



Мирхамидова П., Шахмурова Г.А., Покровский В.С.

ЭНЗИМОЛОГИЯ

МИНИСТЕРСТВО НАРОДНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ НИЗАМИ
РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ
ИМЕНИ ПАТРИСА ЛУМУМБЫ

Мирхамидова П., Шахмурова Г.А., Покровский В.С.

ЭНЗИМОЛОГИЯ

Учебное пособие
для магистров направление 70110901- Методика преподавания
точных и естественных наук (биология)

“BOOKMANY PRINT”
ТАШКЕНТ – 2024

УДК: 577.15
ББК: 28.072.534
М 647

Энзимология [Текст]: учебное пособие / П. Мирхамидова, Г.А. Шахмурова, В.С. Покровский. – Ташкент: Издательство “Bookmany print”, 2024. – 218 с.

Данное учебное пособие подготовлено для магистров направления 70110901- Методика преподавания точных и естественных наук (биология). Рассмотрены основные положения науки энзимологии — биохимии белков, ферментов и других посредников биохимических процессов. Содержит не только общую характеристику ферментативной активности, но и разделы, связанные с регуляцией метаболизма и физиологических функций клеток. В учебном пособии содержится теоретический материал, тесты, вопросы, решение которых способствует закреплению материала в процессе самостоятельной работы студентов. Учебное пособие рассчитана на широкий круг читателей — научных работников студентов, докторантов, а также практических работников, которые в своей деятельности соприкасаются с вопросами энзимологии.

Рецензенты:

Далимова С.Н. — Доктор биологических наук, профессор кафедры биохимия, НУУз им.М.Улугбека
Файзиев В.Б. — Заведующий кафедрой «Биология», Чирчикского государственного педагогического университета, док.биол.наук, профессор

Рекомендовано к изданию Советом Ташкентского государственного педагогического университета имени Низами.
(№11/3.1 от 04.07.2024 г.)

ISBN 978-9910-06-147-9

© Мирхамидова П., Шахмурова Г.А., Покровский В.С.
© Издательство “Bookmany print”, 2024.

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Список сокращений	7
	Предисловие	9
Глава-1	Ферменты	11
1.1.	Краткая характеристика	11
1.2.	Строение и механизм действия ферментов	12
1.3.	Механизм действия ферментов	14
1.4.	Основы кинетики ферментативных реакций	16
1.5.	Основные свойства ферментов	20
1.5.1	Термоллабильность ферментов	20
1.5.2.	Действие pH среды на активность ферментов	21
1.5.3.	Активаторы и ингибиторы ферментов	22
1.5.4.	Специфичность ферментов	26
1.6.	Классификация ферментов	28
1.7.	Локализация ферментов в клетке	32
1.8.	Строение коферментов и их классификация	33
1.9.	Способы выражения активности ферментов	36
Глава-2	Лабораторный практикум	37
2.1.	Правила техники безопасности в биохимической лаборатории	37
2.2.	Единицы измерения	39
2.2.1.	Система СИ	39
2.2.2.	Растворы и способы выражения концентрации	41
2.2.3.	Диссоциация электролитов в растворах. Ионная сила раствора	42
2.2.4.	Приготовление растворов	44
2.2.5.	Растворимость	46
2.2.6.	Техника приготовления растворов	47
2.2.7.	Буферные растворы. Методы определения концентрации ионов водорода	62
2.2.8.	Определение количества белков биуретовым методом	66
2.2.9.	Определение количества белков методом микробиурета	68
2.2.10.	Определение содержания белка по методу Лоури	68
Глава-3	Методы энзимологических исследований	71

3.1	Экстракция	71
3.1.1.	Экстракция белков из биологических объектов	71
3.1.2.	Экстракция общих белков из растений	72
3.1.3.	Разделение белков на отдельные фракции	73
3.1.4.	Экстракция водорастворимых белков	74
3.1.5.	Экстракция солерастворимых белков	75
3.1.6.	Экстракция щелочно-растворимых белков	75
3.1.7.	Определение содержания белка по азоту	76
3.1.8.	Определение содержания остаточного азота в крови	77
3.1.9.	Определение азота, не входящего в состав белков тканей	78
3.1.10.	Определение азота в аминокислотах с титрованием формальдегидом	79
3.1.11.	Диализ белков	81
3.1.12.	Определение изоэлектрической точки белка	82
3.1.13.	Разделение аминокислот с помощью бумажной хроматографии	85
3.1.14.	Гидролиз белков и определение их аминокислотного состава	88
3.2.	Определение аминокислот методом тонкослойной хроматографии	89
3.3.	Определение белковых фракций электрофорезом в полиакриламидном геле	90
3.3.1.	Изоэлектрофокусирование	96
3.4.	Выделение клеточных структур из биологического материала	97
3.4.1.	Гомогенизирование	97
3.4.2.	Приготовление гомогенатов из растительных и животных тканей	98
3.4.2.1.	Приготовление гомогената из растительной ткани	98
3.4.2.2.	Приготовление гомогената из животной ткани	100
3.4.2.3.	Выделение клеточных органелл растительной ткани	102
3.4.2.4.	Выделение клеточных ядер из растительной ткани	103
3.4.2.5.	Выделение интерфазных клеточных ядер	104
3.4.2.6.	Выделение митохондрий	107
3.4.3.1.	Выделение клеточных органелл животной клетки	108

