочную зону расщеплением крахмала произойдет только частично до стадии декстринов или крахмал вообще расщепляться не будет.

Ход работы.

1. Перед началом работы готовят раствор амилазы и определяют ее активность. Для этого смешивают 1 мл раствора крахмала и 0,5 мл разбавленной 1:10 слюны. Через каждые 2 мин отбирают по 1 капле этой смеси и смешивают ее с каплей раствора йода на предметном стекле. Крахмал должен полностью расщепляться приблизительно за 10 мин. Если расщепление происходит быстрее, слюну надо развести еще в 2, 3 или 4 раза.

2. В 8 пронумерованных пробирок добавляют по 2 мл фосфатного буфера с различным рН /от 5, 4 до 8, 0/.

Пробирки 1 2 3 4 5 6 7 8

рН 5,4 5,8 6,2 6,6 6,8 7,0 7,4 8,0

3. В каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора крахмала и по 0,5 мл приготовленного раствора слюны /разбавленного в зависимости от активности амилазы 1:10, 1:20, 1:50 и оставляют в штативе на столе в течении 10-мин.

4. Из каждой пробирки каплю жидкости смешивают с каплей раствора йода на предметном стекле и сравнивают окрашивание каждой пробирки. Повторяют эту пробу через 1-2 мин до тех пор, пока, из пятой пробирки даст с йодом на предметном стекле красно-бурое окрашивание. Через 1-2 мин после этого во все пробирки добавляют по 2-3 капли раствора йода /начинать с первой пробирки/. Сравнивают между собой окрашивание во всех пробирках и делают вывод о степени расщепления крахмала а следовательно, об активности фермента при этом значении рН среды.

Оформления работы. Результаты вносить в таблицу.

Пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8
рН	5,4	5,8	6,2	6,6	6,8	7,0	7,4	8,0
Окрашивание с йодом								

Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны.

Активаторы стимулируют действие ферментов, но в отличие от коферментов не принимают участия в реакции.

Активатор некоторых ферментов: для амилазы слюны - хлорид

натрия, для пепсина - ионы H^+ хлористоводородной кислоты, для липазы - желчные кислоты, для аденозинатрифосфатазы – Mg^{2+} Mn^{2+}

Аутоактивация процесс перехода профермента в фермент при участии активного фермента того же фермента. Например, активный пепсин вызывает аутокатализ пепсиногена. При активации идет перестройка профермента, устраняется ингибитор и формируется активный центр.

Активаторы и ингибиторы влияют на активный центр фермента, способствуют его образованию или блокированию. Они могут взаимодействовать с аллостерическим центром и тем самым менять ферментативную активность. Например, сульфат меди оказывает тормозящее действие на активность амилазы. При ингибировании (конкурентном) активный центр фермента соединяется с аналогом субстрате, т.е. с веществом, близким по строению к субстрату. Ингибиторами нередко являются продукты промежуточных или конечных реакций какого-либо биохимического процесса. Некоторые природные или синтетические вещества оказывают ингибирующее действие на ферменты и используются в качестве лекарственных веществ. В больших дозах подобные вещества могут оказаться ядами.

Ход работы:

В три пробирки наливают по 1 мл слюны, разведенной в 40 раз. В зависимости от активности слюны ее можно разводить в 10, 20, 40, 50 раз. В 1-ю пробирку добавляют 2 капли воды. Во 2-ю-2 капли 1% раствора $NaCl$, в 3-ю-2 капли 1% раствора $CuSO_4$. После этого в каждую пробирку добавляют по 5 капель 1 % раствора крахмала. Все три пробирки оставляют при комнатной температуре на 2 мин, затем во все пробирки добавляют, на 1 капле растворе йода, перемешивают, наблюдают окраску и определяют, в какой пробирке действует активатор или ингибитор. Целесообразно в

каждую пробирку добавить воды (примерно 2 мл) и перемешать окраска будет более наглядной.

Лабораторная работа. Специфичность ферментов.

Ферменты обладают специфичностью так как способны катализировать только определенные химические реакции.

Специфичность действия ферментов бывает абсолютная, относительная групповая и стереохимическая. Ферменты неспецифичны в отношении как катализируемых реакций, так и субстратов, на которых они действуют. Некоторые ферменты абсолютной специфичностью действуя только на один какой либо субстрат. Высокая специфичность ферментов определяется тем, что только некоторые строго определенные функциональные группы, входящих в состав ферментов, могут участвовать в образовании фермент-субстратных комплексов.

Амилаза слюны ускоряют гидролиз только полисахаридов, не оказывая действия на дисахариды Мальтоза слюны ускоряет гидролиз дисахарид мальтозы, образующегося при гидролизе крахмала, но не оказывает никакого действия па другой дисахарид сахарозу. Сахароза не имеет свободной альдегидной группы, потому не дает реакции с реактивом Фелинга. Реакция может быть положительной только в том случае, если сахароза расщепится на свои составные части- глюкоза и фруктозу.

Ход работы.

В 2 пробирки приливают по 5 капель слюны. Разведенной в 5 раз. В 1-ю пробирку добавляю 10 капель 1 % раствору крахмала, во 2-ю-10капель 1% раствора сахарозы. Обе пробирки помещают на 10 мин в термостат или водяную баню при температуре 38 градус С, после чего содержимое их проделывают реакцию с реактивом Фелинга.

Выводы:

Лабораторная работа. Влияние количества амилазы на скорость расщепления крахмала **Ход работы.** Работы выполняется по таблице.

Опыт пробирки	Раствор хлорида натрия мл	Раствор крахмала	Дис. вода мл	Амилаза мл
1	0,5	1,0	0,9	0,1
2	0,5	1,0	0,7	0,3
3	0,5	1,0	0,5	0,5
4	0,5	1,0	0,3	0,7

Пробирки помещают в термостат при 38⁰С на 15мин. Через некоторое время определяется разное количество фермента на скорость на расщепления крахмала, /йодная проба/.

Работа №2. Определение активности амилазы слюны, /Кушманова, стр.74 раб, 28 метод основан на определении наименьшего количество амилазы/ при максимальном разведении слюны полностью расщепляющий весь добавленный крахмал амилазная активность слюны выражается количеством 0,1 % раствора крахмала в миллилитрах, которое расщепляется в 1 мл неразбавленной слюны при температуре 38⁰С в течение 30 мин. В норме амилазная активность слюны равна 160-320. Амилазная активность обозначается А /-38 / 30.**Ход работы:** В 10 пробирок наливают по 1 мл воды и в 1-ю из них добавляют 1мл разведенной а 10 раз слюны. Содержимое этой пробирки перемещивают несколько раз втягивая и выпуская жидкость из пипетки. Набирают в пипетку 1мл 2 смеси и переносят ее во 2-ю пробирку. Содержимое этой

пробирки перемешивают и 1 мл смеси переносят в 3-ю пробирки и т.д. до 10-й пробирки. Из 10-й пробирки отбирают 1 мл смеси и выливают. Во все пробирки добавляют по 1 мл воды и по 2 мл 0,1% раствор крахмала, перемешивают, встряхивают пробирки и помещают в термостат при 38°C на 30 мин. После инкубации охлаждают водопроводной водой, добавляют по 1 капле 0,1% раствора йода и перемешивают. При реакции с йодом жидкость в пробирках окрашивается в желтоватый, розовый, фиолетовый цвет. Отмечают последнюю пробирку с желтоватой окраской, где гидролиз крахмала прошел полностью и делают расчет: полученные данные заносят в таблицу. Таблица. Гидролиз крахмала в присутствии ферментов слюны при различном ее разведении.

<i>Пробирки</i>									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Разведение слюны</i>									
1:2	1:4	1:8	1:6	1:32	1:64	1:128	1:156	1:512	1:1024
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Окраска раствора с йодом

Расчёт. Отметив пробирку, где гидролиз крахмала прошёл полностью при наименьшем количестве фермента, по количеству неразведённой слюны в данной пробирке рассчитывают амилазную активность слюны по следующей пропорции: А мл слюны расщепило 2 мл 0,1% раствора крахмала; 1мл слюны расщепил х мл 0,1% раствора крахмала, где А- количество неразведённой слюны. Например, желтоватая окраска появилась в 4-й пробирке, где слюна была разведена в 160 раз; 1/160 мл слюны расщепила 2 мл 0,1% раствора крахмала; 1мл неразведённой слюны расщепил х мл 0,1% раствора крахмала: $x = \frac{2 \cdot 160}{1} = 320$ мл 0,1% раствора крахмала. Следовательно, амилазная активность слюны А

38/30 равна 320.

Лабораторная работа. Качественная реакция на витамина В₁(тиамин).

Витамин В₁, состоит из пиримидинового и тиазолового колц. Витамин В₁ получил название тиамин который содержит серу и азот.

Тиаминпирофосфат (коферментная форма тиамин) синтезируется в печени путем прямого переноса пирофосфата от АТФ а в других тканях - ТТФ (тиаминтрифосфат).

Тиаминпирофосфат участвует в окислительном карбоксилировании альфа -кетокислоты в транскетолазной реакции, входя в состав ферментов, участвующих в углеводном обмене. Недостаток витамина В₁ в пище вызывает поражение периферической нервной системы ,известной под названием «бери-бери» При этом накапливаются пировиноградная кислота и другие альфа кетокислоты.

Реакция окисления.

Принцип метода. В щелочной среде тиамин окисляется в тиохром феррицианидом калия. Тиохром обладает синей флюоресценцией при ультрафиолетовом облучение раствора на флюороскопе.

Порядок выполнения работы.

К 1капле 5% раствора тиамин прибавляют 5 -10 капель 10% раствора едкого натрия, 1 -2 капли 5% раствора феррицианида калия и взбалтывают. Прогрев флюороскоп в течение 10 минут. Наблюдают синюю флюоресценцию при облучение раствора ультрафиолетовыми лучами.

Диазореакция.

Принцип метода. В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексной соединение оранжевого цвета.

Порядок выполнения работы.

К диазореактиву, состоящему из 5 капель 1% раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5 % раствора нитрата натрия, добавляют 1 -2 капли 5% раствора тиамин и затем по стенке наклонив пробирку, осторожно добавляют 5 -7 капель 10% раствора бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

Качественная реакция на витамин В₂. Рибофлавин состоит из изоаллоксазинового ядра и спирта рибитола:

Рибофлавин входит в состав простатической группы флавиновых ферментов-флавопротеидов в виде коферментов флавинадениндинуклеотида (ФАД) и флавинаденинмононуклеотида (ФМН). Флавопротеиды активируют реакции дегидрирование, т.е. отщепления протонов и электронов от субстрата. Они участвуют в окислении Д-аминокислот, Бетто-окислитокилот, НАДН (Н⁺) в биологическом окислении и др. Биологическое действие флавиновых ферментов связано с наличием в изоаллоксазиновом кольце двойных связей, флавиновый фермент отнимает от окисляемой молекулы два электрона присоединяя их к азоту по месту двойных связей, и два протона.

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

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

Порядок выполнения работы. В пробирку наливают 10 капель

раствора витамина В₂ ,добавляют 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и опускают зерно металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается. Сравнивают обе формы витамина В₂ по флюоресценции, поместив каждую пробирку у флюороскопа.

Качественная реакция на витамин РР.

Витамин РР является производным пиридинового ядра. Антипеллагрической активностью, помимо никотиновой кислоты обладает и ее амид:

В организме человека и животных витамин РР находится в основном в связанном с белками состоянии. Из витамина РР находится связанным с белками. Из витамина РР образуется два кофермента: никотин амидадениндинуклеотид -НАД + и никотинамидадениндинуклеотидофосфат НАДФ +. Эти коферменты входят в состав ферментов дегидрогеназ и участвуют во многих окислительно-восстановительных реакциях. НАД + и НАДФ + присоединяют к себе протоны и электроны от окисляемых субстратов при этом в их молекулах восстанавливается остаток ниацина.

Отсутствие витамина РР в пище вызывает пеллагру.

Принцип метода. Витамин РР при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок медной соли никотиновой кислоты, плохо растворимый.

Порядок выполнения работы.

Перед определением 3 % раствора витамина РР следует обязательно взболтать затем набирают в пробирку 20 капель его и нагревают до кипения: при этом мутный раствор становится прозрачным. Взболтав 5% раствор ацианита меди, приливают 20 капель его к нагретому раствору витамина РР. Затем содержимое пробирки доводят до кипения и сразу охлаждают ее под струей холодной воды: на дне пробирки выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ И КОНТРОЛЯ УСВОЕНИЯ ТЕМЫ «ФЕРМЕНТЫ»

1. Общие свойства неорганических катализаторов и ферментов.
2. Отличия неорганических катализаторов и ферментов.
2. Специфичность ферментов, виды, характеристика, примеры.
3. Классификация и номенклатура ферментов.
3. Структурная организация ферментов. Роль белковой и небелковой части сложных ферментов.
4. Функциональная организация ферментов: активный центр ферментов, строение, роль в реакциях ферментативного катализа. Аллостерический центр.
5. Стадии ферментативного катализа. Механизм действия ферментов.
6. Изоферменты
7. Зависимость активности ферментов от температуры, pH, концентрации ферментов.
8. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.
9. Классификация ингибиторов ферментов.
9. Конкурентные ингибиторы, механизм действия, изменение кинетики ферментативного катализа, примеры. Конкурентные ингибиторы как лекарственные препараты.
10. Неконкурентные ингибиторы, механизм действия, изменение кинетики ферментативного катализа.
11. Ингибиторы необратимого действия, механизм ингибирования ферментов.

12. Активаторы ферментов.
13. Регуляция активности ферментов.
 14. Кооперативные эффекты в регуляции активности ферментов.
15. Аллостерическая регуляция активности ферментов.
16. Единицы активности ферментов.
 17. Применение ферментов в различных отраслях народного хозяйства.

ЛИПИДЫ. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ.

Липиды представляют собой обширную группу соединений, существенно различающихся по своей химической структуре и функциям. Поэтому трудно дать единое определение, которое подошло бы для всех соединений, относящихся к этому классу.

Можно сказать, что липиды представляют собой группу веществ, которые характеризуются следующими признаками: нерастворимостью в воде; растворимостью в неполярных растворителях, таких, как эфир хлороформ или бензол; содержанием высших алкильных радикалов; пространенностью в живых организмах.

Под это определение попадает большое количество веществ, в том числе такие, которые обычно причисляют к другим классам соединений: например, жирорастворимые витамины и их производные, каротиноиды, высшие углеводороды и спирты. Включение всех этих веществ в число липидов в известной степени оправдано, потому что в живых организмах они находятся вместе с липидами и вместе с ними экстрагируются неполярными растворителями. С другой стороны, имеются представители липидов, которые довольно хорошо растворяются в воде (например, лизолецитины). Термин «липиды» является более общим, чем термин «липоиды», который объединяет

группу жироподобных веществ, таких, как фосфолипиды, стерины, сфинголипиды и др.

Липиды играют важнейшую роль в процессах жизнедеятельности. Будучи одним из основных компонентов биологических мембран, липиды влияют на их проницаемость, участвуют в передаче нервного импульса, создании межклеточных контактов. Жир служит в организме весьма эффективным источником энергии либо при непосредственном использовании, либо потенциально - в форме запасов жировой ткани. В натуральных пищевых жирах содержатся жирорастворимые витамины и «незаменимые» жирные кислоты. Важная функция липидов - создание термоизоляционных покровов у животных и растений, защита органов и тканей от механических воздействий.

Существует несколько классификаций липидов. Наибольшее распространение получила классификация, основанная на структурных особенностях липидов. По этой классификации различают следующие основные классы липидов. *А. Простые липиды:* сложные эфиры жирных кислот с различными спиртами.

Глицериды (ацилглицерины или ацилглицеролы - по международной номенклатуре) представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот.

Воска: сложные эфиры высших жирных кислот и одноатомных или двухатомных высших спиртов.

Б. Сложные липиды: сложные эфиры жирных кислот со спиртами, дополнительно содержащие и другие группы.