3.4.3.2.	Выделение митохондрий из животной ткани (Дифференциальное центрифугирование)	109
Глава-4	Исследование общих свойств ферментов	111
4.1.	Ферментативный гидролиз крахмала	111
4.2.	Определение активности фермента сахарозы	112
4.3.	Термалобильность ферментов	113
4.4.	Влияние pH окружающей среды на активность ферментов	114
4.5.	Специфичность ферментов	115
4.6.	Вещества, влияющие на активность ферментов (ингибиторы и активаторы)	116
Глава-5	Методы качественного и количественного определения активности ферментов	118
5.1.	Влияние желчи на активность липазы	118
5.1.2.	Определение активности фермента липазы	119
5.1.3.	Определение активности уреазы	119
5.1.4.	Ферментативный гидролиз белка	120
5.1.5.	Определение активности фермента тирозиназы	121
5.1.6.	Определение активности фермента фосфатазы	122
5.1.7.	Определение активности фермента холинэстеразы	123
5.1.8.	Определение активности АсАТ и АлАТ в сыворотки крови динитрофенилгидрозоновым методом (Рейтмана-Френкеля)	124
5.1.9	Определение активности гаммаглутаминтрансферазы	125
5.2.	Определение активности мембранно-связанных ферментов	127
5.2.1.	Определение цитохром -с -оксидазной активности	127
5.2.2.	Определение НАДН - цитохром-с-редуктазной активности	128
5.2.3.	Определение активности ротенон нечувствительной НАДН: цитохром-с-редуктазной	128
5.2.4.	Определение активности фермента глутаматдегидрогеназы	129
5.2.5.	Определение активности фермента лактатдегидрогеназы	130
5.2.6.	Определение активности аденозинтрифосфатазы в мышечной ткани	132

5.2.7.	Определение активности полифенолоксидазы	134
5.2.8.	Определение активности нитратредуктазы	135
Глава-6	Исследование активности ключевых ферментов энергетического обмена клетки	138
6.1.	Определение активности кератинкиназы	138
6.2.	Определение активности пируваткиназы в скелетной мускулатуре крыс	139
6.3.	Определение активности сукцинатдегидрогеназы в митохондриях печени крыс	141
6.4.	Определение активности НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы	142
6.5.	Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы	145
6.6.	Определение активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы	148
6.7.	Определение активности НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы	152
Глава-7	Методы определения активности антиоксидантных ферментов	155
7.1.	Определение активности пероксидазы в крови	156
7.2.	Определение активности пероксидазы в растительном материале (по А.Н.Бояркину)	158
7.3.	Определение активности каталазы в крови	159
7.4.	Определение активности каталазы в мозге	162
7.5.	Определение активности каталазы в зерновом сырье	164
7.6.	Определение общей активности глутатионредуктазы в тканях животных	165
7.7.	Определение активности супероксиддисмутазы	167
Глава-8	Методы выделения и очистки ферментов	170
8.1.	Получение ферментных препаратов	170
8.2.	Выделение глицерол – 3 – фосфатгидрогеназа из скелетных мышц животных	170
8.3.	Получение препарата амилазы из плесневых грибов (по Фениксовой)	174
8.4.	Получение препарата уреазы из соевой муки	175
8.5.	Получение препарата сахаразы	175
8.6.	Методы очистки пероксидазы из корней хрена	176

Контрольные вопросы	180
Тесты	184
Глоссарий	197
Используемая литература	215

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АлАТ – Аланинаминотрансфераза
АМФ – Аденозинмонофосфат
АсАТ – Аспаратаминотрансфераза
АТФ – Аденозинтрифосфат
АХ – Ацетилхолин
цГМФ – Циклический ГМФ
Глу – Глутамат
ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛДГ – Лактатдегидрогеназа
НАДФ – Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НДФ – Нуклеозиддифосфат
НК – Нуклеиновые кислоты
НМФ – Нуклеозидмонофосфат
НТФ – Нуклеозидтрифосфат
ПАБК – Парааминобензойная кислота
ПК – Протеинкиназа
РНК – Рибонуклеиновая кислота
ФАД – Флавинадениндинуклеотид
ФГАДГ – Фосфоглицеральдегиддегидрогеназа
ФМН – Флавинмоноклеотид

ПРЕДИСЛОВИЕ

«Ферменты есть, так сказать, первый акт жизненной деятельности. Все химические процессы направляются в теле именно этими веществами, они есть возбудители всех химических превращений. Все эти вещества играют огромную роль, они обуславливают собою те процессы, благодаря которым проявляется жизнь, они и есть в полном смысле возбудители жизни. Они составляют основной пункт, центр тяжести физиолого-химического знания».

И.П. Павлов

Основу жизнедеятельности любого организма составляют биохимические процессы. Практически все реакции в живом организме протекают с участием природных биокатализаторов, называемых ферментами, или энзимами. Среди множества энергетически возможных реакций ферменты избирательно преобразуют реагенты, называемые субстратами, по физиологически полезному пути. Таким образом, ферменты управляют всеми метаболическими процессами организма. Благодаря исключительной эффективности и специфичности ферментативного катализа обеспечивается лежащее в основе обмена веществ строго согласованное взаимодействие различных ферментативных систем. Естественно, что каждый биолог, работающий в той или иной области экспериментальной биологии, должен быть вооружен знанием основных положений современной энзимологии.

Учебное пособие по Энзимологии представляет собой изложение основных положений со временного учения о ферментах. Рассматриваются современные представления о структуре белков, методы выделения и очистки ферментов, подробно описываются коэнзимы, даются основные положения кинетики ферментативного катализа, излагаются данные о специфичности и механизме действия ферментов. На основе сведений о механизме синтеза белка рассматривается проблема биосинтеза ферментов. Показаны

методы качественного и количественного определения активности ферментов, исследование активности ключевых ферментов энергетического обмена клетки, а также даны методы определения активности антиоксидантных ферментов. Последняя глава посвящена методам выделения и очистки ферментов.

Становление энзимологии как науки произошло в начале XIX века. Активное её развитие продолжается до настоящего времени. В задачи этой науки входят определение роли отдельных ферментов в ускорении химических реакций, протекающих в организме, выделение и очистка ферментов, установление их структуры, исследование механизма действия, изучение кинетических характеристик и особенностей регуляции активности *in vivo*.

Цель курса - сформировать у магистров представление о фундаментальной роли ферментов в обмене веществ и энергии, механизмах пути передачи наследственной информации и регуляции и интеграции процессов метаболизма в живых организмах. Задачи освоения дисциплины (модуля): сформировать представление о современном состоянии и перспективах развития энзимологии; ознакомить с классификацией ферментов, методами их изучения; дать характеристику структурно-функциональной организации ферментов, механизмам действия, способам регуляции, получения и использования ферментов; научить умению самостоятельного поиска и анализа информации, использованию её в процессе научно-практической деятельности.