1. *Фосфолипиды:* липиды, содержащие, помимо жирных кислот и спирта, остаток фосфорной кислоты. В их состав часто входят азотистые основания и другие компоненты:

а) *глицерофосфолипиды* (в роли спирта выступает глицерол);

б) *сфинголипиды* (в роли спирта - сфингозин).

2. *Гликолипиды*

(гликофинголипиды).

3. *Стероиды.*

4. *Другие сложные липиды: сульфоллипиды, аминоллипиды. К этому классу можно отнести илипопротеины.*

В. Предшественники и производные липидов: жирные кислоты, глицерол, стеролы и прочие спирты (помимо глицерола и стеролов), альдегиды жирных кислот, углеводороды, жирорастворимые витамины и гормоны.

Переваривание липидов

Суточная потребность человека в жирах составляет 70–80 г, хотя в пище-вом рационе их содержание может колебаться от 80 до 130 г. У взрослых лю-дей расщепление пищевых жиров начинается в двенадцатиперстной кишке.

Обязательным условием переваривания является эмульгирование — снижение поверхностного натяжения на границе раздела вода — жир, так как жиры ги-дрофобны и содержатся в клетках в виде безводных капель. Основную роль в этом процессе играют желчные кислоты, входящие в состав желчи.

Будучи амфифильными молекулами, они окружают каплю жира и способству-ют ее дроблению на множество мелких капелек. Таким образом молекулы жира становятся доступными для действия липаз, содержащихся в соке поджелудоч-ной железы. В эмульгировании пищевого жира помимо мицелл желчи, в состав . которых входят фосфолипиды: желчные кислоты: холестерол в соотношении 1 : 12,5 : 2, участвуют ионы K^+ , Na^+ , соли высших жирных кислот, CO_2 , бикар-бонаты панкреатического сока и перистальтика кишечника. Желчные кислоты, синтезированные в печени, на $2/3$ конъюгированы, т.е. образуют производные с молекулами глицина и таурина, что усиливает эмульгирующие свойства этих соединений. В просвете кишечника происходит

активация панкреатической липазы за счет присоединения к ферменту белка-активатора колипазы, который тоже синтезируется в поджелудочной железе и поступает в кишечник в составе панкреатического сока. Образование комплекса липазы и колипазы изменяет конформацию фермента, активирует его и смещает рН действия с 9,0 до 6,0. Панкреатическая липаза — гидролаза, отщепляющая с высокой скоростью жирные кислоты из α -положений молекулы, поэтому основными продуктами гидролиза ТАГ являются моноацилглицеролы (2-МАГ) и жирные кислоты.

В составе сока поджелудочной железы присутствуют и другие гидролазы, участвующие в расщеплении липидов пищи. Это — холестеролэстераза, катализирующая расщепление эфиров холестерола до высших жирных кислот и свободного холестерола, и набор фосфолипаз, расщепляющих фосфолипиды на высшие жирные кислоты, глицерол, остаток фосфорной кислоты и азотистое основание: холин, серин или этаноламин. Переваривание ТАГ молока у грудных детей и детей младшего возраста. В состав ТАГ молока входят жирные кислоты с короткой длиной цепи от 4 до 12 углеродных атомов. В секреторных железах языка и желудка синтезируется липаза, работающая при рН 7,0. Она отщепляет в желудке остаток одной жирной кислоты из α -положения ТАГ молока. Освободившаяся жирная кислота всасывается в желудке или кишечнике, а диацилглицерол (ДАГ) поступает в кишечник и подвергается гидролизу панкреатической липазой до МАГ и жирной кислоты. Всасывание продуктов гидролиза липидов

Плохо растворимые в водной среде продукты гидролиза липидов: высшие

жирные кислоты, 2-МАГ, холестерол, а также поступившие с пищей жирорастворимые витамины А, Д, Е, К включаются в мицеллы желчи, образуя смешанные мицеллы. В такой форме они всасываются

клетками слизистой оболочки

кишечника. При всасывании этот сложный надмолекулярный комплекс распадается. Желчные кислоты с током крови поступают в печень, а оттуда через желчные протоки в желчный пузырь и затем в составе мицелл желчи снова изливаются в кишечник. Из кишечника около 5% желчных кислот выводится с калом, а основная масса всасывается, циркулируя из печени в желчный пузырь, кишечник и снова в печень. Этот кругооборот желчных кислот получил название энтерогепатической циркуляции. Потери желчных кислот в кишечнике восполняются за счет синтеза в печени из холестерина. Глицерол, будучи веществом хорошо растворимым в водных средах, всасывается без участия желчи. Нарушения, вызванные снижением поступления панкреатической липазы

(при панкреатите) или желчи при недостаточном желчеобразовании или закупорке желчных протоков (желчнокаменная болезнь), снижают скорость гидролиза липидов и сопровождаются стеатореей — появлением нерасщепленных жиров в составе фекалий. При этом снижается всасывание полиеновых жирных кислот и жирорастворимых витаминов: А, Д, Е, К, что приводит к

развитию гиповитаминозов.

Ресинтез экзогенных ТАГ в клетках слизистой

кишечника и их транспорт по крови. Из продуктов гидролиза жиров в клетках слизистой кишечника идет синтез ТАГ. Предварительно жирные кислоты активируются при участии ацил-КоА-синтетаз, специфичных к длине углеводородного радикала. Существует три вида ферментов: один активирует жирные кислоты, включающие 2–3 углеродных атома, другой специфичен к жирным кислотам со средней длиной цепи в 4–12 углеродных атомов, а третий превращает в ацил-КоА длинноцепочечные жирные кислоты, состоящие из 12–24 углеродных атомов.



Далее активированные жирные кислоты достраивают 2-МАГ до ТАГ при участии ферментов — трансацилаз или ацилтрансфераз. Гидрофобные ТАГ включаются в водорастворимые надмолекулярные комплексы — хиломикроны (рис. 9.6), представляющие собой один из видов липо-протеинов, обеспечивающих транспорт жиров по крови. Они являются сферическими частицами, внутреннее содержимое которых образуют ТАГ и эфиры холестерина, а наружную оболочку — фосфолипиды, холестерол и белки: интегральные (пронизывающие фосфолипидный слой) и периферические (взаимодействующие с наружным слоем мембраны). В составе хиломикронов (ХМ) экзогенные жиры через лимфатическую систему поступают в кровоток, где помимо ХМ, основной транспортной формы

экзогенного жира, присутствуют и другие липопротеины. Так: липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) транспортируют синтезированные в печени эндогенные жиры и холестерол; липопротеины промежуточной плотности (ЛППП) образуются из ЛПОНП под действием ЛП-липазы, расположенной на стенках сосудов, и являются предшественниками ЛПНП; липопротеины низкой плотности (ЛПНП) переносят холестерол к тканям. Липопротеины высокой плотности (ЛПВП) обеспечивают доставку белков на другие липопротеины и перенос холестерола от тканей в печень. В кровеносном русле ХМ контактируют с ЛПВП и между ними происходит обмен мембранными белками — аполипопротеинами. ХМ получают от ЛПВП Апо СII и Апо Е, а хиломикроны отдают на ЛПВП Апо АI. Получив Апо СII и Апо Е, ХМ из незрелой формы превращаются в зрелые частицы, так как эти белки обеспечивают дальнейший метаболизм ХМ. Апо СII — активатор ЛП-липазы, фермента, локализованного на эндотелии сосудов. С помощью Апо СII

ХМ связываются с ЛП-липазой, которая гидролизует находящиеся внутри частиц ТАГ на глицерол и высшие жирные кислоты (ВЖК). ХМ на 85–90 % состоят из ТАГ, по-этому, теряя жиры, они превращаются в остаточные ХМ. Последние возвращают АпоСII на ЛПВП и удаляются из кровотока с помощью Апо E. Рецепторы клеток печени связываются с этим белком и поглощают частицы по механизму эндоцитоза (рис. 9.7). В клетках печени эндосомы сливаются с лизосомами, и содержащее остаточных хиломикрон гидролизуют лизосомальные ферменты. Образующиеся продукты используются для внутренних нужд органа. Эндогенный синтез жиров в период пищеварения. В абсорбтивный период или период пищеварения часть энергоносителей, таких, как глюкоза и жирные кислоты, запасаются в виде ТАГ в специализированных клетках жировой ткани — адипоцитах. В этот период в крови повышается концентрация глюкозы и увеличивается инсулин/глюкагоновый индекс. Инсулин индуцирует синтез ЛП-липазы и ускоряет поступление экзогенных высших жирных кислот в адипоциты, где они используются на синтез ТАГ. Утилизация глюкозы печенью, мышцами и жировой тканью активируется инсулином, так как он стимулирует включение переносчиков глюкозы GLUT-4 в мембраны жировой и мышечной тканей и таким образом делает их проницаемыми для глюкозы. В печени гормон индуцирует синтез глюкокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы, которые часть глюкозы, не использованной на синтез гликогена, окисляют в гепатоцитах до пирувата в процессе аэробного гликолиза. Процесс ускоряется не только за счет увеличения количества этих ферментов, но и благодаря тому, что инсулин, активируя специфическую фосфопротеинфосфатазу, переводит БИФ-фермент и пируваткиназу в дефосфорилированную форму. В этих условиях ускоряется синтез фруктозо-2,6-фосфата — мощного активатора фосфофруктокиназы и

пирувата из фосфоенолпирувата.

Синтез высших жирных кислот Пируват из цитозоля транспортируется в митохондрии, где частично подвергается окислительному декарбоксилированию ПДК комплексом с образованием ацетил-КоА, и карбоксилируется пируваткарбоксилазой с образованием окса-лоацетата.

Оба продукта в реакции, катализируемой ферментом ЦТК — цитратсинтазой, превращаются в цитрат и с помощью соответствующей транслоказы покидают митохондрии. Утечка цитрата в цитозоль объясняется тем, что в абсорбтивный период в митохондриях образуются большие количества АТФ и NADH, которые, являясь аллостерическими ингибиторами изоцитратдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса, снижают использование цитрата в цитратном цикле.

В цитозоле цитрат распадается на оксалоацетат и ацетил-КоА при участии

фермента цитратлиазы. Ацетил-КоА вовлекается в синтез высших жирных кислот, а оксалоацетат под действием цитоплазматической малатдегидрогеназы востанавливается в малат, который либо с помощью соответствующей транслоказы возвращается в митохондрии, либо с помощью малик-фермента

подвергается окислению и декарбоксилированию с образованием пирувата и

NADPH-донора водорода в реакциях восстановления при синтезе ВЖК.

Инсулин индуцирует синтез цитратлиазы и малик-фермента. Реакция, катализируемая цитратлиазой, идет с затратой молекулы АТФ, энергия которой затрачивается на образование макроэргической связи между остатком ацетила и HS-КоА. Основную регуляторную реакцию синтеза ВЖК катализирует биотин-содержащий

фермент — ацетил-КоА-карбоксилаза, в ходе которой ацетил-КоА превращается в малонил-КоА.

Благодаря ключевому положению этой реакции в синтезе ВЖК активность ацетил-КоА-карбоксилазы может изменяться в широких пределах путем:

- ассоциации и диссоциации протомеров. Цитрат стимулирует ассоциацию и повышает активность фермента, а увеличение концентрации ацил-КоА ускоряет диссоциацию протомеров и снижает активность фермента;

- фосфорилирования и дефосфорилирования. Инсулин стимулирует дефосфорилирование и повышает активность фермента, а глюкагон и адреналин — фосфорилирование и его инактивацию — индукции синтеза новых молекул фермента под влиянием инсулина. Инсулин индуцирует также синтез полифункционального фермента — пальмитилсинтазы, или синтазы высших жирных кислот. Семь активных центров этого фермента способны катализировать ряд последовательных реакций. Процесс но-сит циклический характер, в ходе каждого цикла происходит удлинение жирной кислоты на два углеродных атома. Промежуточные продукты синтеза остаются связанными с ферментом вплоть до образования пальмитиновой кислоты.

Фермент состоит из двух идентичных протомеров, на каждом из которых имеются две функционально активные $-SH$ -группы: одна принадлежит остатку цистеина — $S1H$, а другая — 4-фосфопантетеинтиоэтаноламину — $P-S2H$, который содержит производное витамина В 5 — пантотеновой кислоты и присоединен к радикалу серина в составе фермента. Процесс начинается с переноса ацетильного остатка от ацетил-КоА на $H S1$ - группу фермента при участии активного центра, обладающего ацетилтрансферазной активностью. Затем центр с активностью малонилтрансферазы

присоединяет остаток малонила от малонил-КоА к H S₂-группе того же протоме-ра (реакция 1). В реакции 3 катализируемой кетоацилсинтазным центром аце-тильный остаток перебрасывается на малонильный остаток на место –COOH-группы, которая вытесняется из молекулы в виде CO₂. Образуется первый помежуточный продукт синтеза — ацетоацетил-Е (Е — фермент), связанный с S₂-группой фермента тиоэфирной связью.

Последующие реакции направлены на восстановление β-кетогруппы и пре-ращение остатка ацетоацетил-Е в бутирил-Е. При этом субстрат, ковалентно связанный с ферментом, с помощью фосфопантетеинтиоэтаноламиновой «руки» перемещается из одного активного центра в другой, где подвергается соответ-ствующим превращениям. На стадиях восстановления затрачивается 2 молекулы NADPH + H⁺, которые организм получает частично из пентозофосфатного пути, частично за счет работы малик-фермента. Обеспеченность коферментами до стигается благодаря тому, что в абсорбтивный период инсулин индуцирует син-тез малик-фермента и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы — первого NADPH-образующего фермента окислительной фазы пентозофосфатного пути.

Конечный продукт первого цикла синтеза бутирил-Е, связанный тиоэфирной связью с S₂ группой фермента, перемещается на H S₁-группу, а к освободившейся Р –S₂ Н-группе присоединится новый остаток малонила и начинается следую-щий цикл синтеза, в ходе которого остаток бутирила удлиняется еще на 2 угле-родных атома с образованием шестиуглеродной кислоты. В результате семи оборотов цикла получается пальмитил-Е, который гидролитически отщепляет-ся от пальмитилсинтазы при участии пальмитилдеацилазы. Пальмитат — основной продукт данного фермента, хотя в неболь-ших количе-ствах могут синтезироваться жирные кислоты с более короткой углеводородной цепью. Суммарное уравнение синтеза пальмитата

можно записать следующим образом:
$$\text{CH}_3\text{CO}\sim\text{SKoA} + 7\text{HOOCCH}_2\text{CO}\sim\text{SKoA} + 14(\text{NADPH} + \text{H}) \rightarrow \text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH} + 7\text{CO}_2 + 8\text{HSKoA} + 14\text{NADP}^{++} + 6\text{H}_2\text{O}.$$

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ: «ЛИПИДЫ»

Лабораторная работа: Исследование состава общих липидов методом тонкослойной хроматографии

Разделение веществ при тонкослойной хроматографии происходит благодаря различию в способности адсорбироваться на поверхности сорбента, что определяется характером функциональных групп, входящих в структуру отдельных липидов. После разделения липиды проявляют на пластинке специальными реактивами.

Метод может быть использован как для качественного, так и количественного изучения липидных компонентов.

Подготовка пластины с адсорбентом. Для нанесения на пластины используют смесь силикагеля марки КСК и гипса. Гипс предварительно просушивается в течение 24 ч при температуре 115—120°C. Оба адсорбента измельчают и просеивают через сито с числом 200 меш.

Пластины размером 17 x 14 см тщательно обезжируют. Готовят смесь из 4,5 г силикагеля и 0,5 г гипса, добавляя дистиллированную воду при тщательном помешивании в ступке до консистенции «жидкой сметаны». Полученную массу равномерно распределяют по поверхности пластины, после чего ее подсушивают на воздухе в течение 8—12 ч. В таком виде пластина готова для проведения анализа.

Раствор исследуемых липидов в хлороформе (0,3— 0,5 мг)

наносят на пластину с помощью микропипетки. Пробу наносят, отступя примерно 1,5 см от края пластины. При нанесении необходимо получить возможно меньший диаметр пятна, не нарушая слой силикагеля.