В учебном пособии содержится теоретический материал, тесты, вопросы, решение которых способствует закреплению материала в процессе самостоятельной работы студентов. Учебное пособие рассчитано на широкий круг читателей — научных работников студентов, докторантов, а также практических работников, которые в своей деятельности соприкасаются с вопросами энзимологии.

ГЛАВА I. ФЕРМЕНТЫ

Ключевые слова: энзимы, субстрат, активный центр, аллостерический центр, специфичность, ингибирование, активаторы, ингибиторы, термолабильность

1.1. Краткая характеристика

Ферменты — биологические катализаторы белковой природы. Они иначе называются *энзимами*. Ферменты с невероятно высокой скоростью катализируют разные реакции, происходящие во всех живых организмах.

Из-за белковой природы, ферменты резко отличаются от других катализаторов по некоторым свойствам:

1. Ферментам свойственно очень эффективное действие. В оптимальных условиях (т.е. при низкой температуре, нормальном давлении и в определенной pH среде) действуют с очень большой скоростью, по сравнению с неорганическими ферментами. Например, скорость действия фермента каталазы, расщепляющего перекись водорода до воды и атомарного кислорода, в $10^8 - 10^{11}$ раз выше, чем у химического катализатора, катализирующего эту же реакцию ионами железа.

2. Ферменты обладают специфическим действием. Каждый фермент, обычно, катализирует только одну реакцию, или группу однотипных реакций. Например, фермент сахаразы расщепляет только сахарозу, а на похожие, на нее дисахариды не действует. Неорганические катализаторы таким свойством не обладают.

3. Биохимические процессы в клетке в строгом порядке регулируются при помощи ферментов. Это считается самым важным свойством ферментов.

4. Круг реакций, катализируемых при участии ферментов, намного шире, они катализируют происходящие в организме окислительно-восстановительные, гидролитические, реакции изомеризации, переноса различных группировок и целый ряд других реакций.

Все химические реакции, происходящие в живых организмах, практически осуществляются с участием ферментов.

В старину люди в своей практической деятельности пользовались различными ферментативными процессами при

переработке сырья, приготовлении кисломолочных продуктов, хлебопечении и другие. В Средней Азии пользуясь сладким соком солода пшеницы, готовили сумалак. Но ферментативные процессы стали изучаться только со второй половины XVIII века. В 1836 году Шванном был определен существование в желудочном соке фермента пепсина, расщепляющего мясные белки. В 1914 году К.С. Кирхгоф определил, что в солодовом экстракте проросшего зерна ячменя содержится вещество, вызывающее осахаривание крахмала. Этим открытием фермента амилазы, ученый дал основу науке о ферментах. Самнер в 1926 году первым выделил фермент уреазу в кристаллическом виде, определил, что она имеет белковую природу.

В настоящее время известно 3000 различных ферментов. В кристаллическом виде выделены около 300.

В зависимости от того, на какой субстрат действуют ферменты, их названия получают добавлением к субстрату окончания «аза». Например, фермент, расщепляющий сахарозу, называется сахаразой, фермент расщепляющий липид – липазой.

1.2.Строение и механизм действия ферментов

Ферменты в зависимости от строения делятся на две группы.

1. Ферменты, состоящие из простых белков, т.е. только из аминокислотных остатков, называются однокомпонентными ферментами.

2. Если ферменты состоят из сложных белков, т.е. если в их составе кроме аминокислот встречаются другие соединения, то они называются двухкомпонентными ферментами. Белковая часть их называется *апоферментом*, небелковая часть – *коферментами*, а вместе, их называют *холоферментами*. Роль кофактора могут выполнять ионы металлов (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , K^{+} , Na^{+}) или различные по структуре органические соединения. Органические кофакторы обычно называют коферментами большинство из них являются производными витаминов. Тип связи между ферментом и коферментом может быть различным. Иногда связь слабая и возникает только во время протекания реакции. В других случаях кофактор и фермент связаны прочно за счет ковалентных связей. В последнем случае небелковую часть фермента называют простетической группой.

Коферменты – непосредственно участвуют в ферментативных реакциях. Коферменты делятся на: витаминсодержащие и не содержащие коферменты.

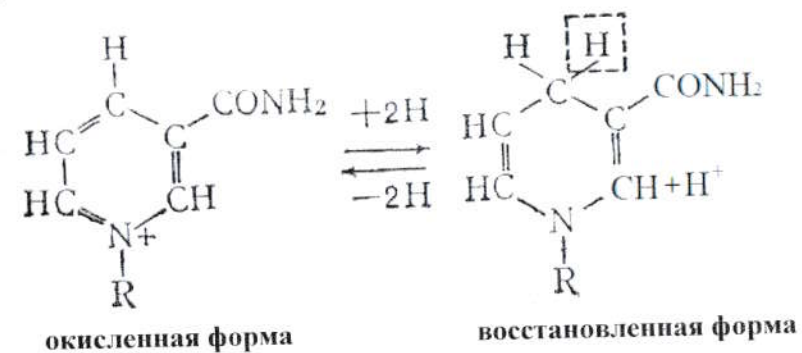
К витаминсодержащим коферментам относятся: тиамин (ТМФ, ТДФ, ТТФ); флаavin (ФМН, ФАД); пантотен (K_0A , дифосфо K_0A); никотинамид (НАД, НАДФ); биотин; карнитин.

К коферментам, не содержащим витаминов, относятся следующие: нуклеотиды; нуклеозидфосфаты; фосфатные соединения моносахаридов; металлопорфирины, глутатион и др.

Кофакторы в ходе реакций выполняют следующие функции:

- участвуют в формировании третичной структуры белка и обеспечении комплементарности между ферментом и субстратом;
- могут непосредственно вовлекаться в реакции в качестве еще одного субстрата. В этой роли обычно выступают органические коферменты. Их участие в реакции иногда сводится к тому, что они выступают как доноры или акцепторы определенных химических групп.