После нанесения липидов на пластину ее помещают в камеру, куда предварительно наливается смесь растворителей, количество которой должно обеспечивать слой жидкости на дне камеры в 0,8—1,0 см. Пластины устанавливаются под углом так, чтобы нижний край был погружен в жидкость на 0,5 см. Хроматографирование производят в течение 45—60 мин при комнатной температуре. Фронт растворителей за это время поднимается на 9—10 см. Пластины извлекают из камеры и сушат на воздухе до исчезновения запаха растворителей. Для проявления отдельных липидных фракций пластины помещают в камеру, насыщенную парами йода. Йод, растворяясь в липидах, окрашивается в них в темно-желтый цвет (интенсивность окраски зависит от длительности проявления).

На проявленных хроматограммах фракции липидов располагаются в порядке возрастания величин R_f следующим образом: фосфолипиды, холестерин, моноацилглицерины, диацилглицерины, свободные жирные кислоты, триглицериды, эфиры холестерина.

Разделение общих липидов методом ТСХ



подвижный растворитель:

гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота
70 : 30 : 2

Лабораторная работа: Разделение фосфолипидов печени методом тонкослойной хроматографии

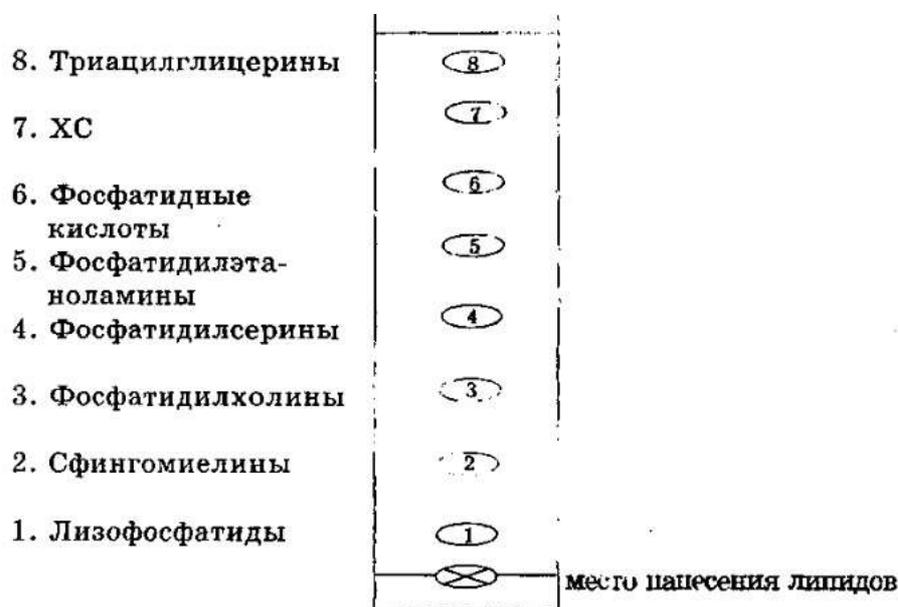
Цель. Ознакомиться с методом разделения фосфолипидов с помощью хроматографии в тонком слое. Фосфолипиды отличаются по структуре и поэтому в различной степени адсорбируются силикагелем, нанесенным на стеклянную пластину в виде тонкого слоя. Благодаря продвижению по слою силикагеля органических растворителей и в зависимости от сродства к ним отдельных фосфолипидов происходит непрерывный процесс сорбции и десорбции, что в конечном итоге приводит к разделению смеси фосфолипидов на отдельные компоненты.

Ход работы: Хлороформный экстракт липидов печени (содержащий 0,5 мг) наносят на пластину с тонким слоем силикагеля (диаметр контура 3—5 мм), помещают в камеру и хроматографируют в течение часа. После разделения фосфолипидные фракции проявляют в парах

йода. При использовании данной системы растворителей липиды на пластинке располагаются в порядке возрастания величины R_f следующим образом: лизофосфатиды, сфингомиелины, фосфатидилхолины, фосфатидилсерины и фосфатидилэтанол амины фосфатидные кислоты, холестерин и нейтральные жиры (ТАГ).

Для количественной характеристики фосфолипидного спектра отдельные зоны силикагеля, соответствующие пятнам фосфолипидов, соскабливают с пластины и переносят в пробирки. В качестве контроля на содержание фосфора в самом силикагеле с пластины соскабливают свободные от липидов участки, соответствующие по размерам пятен фосфолипидов. Затем в каждую пробирку с силикагелем и в 2 дополнительные пустые пробирки, служащие для приготовления контроля на содержание фосфора в реактивах, добавляют 1,0 мл реактива №1 и нагревают в течение 45 мин на кипящей водяной бане.

Разделение фосфолипидов печени ТСХ



Подвижный растворитель:

хлороформ :	метанол :	вода
(65 :	24 :	4)

После этого охлаждают до комнатной темпера

туры, прибавляют 4,8 мл реактива №2, тщательно перемешивают и вновь нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Затем пробирки быстро охлаждают в холодной воде и центрифугируют в течение 15 мин при 3000 об/мин для осаждения силикателя. Надосадочную жидкость сливают и фотометрируют на ФЭКе против контроля на реактивы при красном светофильтре, в кюветах толщиной 1 см.

Величины экстинкций, полученные в контрольных пробах силикагеля, вычитают из экстинкций, характеризующих отдельные фосфолипидные фракции. Сумму экстинкций принимают за 100% и процентное содержание каждой фракции определяют относительно этой суммы.

В случае необходимости определения абсолютных значений содержания фосфора в отдельных фосфолипидных фракциях находят по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой стандартный раствор, содержащий в 0,1 мл 1 мкг фосфора, помещают в 6 пробирок (0,1 мл, 0,2 мл, 0,4 мл, 0,6 мл, 0,8 мл и 1,0 мл). Воду досуха выпаривают и дальнейшую обработку проводят, как описано выше.

Лабораторная работа: Качественные реакции на желчные кислоты.

Материал исследования: сера в порошке (серный цвет).

Реактивы: серная кислота, концентрированная; тростниковый сахар, 10%-ный раствор (свежеприготовленный); дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки; пипетки.

Ход работы. 1. Влияние желчи на поверхностное натяжение воды. В пробирку с 1—2 мл воды насыпают щепотку тонкого порошка серы (серный цвет) — порошок остается плавать на поверхности воды. В

другую пробирку к 1—2 мл воды добавляют 5—10 капель желчи, смешивают и насыпают щепотку порошка серы — порошок тонет; это обусловлено тем, что содержащиеся в желчи соли желчных кислот понижают поверхностное натяжение воды.

Способностью желчнокислых солей понижать поверхностное натяжение воды и растворять некоторые труднорастворимые в воде соединения обусловлено прохождение жира через бумажный фильтр, смоченный раствором желчи, тогда как через фильтр, смоченный водой, жир не проходит. Эти действия желчнокислых солей имеют также значение и при всасывании жиров в кишечнике.

2. Реакция на желчные Кислоты (реакция Петтенкофера). В пробирку наливают 10—20 капель концентрированной серной КИСЛОТЫ и осторожно наливают равный объем желчи, смешанной с отдельной пробирке с 1 каплей свежеприготовленного раствора тростникового сахара. На границе раздела жидкостей образуется осадок желчных кислот и появляется красновато-фиолетовое кольцо. При осторожном смешивании обеих жидкостей, так чтобы не происходило саморазогревание свыше 70°C *, жидкость принимает вишнево-красную окраску, которая при взбалтывании на воздухе быстро темнеет и приобретает пурпурный цвет.

Окраска обусловлена взаимодействием хелевой кислоты с оксиметилфурфуролом, образующимся из тростникового сахара под действием серной кислоты. Надо избегать избытка сахара и нагревания выше 70°C ; так как может наступить обугливание, затемняющее окраску.

Оформление работы. Записывают объяснения к проделанным реакциям.

Лабораторная работа: Выделение лецитинов и кефалинов из желтка куриного яйца. Качественные реакции на структурные компоненты.