Например, в составе никотинамидных коферментов ($НАД^{+}$, НАДН) в качестве каталитически активной группы участвуют никотинамиды. Механизм реакции можно представить следующим образом:



Активные центры ферментов. В процессе ферментативных реакций субстрат взаимодействует не со всеми молекулами фермента, а с определенным участком, так называемым активным центром. Это происходит потому, что размер молекулы субстрата намного меньше, чем молекулы фермента. Значит активный центр – это часть молекулы фермента, связывающая субстрат. С этим

активным центром связаны и каталитическая и специфическая активности ферментов (рис.1). У однокомпонентных ферментов активный центр образуется и действует за счет функциональных групп аминокислот, боковых радикалов и функциональных групп в составе некоторых аминокислот полипептидной цепи. Например, к функциональным группам, в составе аминокислот входят: — SH группа цистеина, —ОН группа серина, —COOH группы дикарбоновых аминокислот, индольные группы триптофана и др.

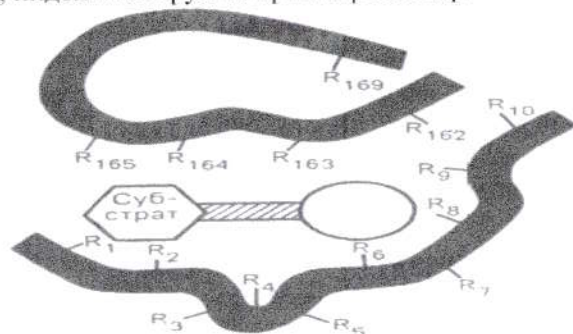


Рис. 1. Схема строения активного центра ферментов

Темные полосы - участки полипептидной цепи фермента; R - аминокислотные остатки и их порядковые номера (с N-конца).

Активный центр возникает при образовании третичной структуры фермента. При этом остатки аминокислот, расположенные в различных сторонах полипептидной цепи, приближаются друг к другу и участвуют в образовании активного центра. Активный центр ферментов составляет незначительную часть их молекул.

1.3. Механизм действия ферментов

Существуют несколько теорий, касающиеся механизма действия ферментов. Все они основываются на том, что активный центр фермента связывается с субстратом, в результате образуется фермент — субстратный комплекс.

Возникновение фермент — субстратного комплекса приводит к поляризации химических связей, участвующих в реакции и их деформации или к ослаблению внутримолекулярных сил. В

результате смещения электронов, повышается активность молекулы субстрата (рис. 2).

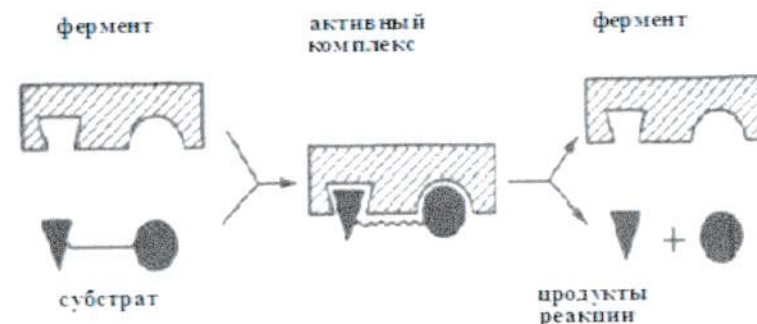
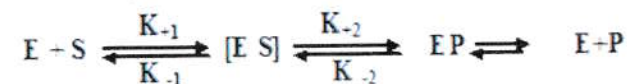


Рис. 2. Механизм действия ферментов

Образование фермент-субстратного комплекса согласно теории Э. Фишера «ключ-замок».

Образование и превращение фермент — субстратного комплекса протекает в три этапа. На первом этапе ферментативной реакции молекулы субстрата связываются с ферментом, ковалентной или какой-нибудь другой химической связью и образуют первичное промежуточное вещество.

На втором этапе происходит превращение первичного промежуточного соединения в один или несколько последовательных активированных комплексов. В итоге третьего этапа реакции происходит отделение нового продукта от молекулы фермента. Эти стадии реакции можно выразить следующим образом:



где, E — фермент; S — субстрат; ES — фермент-субстратный комплекс; P — новообразованный продукт; K — константа скорости реакции.

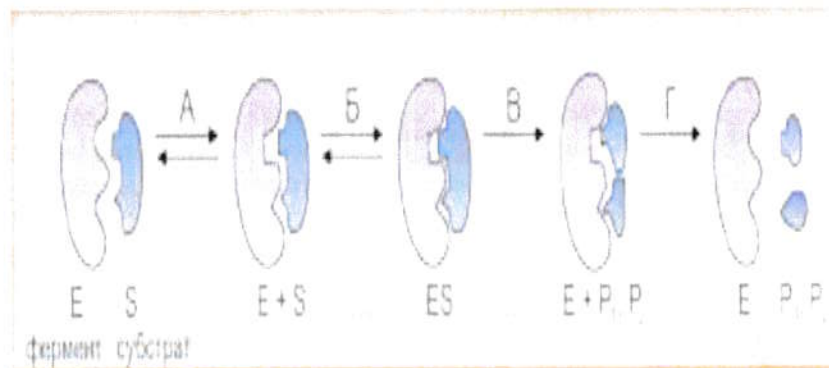


Рис. 3. Механизм действия фермента:

А — установление индуцированного соответствия конформации активного центра фермента и субстрата; Б — образование фермент-субстратного комплекса; В — образование продуктов реакции; Г — освобождение продуктов реакции и переход фермента в исходное состояние (по Спирину)

Первая стадия реакции протекает быстро. Фермент-субстратный комплекс образуется за счет слабых химических связей и в условиях с несколько низкой энергией активации.

Вторая стадия превращения молекул субстрата происходит расщеплением и связыванием ковалентных связей. Скорость реакции, катализируемая ферментом, повышается в несколько раз. В связи с большой скоростью образования фермент-субстратного комплекса [ES], почти всегда поддерживается равновесие между E и S. Если на третьем этапе образуется фермент — продуктный комплекс [EP], то в заключении расщепляется на фермент и продукт (рис.3).