Лецитины и кефалины (холинфосфатиды и этаноламинфосфатиды) выделяют из сухого яичного желтка путем экстрагирования их спиртом при нагревании. Затем в кислотном гидролизате спиртовой вытяжки с помощью качественных реакций обнаруживают структурные компоненты лецитинов.

Материал исследования: сухой желток куриного яйца.

Реактивы: этиловый спирт; ацетон; серная кислота, 10%ный раствор; I₂, насыщенный раствор в KI; уксусная кислота, концентрированная; FeSO₄, порошок; пероксид водорода, 15%ный раствор; азотная кислота, концентрированная; молибдат аммония, раствор в азотной кислоте.

Оборудование: весы; пробирки с обратным холодильником; водяные бани; фильтры; воронки; пробирки; пипетки; предметные и покровные стекла; микроскоп; фарфоровые чашки.

Ход работы. 1. Выделение лецитинов и кефалинов (холини этаноламинфосфатидов). 1 г высушенного на воздухе желтка куриного яйца помеща-

** При температуре выше 70°C рука не терпит прикосновения к пробирке в месте смешения жидкости, Так можно контролировать степень нагревания.*

ют в пробирку с обратным холодильником, наливают 5 мл этилового спирта и пробирку ставят в заранее нагретую до 70—75 °С водяную баню (огонь под баней должен быть погашен, так как иначе могут

загореться пары спирта). Пробирку держат в бане 10 мин, считая от момента закипания спирта, время от времени встряхивая содержимое пробирки. Происходит экстрагирование из желтка лецитинов и кефалинов и части пигментов. Спиртовая вытяжка при этом окрашивается в желтый цвет, а желток значительно обесцвечивается (если значительная часть спирта испарилась, то его следует долить).

После экстрагирования содержимое пробирки' отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр. Если фильтрат оказывается мутным, то его фильтруют второй раз через тот же фильтр.

2. Гидролиз лецитинов и качественные реакции на их компоненты. К 1—2 мл спиртового экстракта добавляют равный объем раствора серной кислоты и кипятят 10—15 мин на водяной бане. . Происходит гидролиз лецитинов с отщеплением свободного холина и жирных кислот.

а) Гидролизат охлаждают и наблюдают появление маслянистых капель на поверхности жидкости — это жирные кислоты.

б) Маленькую каплю гидролизата переносят пипеткой или палочкой на предметное стекло и прибавляют большую каплю насыщенного раствора иода в иодиде калия. Накрыв ее покровным стеклом, наблюдают под микроскопом образование кристаллов холина в виде косо срезанных пластинок и призм бурого цвета (кристаллы Флоранса).

в) Оставшийся экстракт упаривают в фарфоровой чашке на водяной бане. Остаток после упаривания растворяют в нескольких каплях концентрированной уксусной кислоты, добавляют кристаллик FeSO_4 , | мл раствора пероксида водорода и слабо подогревают (мокрое

озоление). Реакция идет бурно. По окончании реакции (прекращение выделения пузырьков газа) экстракт фильтруют и фильтрат используют для качественной реакции на фосфатный остаток. К 1 капле фильтрата прибавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты и большой избыток (5—6 мл) раствора молибдата аммония, содержащего азотную кислоту, и нагревают. При стоянии образуется желтый кристаллический осадок фосфорномолибденового аммония.

Оформленные работы. Записывают результат проделанных реакций в рабочую тетрадь в виде таблицы. форма записи

Продукты гидролиза (формула)	употребленные продукты реактивы	продукты реакции	чем обусловлена реакция

Лабораторная работа: Выделение холестерина из мозга и качественные реакции на холестерин

Холестерин — вторичный одноатомный циклический спирт, производное циклопентанпергидрофенантрена. В организме человека массой 70 кг содержится приблизительно 140 г холестерина, что составляет около 0,2% от массы тела. Холестерин является важным липидным компонентом тканей и клеток. В тканях содержится как свободный холестерин, так и эфиры холестерина с высшими жирными кислотами, главным образом олеилхолестерин. С пищей человек получает в среднем 0,4—0,5 г холестерина в день. Синтезируется же ежедневно 0,7—1 г, таким образом, большая часть холестерина

синтезируется в организме. Особенно богата холестерином ткань мозга.

Холестерин в клетках входит главным образом в состав мембран. Метод выделения холестерина основан на разрушении мембран путем обработки органическими растворителями (например, хлороформом) и последующем экстрагировании холестерина этими растворителями. Цветные реакции на холестерин обусловлены дегидратацией его под действием концентрированной серной кислоты и переходом в непредельные углеводороды с сопряженными двойными связями. Эти производные дают окрашенные соединения с NaSO_3 и уксусным ангидридом.

Материал исследования: ткань мозга (можно хранить замороженной).

Реактивы: гипс, порошок; хлороформ; серная кислота, концентрированная; уксусная кислота, ледяная; уксусный ангидрид.

Оборудование: ступки, стеклянные палочки, скальпели, стекла; сухие пробирки; фильтры; воронки.

Ход работы. Растирают в ступке 1 г ткани мозга с 2—3 г гипса (CaSO_4) до получения густой кашицы. Затем при помощи стеклянной палочки или скальпеля кашицу распределяют тонким слоем на стекле и высушивают при 60°C , для чего стекло держат высоко над пламенем горелки. Высушенный с гипсом мозг соскабливают скальпелем и заливают в пробирке 5 мл хлороформа. Экстрагируют холестерин при комнатной температуре в течение 5 мин. Экстракт отфильтровывают в сухую пробирку, делят на 2 части, с ними проводят качественные реакции.

1. Реакция Зальковского. К 1 мл хлороформного экстракта из мозга

добавляют равный объем концентрированной серной кислоты. и смешивают обе жидкости. После отстаивания верхний хлороформный слой жидкости оказывается окрашенным в красный цвет, нижний, сернокислотный слой окрашен в желто-оранжевый цвет и имеет зеленую флуоресценцию (жидкость в проходящем свете прозрачна, а в отраженном свете кажется мутной с зеленым оттенком). Если к нижнему слою добавить ледяной уксусной кислоты, то жидкость становится розово-красной, флуоресценция сохраняется.

2. Реакция. Либермана — Бухарда. К 1 мл хлороформного экстракта из мозга добавляют 10 капель уксусного ангидрида и 2 капли концентрированной серной кислоты, хорошо перемешивают. Жидкость принимает сначала красное окрашивание, переходящее затем в красно-фиолетовое, фиолетовое, аметистовосинее, синее и, наконец, в зеленое.

Оформление работы. Записывают в рабочую тетрадь принцип метода и результаты проделанных качественных реакций в виде таблицы: форма записи

Качественная реакция	употребление реактивы	получение окраска	чем обусловлена реакция

Лабораторная работа: Исследование действия липазы поджелудочной железы. Влияние желчи на активность липазы

Жиры или триацилглицерины практически не всасываются в пищеварительном тракте. В тонком кишечнике происходит их гидролиз,

который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой. Существует несколько типов панкреатических липаз. Одни из них специфичны в отношении эфирных связей в α -положении триацилглицерина, а другие гидролизуют связи в β -положении. Полный гидролиз триацилглицеринов происходит постадийно: сначала ферментами атакуются α - и α_1 -связи, а затем более медленно гидролизуются β -моноацилглицерины. Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, а также диацилглицерины и моноглицерины) всасываются в стенки кишечника.

В процессе переваривания и всасывания липидов важная роль принадлежит желчным кислотам. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов переваривания.

Для наблюдения за действием липазы используют растертую с водой свежемороженную поджелудочную железу или приготовленную из нее глицериновую вытяжку липазы.

Для изучения действия липазы готовят смесь липазы с жиром (молоко или подсолнечное масло) и определяют количество жирных кислот, образовавшихся в результате расщепления жира через различные, от начала опыта, промежутки времени. Количество жирных кислот определяют титрованием 0,01 моль/л раствором NaOH в присутствии фенолфталеина.

Материал исследования: глицериновый экстракт липазы из поджелудочной железы или измельченная поджелудочная железа.

Реактивы: молоко, разбавленное 1: 10, или подсолнечное масло; желчь, раствор; фенолфталеин, раствор; NaOH, 0,01 моль/л раствор;

дистиллированная вода.