Таким образом, скорость ферментативной реакции зависит от некоторых внешних условий (температуры, pH среды и другие).

1.4. Основы кинетики ферментативных реакций

Ферментативная кинетика изучает скорости реакций, катализируемые конкретными ферментами, а также закономерности влияния природы реагирующих веществ на скорости ферментативных реакций. Отличительная особенность

ферментативных реакций — явление насыщения активного центра фермента субстратом.

Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата [S] и количества присутствующего фермента [E]. В большинстве биохимических реакций концентрация фермента очень мала, а субстрат присутствует в избытке. При проведении ферментативной реакции в условиях избытка субстрата скорость реакции будет пропорциональна концентрации фермента. Графическая зависимость такой реакции имеет вид прямой линии (рис. 4):



Рис. 4. Зависимость скорости ферментативной реакции (v) от концентрации фермента.

Концентрации субстрата [S] определяет, сколько молекул фермента соединится с субстратом с образованием фермент-субстратного комплекса [ES]. При малых [S] скорость реакции возрастает пропорционально концентрации субстрата. Однако при достаточно большом увеличении скорость реакции перестает зависеть от [S] — наступает насыщение, когда все молекулы фермента оказываются занятыми субстратом. Однако при достаточно большом увеличении скорость реакции перестает зависеть от [S] — наступает насыщение, когда все молекулы фермента оказываются занятыми субстратом.

На графике (рис. 5) показано, что K_m равна концентрации субстрата [S], при которой скорость ферментативной реакции v составляет половину от V_{max} . K_m имеет размерность моль/л.

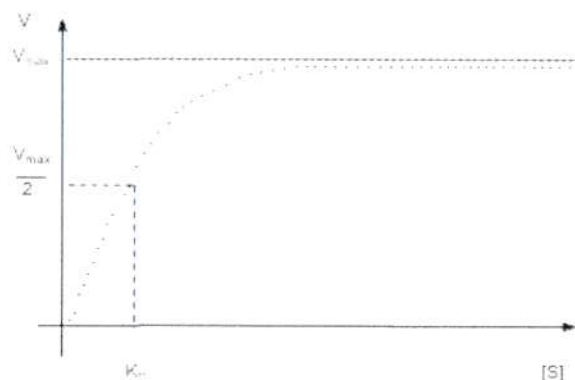


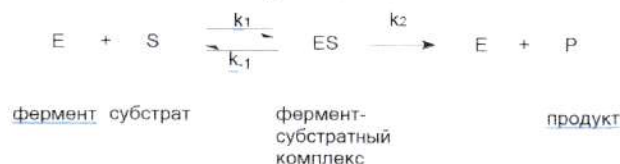
Рис. 5. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Константа Михаэлиса является важным параметром при исследовании ферментов, характеризующим *степень сродства фермента к субстрату*. Константа Михаэлиса численно равна отношению суммы констант скоростей реакций, в которых фермент-субстратный комплекс распадается, к константе скорости реакции, в которой он образуется:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Определение величины K_m имеет важное значение при выяснении механизма действия эффекторов на активность ферментов.

Классическое уравнение Михаэлиса-Ментен выводят из следующей кинетической схемы реакции:



Здесь k_1 , k_{-1} , k_2 – константы скоростей соответствующих реакций. При этом вторая стадия предполагается необратимой, и определяет скорость ферментативной реакции V :

$$V = k_2 \cdot [ES]$$

В этом уравнении и далее квадратные скобки обозначают концентрацию соответствующего вещества в моль/л или ммоль/л. При больших концентрациях субстрата весь фермент находится в составе комплекса с субстратом, и скорость реакции при этом будет максимальной:

$$[ES] = [E]_0 \quad V_{\max} = k_2 \cdot [E]_0$$

Здесь $[E]_0$ – общая концентрация фермента, внесенная в систему (свободный и связанный). В данной теории используется гипотеза квазистационарного состояния, т.е. предполагается, что $[ES] = \text{const}$, т.е. скорость его образования равна скорости расхода. Следовательно:

$$k_1 \cdot [E][S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \text{ (константа Михаэлиса)}$$

Запишем уравнение материального баланса по ферменту:

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

Выразим отсюда $[E]$ и подставим ее в выражение для константы Михаэлиса, а затем преобразуем полученное уравнение:

$$[E] = [E]_0 - [ES]$$

$$\frac{([E]_0 - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = K_m$$

$$\frac{[E]_0 \cdot [S]}{[ES]} - [S] = K_m$$

$$\frac{[E]_0}{[ES]} = \frac{K_m + [S]}{[S]}$$

$$[ES] = [E]_0 \cdot \frac{K_m + [S]}{[S]}$$

Затем подставим $[ES]$ в формулу для скорости ферментативной реакции:

$$V = k_2 \cdot [ES] = k_2 \cdot [E]_0 \cdot \frac{K_m + [S]}{[S]}$$

Отсюда и вытекает уравнение Михаэлиса-Ментен:

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{где} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{константа Михаэлиса})$$

Основными кинетическими параметрами ферментативной реакции являются константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции при насыщающих концентрациях субстрата. При этом, как следует из уравнения, K_m численно равна концентрации субстрата, соответствующей $V = V_{\max}/2$.

1.5. Основные свойства ферментов

Как, было указано выше, ферменты обладают белковой природой и поэтому имеют все свойства присущие белкам. Кроме этого, ферменты обладают рядом свойств, присущих только им. К ним относятся ферментативные термолабильность, специфичность, чувствительности относительно изменению pH среды и к действию активаторов и ингибиторов.

1.5.1. Термолабильность ферментов. Одним из важных свойств ферментов является чувствительность к температуре. При температуре выше 70°C ферментативная реакция не может продолжаться. В условиях выше $80 - 100^\circ\text{C}$ ферменты теряют свою каталитическую способность — белки денатурируются.