Оборудование: колбы вместимостью 25 мл; мерные цилиндры вместимостью 10 мл, пипетки; стаканчики для титрования; термостат (38—40 °С); микробюретки; бюретки.

Ход работы. 1. Готовят три колбы — две опытные и одну контрольную. В них смешивают препарат липазы субстрат (молоко или подсолнечное масло), как указано в таблице:

Компоненты инкубационной смеси	Опытная проба мл	Опытная проба с желчью мл	Контрольная проба, мл
Молоко (разведенное 1:10)	1	1	1
Глицериновая вытяжка из поджелудочной железы	0	0	0
Раствор желчи	1	1	1
H ₂ O	-	-	-

2. Приготовленные инкубационные смеси тщательно перемешивают. Затем из каждой колбы отбирают по 2 мл смеси в заранее приготовленные стаканчики для титрования. Добавляют в каждый стаканчик по 1—2 капли раствора фенолфталеина и титруют раствором

гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания: При первом титровании нейтрализуются органические кислоты — молочная и другие, которые присутствовали в молоке до начала действия липазы.

3. Оставшуюся смесь в колбах помещают в термостат, температура которого 38—40 °С, и через определённые интервалы времени (15, 30, 90 мин) отбирают из каждой колбы (не вынимая их из термостата) по 2 мл смеси и титруют 0,01 моль/л раствором гидроксида натрия, Время титрования и объем израсходованного гидроксида натрия фиксируют в таблице:

Время инкубации, мин	Объем 0,01 моль/л NaOH, пошедшего на титрование, мл		
	опытная проба без желчи	опытная проба с желчью	контроль
15			
30			
90			

Результаты первого титрования, полученные до начала действия липазы, вычитают из результатов последующих титрований.

5. На основании полученных данных строят график, где по оси абсцисс откладывают время (в минутах), а по оси ординат — активность липазы, выраженную объемом 0,01 мол/л раствора гидроксида натрия (в миллилитрах), пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени. Сравнивают активность липазы в присутствии желчи и без нее.

Оформление работы. Записывают в рабочую тетрадь принцип метода

и сделанные выводы, зарисовывают график.

Лабораторная работа: Определение общего холестерина в сыворотке крови по методу Илька.

Содержание общего холестерина в сыворотке крови здорового человека колеблется в пределах 150—250 мг/дл (среднее значение 200 мг/дл). На эфиры холестерина с ‘жирными кислотами приходится 60—70% от общего холестерина и 30—40% — на свободный холестерин. В сыворотке крови отношение свободного холестерина к эфирсвязанному — величина постоянная.

Увеличение содержания холестерина в плазме крови (гиперхолестеринемия) наблюдается ‘при микседеме, менингитах, диабете, ‘атеросклерозе, при некоторых заболеваниях печени. Описана ‘также наследственная гиперхолестеринемия. Снижение содержания холестерина в плазме (гипохолестеринемия) отмечается при хронической сердечной недостаточности, острых инфекционных заболеваниях, острых панкреатитах, гипертиреозе

Метод основан на том, что холестерин в присутствии уксусного ангидрида и смеси уксусной и серной кислот образует окрашенные продукты, интенсивность окраски которых определяется колориметрически.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы: рабочий реактив *.

Оборудование: пробирки (сухие!), микропипетки: пипетки; стеклянные цилиндры; ФЭК; кюветы с толщиной слоя 0,5 см.

* Рабочий реактив готовят перед употреблением, смешивая мас. ч. ледяной уксусной кислоты, 5 мас. ч. уксусного ангидрида, 1 мае. л.

концентрированной серной кислоты. Концентрированную серную кислоту добавляют к последней очень медленно, при постоянном помешивании, не допуская разогревания раствора.

Ход работы. В сухую пробирку (присутствие следов воды мешает развитию окраски) вносят 2 мл рабочего реактива (реактив отмеривают стеклянным цилиндром) и 0,1 мл негемолизированной сыворотки. Сыворотку добавляют медленно, так чтобы она стекала по стенке пробирки. Пробирку энергично встряхивают 10—12 раз и помещают в термостат при 37 °С на 20 мин,

Для приготовления контрольной пробы (одна-две пробы на группу) в сухую пробирку отмеривают 2 мл рабочего реактива.

Окраску растворов измеряют на ФЭКе против контроля с красным светофильтром. Содержание холестерина в пробах определяют по калибровочной кривой. Оформление работы. Записывают принцип метода, результаты колориметрии, расчет.

Лабораторная работа Разделение липопротеинов сыворотки крови методом электрофореза . . 2 в полиакриламидном геле

Липопротеины (ЛП) — сложные частицы, в состав которых входят белки и липиды. В липопротеинах сыворотки липидный компонент представлен свободным (и эфирсвязанным холестерином, фосфолипидами, триацилглицеринами.

В состав сыворотки крови входят следующие липопротеины: .. ,

ЛВП — липопротеины . высокой плотности (или а«-ЛП), богаты белком и фосфолипидами, постоянно находятся в плазме крови здоровых людей;

ЛНИ — липопротеины низкой плотности (или В-ЛП), содержат большое количество холестерина и являются транспортной формой его;

ЛОНП — липопротеины очень низкой плотности (или пре-В-ЛП), они

образуются в печени и являются главной транспортной формой эндогенных триглицеридов, ХМ — хиломикроны, образуются в стенках кишечника в процессе ресинтеза экзогенных триацилглицеринов и холестерина; так как ХМ содержит много триацилглицеринов и очень мало белка, при электрофорезе они остаются на старте;

НЭЖК — неэтерифицированные (свободные) жирные кислоты, в плазме крови связаны с альбуминами они составляют лишь небольшую часть (5—10%) от общего количества жирных кислот.

Принцип метода сводится к электрофоретическому разделению на фракции предварительно окрашенных красителем суданом черным липопротеинов сыворотки. Определение содержания (в %) отдельных фракций является диагностическим тестом при ряде заболеваний, например таких, как диабет, ожирение, атеросклероз, ишемическая болезнь и т. д. Получаемые при электрофорезе липопротеинограммы специфичны для каждого заболевания.

Электрофорез в полиакриламидном геле представляет собой один из наиболее современных и удобных методов для анализа фракций ЛП. Высокая разрешающая способность этого метода определяется тем, что разделение веществ по их электрофоретической подвижности удачно сочетается с эффектом молекулярного сита. Таким образом, скорость движения молекул через гель определяется не только зарядом, как во всех других видах электрофореза, но также их размерами и формой.

Применяемый для электрофореза гель полиакриламида получают полимеризацией двух мономеров акриламида и метилен-бис-акриламида (МБА) в присутствии катализаторов, представляющих собой смесь раствора персульфата аммония с N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамидом (ТЕМЕД). При этом линейные цепи полиакриламида сшиваются метиленовыми мостиками. Гель обладает ярко выраженной гидрофильностью благодаря наличию в структуре правильно чередующихся амидных групп.

Растворы мономеров и катализаторов готовят на буферном растворе (рН 8,9) и смешивают в стеклянных трубочках для полимеризации. Для разделения липопротеинов сыворотки крови применяют дифференциальный электрофорез, используя три слоя гелей с концентрацией акриламида, повышающейся от верхнего слоя к нижнему.

Материал исследования: сыворотка крови (можно хранить в холодильнике в течение 5—6 дней не замораживая).

Реактивы: акриламид; Трис (триоксиметиленаминометанхлоргидрат); № №-метилен-бис-акриламид (МБА); М, М, №, М№'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД); моль/л раствор соляной кислоты; пероксодисульфат аммония, 140 мг/дл раствор; сахароза; судая черный В, насыщенный раствор в этиловом спирте (100 мг препарата на 5 мл спирта); электродный Трис-глициновый буфер (рН 8,8).

Оборудование: прибор для электрофореза; стеклянные трубочки; пастеровские пипетки; шприц,

Ход работы. а) Подготовка к электрофорезу. Для получения трех слоев гелей с отличающейся пористостью необходимо приготовить следующие растворы:

1. Все растворы перед работой вынимают из холодильника и оставляют на столе для нагревания их до комнатной температуры. Сухие, хорошо вымытые стеклянные трубочки устанавливают в штатив строго вертикально. На нижний конец каждой трубочки надевают резиновую втулку.

2. Раствор для нижнего (10%-ного) геля получают путем смешивания | объема раствора А, 2,8 объема раствора Б, 0,2 объема НО и 4 объемов пероксодисульфата аммония. Приготовленный раствор с помощью пастеровской пипетки медленно вводят в трубочку до высоты 200 мм (нижняя метка на трубочке).

Затем в каждую трубочку на поверхность геля по стенке наслаивают пастеровской пипеткой дистиллированную воду (не взмучивая гель), чтобы предупредить образование мениска на границе двух гелей.

Трубочки оставляют для полимеризации геля на 1520 мин при комнатной температуре. Конец полимеризации определяют по появлению четкой границы раздела гель-вода. После этого воду удаляют встряхиванием.

3. Для получения следующего (5%-ного) геля смешивают | объем раствора А, 1,36 объема раствора Б, 1,64 объема Н.О и 4 объема пероксодисульфата аммония. Этот раствор вводят в трубочку пастеровской пипеткой в таком объеме, чтобы образовался слой высотой 15 мм (вторая метка на трубочке), Сверху наслаивают по стенке воду.

Оба слоя гелей в ргают полимеризации натной температуре 59 мин. Затем вод

4. Затем наслаивают 3%-ный гель. Для е ния смешивают |1 объем раствора А, 9 объем В, объем раствора Д, 4 объема раствора вносят в стеклянную трубочку. Высота этого сл быть 20 мм. Сверху наслаивают воду.

Гель полимеризуют 30 мин при комнатной темпера. туре. Воду удаляют встряхиванием.

б. Подготовка сыворотки и нанесение на гель. Сыворотку предварительно окрашивают насыщенным раствором судана черного. В этиловом спирте. Для этого к 0,3 мл сыворотки добавляют 0,15 мл раствора судана черного и 0,5 мл раствора Е. **Растворы должны** : быть комнатной температуры.

Приготовленную пробу оставляют на 1 ч при комнатной температуре в темноте. Затем 0,05 мл (две капли) окрашенной сыворотки пастеровской пипеткой наносят на поверхность геля. **Электрофорез.**

1. Прибор для электрофореза состоит из двух камер, которые устанавливают одна над другой. В верхней камере укрепляются трубочки с гелем: Нижние концы трубочек должны быть опущены в нижнюю камеру. Втулки с них снимают. Нижние концы трубочек смачивают из шприца электродным буфером. Наливают в нижнюю камеру буфер так, чтобы трубочки были погружены в него на 1—2 см. Следят, чтобы у входа в каждую трубочку не было пузырей воздуха. Верхний конец трубочек доливают электродным буфером до конца трубочки так, чтобы образовался выпуклый мениск. В верхнюю камеру наливают электродный буфер до погружения трубочек.

В центре камер укреплены электроды: верхний (—) — - катод, нижний (+) — анод.

2. Прибор соединяют с выпрямителем, тщательно соблюдая правильность подключения электродов к соответствующим полюсам выпрямителя БПЭ (блок питания электронный).

3. Ручку «Электрофорез» БПЭ устанавливают в крайнее левое положение, тумблер «Сеть» выключают.

4. Подключают БПЭ в сеть с напряжением 220 В.

5. Ручку «Электрофорез — обесцвечивание» БПЭ устанавливают в положение «Электрофорез», ручку «Режим работы» — в положение 25—50 мА, ручку «Измерение» — в положение $X \times 1$ мА.

6. Включают тумблер. «Сеть», при этом должна загореться сигнальная лампочка на панели БПЭ.

7. Поворачивают ручку «Электрофорез» по часовой стрелке до тех пор, пока измерительный прибор не будет показывать ток из расчета 2 мА на трубочку (20 мА на десять трубочек), спустя 5 мин увеличивают силу тока до 5—6 мА на трубочку и поддерживают заданный режим работы до окончания процесса электрофореза.

8. Электрофорез длится 60—75 мин в затемненном помещении. За это,

время фракции липопротеинов сыворотки располагаются определенным образом.

9. После окончания электрофореза выключают тумблер «Сеть» на БПЭ, отключают БПЭ от сети и отключают камеру от БПЭ.

10. Буфер из верхней камеры сливают в одну колбу, буфер из нижней камеры — в другую. Буферы могут быть использованы до 10 раз.

Оформление работы. Описывают в протоколе принт-метода. Распределение окрашенных полос зарисовывают. Сравнивают картину распределения фракций липопротеинов в разных образцах сывороток.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ И КОНТРОЛЯ УСВОЕНИЯ ТЕМЫ «ЛИПИДЫ»

1. Напишите по одной формуле триацилглицеринов, характерные для:
 - а) твердого животного жира
 - б) растительного масла.
2. Приведите химические структурные формулы продуктов, образующихся при гидролизе цереброзидов. Какова их биологическая функция?
3. Опишите хроматографический метод разделения липидов на сефадексах.
4. Дайте полную характеристику высшим жирным кислотам предельного ряда. Приведите примеры.
5. Дайте полную характеристику воскам.
6. Приведите формулу фосфатидной кислоты. Дайте характеристику ее биологическим функциям.
7. Дайте полную характеристику высшим жирным кислотам непредельного ряда.
8. Приведите структурные формулы азотистых ингредиентов, входящих в состав фосфолипидов. Охарактеризуйте их.

9. Приведите химические формулы продуктов, образующихся при гидролизе ганглиозидов. Дайте характеристику биологической роли этого класса липидов.
10. Дайте полную характеристику биологическим функциям липидов в организме.
11. Напишите структурную формулу фосфатидилхолина. Какой суммарный заряд имеет эта молекула при рН 7, какая группа в этой молекуле может взаимодействовать с белками?
12. Чем отличаются растительные масла от твердого жира?
13. Охарактеризуйте классы -«омыляемые» и «неомыляемые» липиды. Приведите примеры.
13. Дайте характеристику классу стеридов. Приведите примеры.
14. Молекула нейтрального жира может содержать три различные жирные кислоты. Напишите формулу такого триглицерида.
15. Дайте определение «кислотного числа» жира. Что характеризует этот показатель?
16. Напишите структурные формулы \square - и \square - лецитинов.
17. В основе желчных кислот лежит холановая кислота. Представьте ее структурную формулу. Охарактеризуйте функции желчных кислот.
18. Представьте формулу холестерина. Дайте характеристику этому соединению.
19. Опишите хроматографический метод разделения липидов на ионообменниках..

Содержание

Белки. Общие сведения.....	4
Функции белков.....	8
Методы разделения и очистки биомолекул (белков, липидов, углеводов). Хроматографические методы	14
Электрофорез	42
Разделение на мембранах и волокнах	47
Лабораторные работы по теме «БЕЛКИ»	55
Обессоливание белкового раствора методом гель-фильтрации.....	55
Обессоливание растворов белка методом диализа.....	59
Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза на бумаге	62
Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы«БЕЛКИ».....	69
Понятия о ферментах.....	72

Содержание

Лабораторные работы по теме «ФЕРМЕНТЫ»...	77
Сравнение действия неорганических катализаторов и Ферментов.....	77
Специфичность действия амилазы и сахаразы.....	79
Специфичность действия сукцинатдегидрогеназы.....	80
Групповая специфичность действия сахаразы.....	82
Липиды. Общие сведения.....	82
Абсолютная специфичность действия уреазы.....	83
Влияние температуры на активность амилазы слюны.....	83
Определение оптимального значения рН для амилазы слюны.....	85
Действие активаторов и ингибиторов на амилазу слюны.....	87

Ферментный гидролиз из белков.....	89
Накопление свободных α-аминогрупп в процессе гидролиза белка при участии трипсина.....	90
Лабораторные работы по теме «ЛИПИДЫ».....	92
Исследование действия липазы поджелудочной железы	93
Разделение фосфолипидов печени методом тонкослойной Хроматографии.....	94
Разделение фосфолипидов печени методом тонкослойной хроматографии.....	94
Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы «ФЕРМЕНТЫ».....	112