Для ферментов существует определенная постоянная температура, при которой они обладают самой высокой каталитической активностью. Она называется — температурным оптимумом (рис.6).

Для большинства ферментов теплокровных животных самая удобная температура для катализа составляет $25 - 37^\circ\text{C}$.

Ферменты в составе растений имеют температурный оптимум при $40 - 60^\circ\text{C}$. При низких (ниже 0°C) температурах активность ферментов падает, а при температуре ниже -60°C — вообще не проявляет свою активность.

Изменение температуры вызывает двоякий эффект: с одной стороны, при повышении температуры до $37-40^\circ$ скорость ферментативной реакции увеличивается в связи с повышением

кинетической энергии реагирующих молекул; с другой стороны, при температуре выше 50° начинается денатурация фермента и скорость реакции снижается.

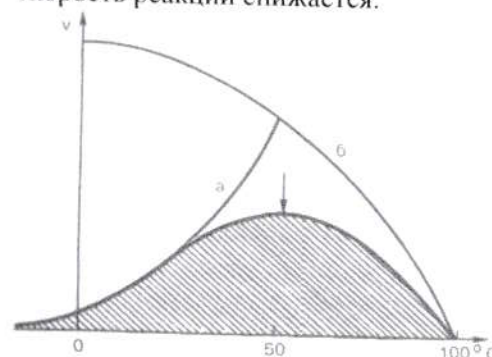


Рис. 6. График зависимости скорости ферментативной реакции от температуры а — повышение скорости реакции как функция температуры; б — снижение скорости реакции как функция денатурации белка-фермента; стрелка указывает оптимум температуры

1.5.2. Действие pH среды на активность ферментов

Действие pH среды на активность ферментов. Ферменты очень чувствительны к изменению pH среды. Каждый фермент при определенном значении pH проявляет максимальную активность (рис 7. и табл.1.). Это значение называется **pH-оптимумом**. Многие ферменты высокоактивны при нейтральных значениях pH среды.

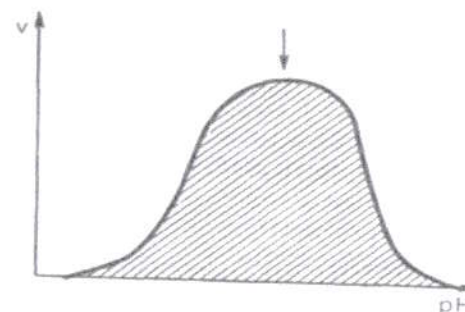


Рис. 7. Зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от pH (стрелка указывает на оптимум pH).

Для каждого фермента характерна определенная область оптимальных значений pH (оптимум pH), при которых он проявляет максимальную активность. Форма кривых,

описывающих зависимость активности фермента от pH, отражает способность важных для данного фермента протон-донорных или протон-акцепторных групп в каталитическом центре фермента переходить при определенных значениях pH в состояние с требуемой степенью ионизации. Оптимум pH фермента не обязательно совпадает со значением pH, характерным для нормального внутриклеточного окружения этого фермента; последнее может быть, как выше, так и ниже оптимума pH. Таким образом, каталитическую активность фермента в клетках можно в какой-то мере регулировать, изменяя pH окружающей среды. В зависимости от значения pH может резко изменяться ферментативная активность. pH оптимумы среды для различных ферментов имеют различные значения. Например, pH-оптимум для пепсина 1,5 – 2,0, для слюнной амилазы 6,8 – 7,0, трипсина 7,0 – 8,5 – при этих значениях pH перечисленные ферменты катализируют реакции с максимальной скоростью

Таблица 1

Действие pH среды на активность ферментов

Фермент	pH	Фермент	pH
Пепсин	1,5 – 2,0	Каталаза	6,8 – 7,0
Катепсин β	4,5 – 5,0	Уреаза	7,0 – 7,2
Амилаза (слюны)	6,8 – 7,0	Липаза панкреатическая	7,0 – 8,5
Амилаза (солода)	4,9 – 5,2	Трипсин	7,5 – 8,5
Сахараза кишечника	5,8 – 6,2	Аргиназа	9,5 – 10,0

Изменение pH среды приводит к изменению степени ионизации ионогенных групп фермента и, следовательно, ведет к перераспределению межрадикальных связей. Это изменяет конформацию фермента и нарушает комплементарное соответствие активного центра и субстрата, что ведет к снижению скорости реакции.

1.5.3. Активаторы и ингибиторы ферментов

Помимо температуры и pH среды, на активность ферментов влияет ряд химических веществ, участвующих в реакционной среде. Участие в реакционной среде некоторых ионов ускоряют образование фермент-субстратного комплекса. В результате этого,

активность ферментативной реакции повышается. Такие вещества называются **активаторами**. Они в ферментативной реакции непосредственно не участвуют обычно, между активатором и ферментом, возможно, образуются слабые химические связи. Очень часто в качестве активаторов выступают катионы. К специфическим активаторам относятся Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} и другие катионы металлов. Например, активность фермента липазы повышается при помощи Ca^{2+} , но для полного проявления ферментативной активности аденозинтрифосфатазы требуется одновременное присутствие таких катионов, как K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , и Ca^{2+} .

Вещества, снижающие активность ферментов, называются **ингибиторами**. Действие большинства ферментов можно подавить, или ингибировать, определенными химическими реагентами. Выяснилось, что ДФФ ингибирует целый класс ферментов, многие из которых способны катализировать гидролиз пептидов или эфирных связей. К этим ферментам относится не только *ацетилхолинэстераза*, но и *трипсин*, *химотрипсин*, *эластаза*, *фосфофруктоза-1,6-бисфосфатаза* и *кокоиназа* (фермент, выделяемый личинкой тутового шелкопряда и используемый ею для гидролиза шелковых нитей и освобождения из кокона). Характерная особенность всех ферментов, ингибируемых ДФФ, состоит в том, что они содержат в активном центре остаток серина, принимающий участие в каталитическом акте.

Угнетение активности ферментов бывает двух типов: конкурентное и неконкурентное ингибирование.

Конкурентный ингибитор конкурирует с субстратом за связывание с активным центром, но в отличие от субстрата связанный с ферментом конкурентный ингибитор не подвергается ферментативному превращению.

При **конкурентном ингибировании** активности ферментов, ингибитор блокирует активный центр, куда должен присоединиться субстрат. Значит конкуренция происходит между субстратом и ингибитором, имеющим строение, близкое друг другу, которые стремятся связаться с активным центром. Конкурентное ингибирование имеет обратимый характер. Действие конкурентного ингибитора снимается высокими концентрациями субстрата (рис.6).

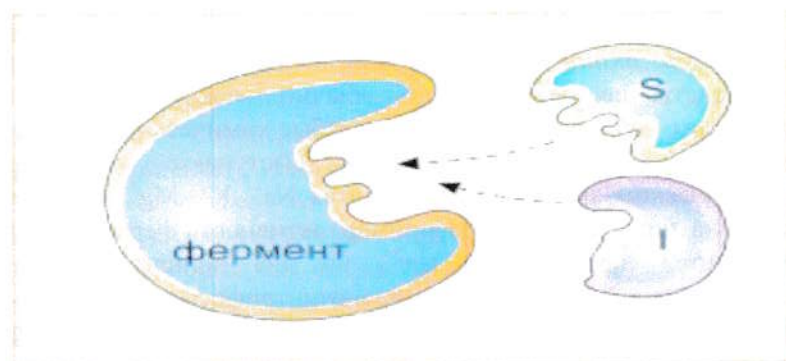


Рис. 8. Конкурентное ингибирование: S — субстрат, I — ингибитор (своей трехмерной структурой похож на субстрат). Связывание S и I происходит взаимоисключающим образом. Образуется либо ES, либо EI, но не EIS (по Спирину).

Метод конкурентного торможения нашел широкое применение в медицинской практике. Известно, например, что для лечения некоторых инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, применяют сульфаниламидные препараты. Оказалось, что эти препараты имеют структурное сходство с парааминобензойной кислотой, которую бактериальная клетка использует для синтеза фолиевой кислоты, являющейся составной частью ферментов бактерий. Благодаря этому структурному сходству сульфаниламид блокирует действие фермента путем вытеснения парааминобензойной кислоты из комплекса с ферментом, синтезирующим фолиевую кислоту, что ведет к торможению роста бактерий.



-аминобензойная кислота



сульфаниламид

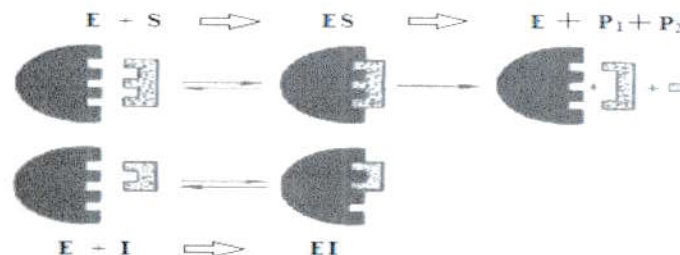


Рис.9. Действие конкурентного ингибирования на активность ферментов (схема по В.Л.Кротовичу). E — фермент; S — субстрат; P₁ и P₂ — продукты реакции; I — ингибитор.

Малоновая кислота — гомолог сукцината, отличается от него одной метильной группой, которая не способна окисляться.

Если в реакционную среду добавить большое количество малоновой кислоты, реакция остановится полностью. Если в эту реакцию в большом количестве добавить субстрат (сукцинат) то реакция будет продолжаться. Неконкурентное ингибирование тоже обратимо, но не может быть ослаблено или устранено повышением концентрации субстрата.

Классическим примером конкурентного ингибирования является торможение сукцинатдегидрогеназы (СДГ) малоновой кислотой (рис.10). Этот фермент катализирует окисление путем дегидрирования янтарной кислоты (сукцината) в фумаровую:

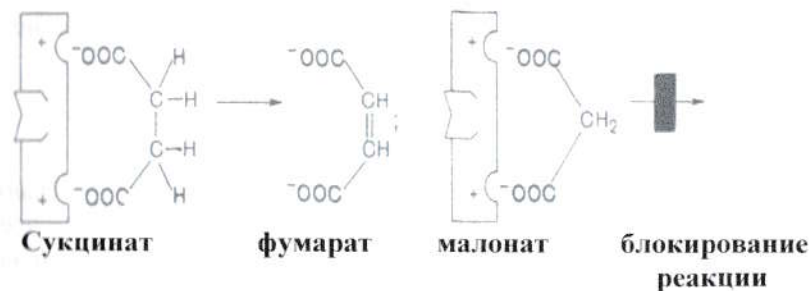


Рис. 10. Конкурентное ингибирование СДГ малоновой кислотой.

В случае неконкурентного ингибирования ингибитор присоединяется к ферменту не в активном центре, где связывается

субстрат, а совсем в другом месте. При этом конформация молекулы фермента изменяется таким образом, что происходит обратимая инактивация его каталитического центра. Неконкурентные ингибиторы связываются обратимо как со свободным ферментом, так и с комплексом ES, образуя неактивные комплексы EI и ESI.

Неконкурентное обратимое ингибирование не может быть ослаблено или устранено повышением концентрации субстрата, так как эти ингибиторы присоединяются к ферменту не в активном центре, а в другом участке молекулы (рис.11.).

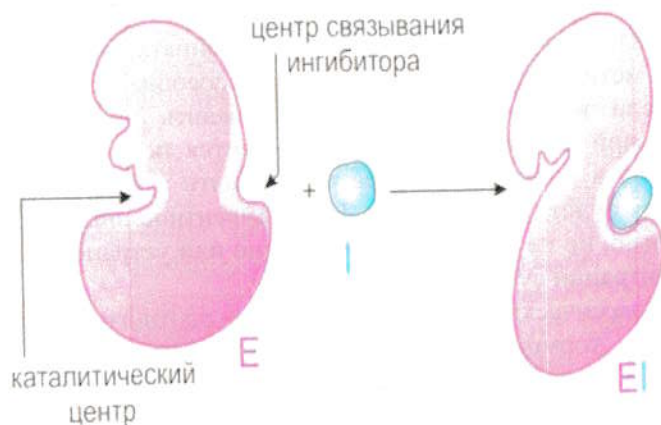


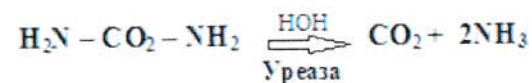
Рис.11. Неконкурентное обратимое ингибирование

1.5.4. Специфичность ферментов

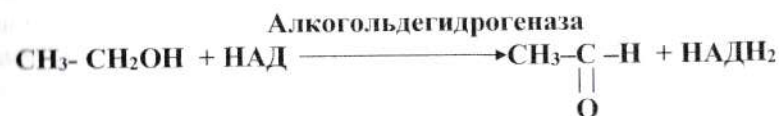
Ферменты катализируют биохимические реакции, протекающие в живых организмах, т.е. регулируют их биохимическую деятельность. Ферменты в отличие от неорганических катализаторов обладают специфичностью.

Это свойство специфичности считается одним из важных свойств присущих живым организмам, т.е. фермент должен подойти к субстрату, как ключ к замку. В настоящее время существуют следующие нижеприведенные основные виды специфичности.

Абсолютная специфичность. Если фермент катализирует реакции расщепления или образования только одного вещества, тогда он обладает абсолютной специфичностью. Например, фермент уреазы катализирует реакцию расщепления единственного вещества — карбамида на углекислый газ и аммиак. Уреазы не действуют даже на производные мочевины:



Абсолютная групповая специфичность ферментов выражается в том, что они действуют на соединения, которые имеют схожие строения. Например, алкогольдегидрогеназа в основном действует на этиловый спирт. Но этот фермент также может действовать и на другие высокомолекулярные спирты с неразветвленными цепями.



Относительно групповая специфичность. Ферменты, обладающие такой специфичностью, действуют только на определенные химические связи, независимо от структуры субстрата. Например, пепсин, трипсин гидролизуют пептидные связи в молекулах белков.

Стереохимическая специфичность. В процессе обмена веществ многие природные органические соединения бывают оптически активными и встречаются в организме в виде, какого-либо стереоизомера.

Если реакционная среда состоит из смеси двух изомеров, то фермент, обладающий стереохимической специфичностью, расщепляет только половину субстрата.

Например, протеолитические ферменты, расщепляют пептиды, состоящие только из аминокислот L — формы. На аминокислоты D — формы не действуют. Аналогично, фермент лактатдегидрогеназа тоже катализирует реакцию окисления L — молочной кислоты, не действует на D — форму этой же кислоты.

Таким образом, специфичность ферментов является одним из главных их свойств.

1.6. Классификация ферментов

Ферменты входят в состав клеток и тканей живых организмов и катализируют любые химические реакции, происходящие в них. Значит деятельность живых организмов зависит от ферментов.

В настоящее время насчитывается более 3000 разных индивидуальных ферментов. Их число со временем увеличивается.

В 1961 году комиссия по ферментам Международного биохимического союза разработала классификацию и номенклатуру ферментов.

Одним из своеобразных свойств ферментов, отличающих их от других, является химическая реакция, которую они катализируют. Поэтому, за основу классификации ферментов, предложенной комиссией, было взято именно это свойство.

По данной классификации ферменты подразделяются на классы в зависимости от вида катализируемых реакций. Каждый фермент имеет свое название. Название состоит из слова, означающего *название субстрата*, а также *типа катализируемой реакции* и окончания «аза».

В новой классификации, наряду с систематическими, сохранены и рабочие «тривиальные» названия. Например, у карбамадогидролазы тривиальное название – уреаза.

Комиссия разработала наряду с классификацией ферментов, непосредственно связанную с ней систему нумерации. Согласно этой нумерации, каждый фермент имеет свой шифр, состоящий из четырех цифр.

В шифре первая цифра означает класс, к которому принадлежит данный фермент.

Согласно классификации, ферменты делятся на следующие 6 классов:

1. Оксидоредуктазы
2. Трансферазы
3. Гидролазы
4. Лиазы
5. Изомеразы
6. Лигаза (синтетаза)

Каждый класс подразделяется на подклассы. Вторая цифра в шифре означает подкласс. У оксидоредуктаз, подкласс означает, главным образом в зависимости от того, какие группировки

подвергаются окислению, т.е. в зависимости от природы доноров водорода. В основу деления на подклассы положен химизм акцептора водорода; у трансфераз – перемещаемые группы; у гидролаз – тип гидролизуемых связей.

Каждый подкласс делится на подподклассы.

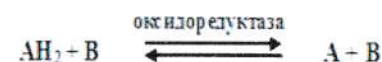
Третья цифра в шифре означает подподкласс. Этот подподкласс у оксидоредуктаз указывает на природу акцептора, участвующего в реакции. Например, 1.2.3. – означает оксидоредуктазу, донором которой является альдегид или кетон и акцептором – молекулярный кислород.

Четвертая цифра в шифре ферментов указывает на их порядковый номер в пределах данного подкласса. Например, шифр уреазы 3.5.1.5.

Таким образом, шифр – это номер, присвоенный ферменту по четырехзначному десятичному коду, определяющий место в списке ферментов.

Оксидоредуктазы. В этот класс входят ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции в клетках.

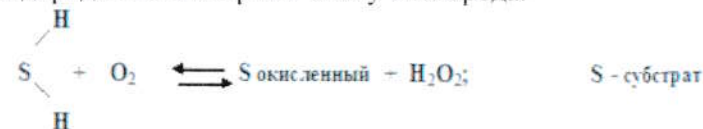
Окислительные реакции происходят выделением из субстрата (донора) атомов водорода или электронов, а восстановительные реакции, присоединением атомов водорода (электронов) к акцептору. Если выразить донора буквой А, акцептора буквой В, то общий вид окислительно – восстановительных реакций будет следующим:



(AH₂ – донор водорода; В – акцептор водорода)

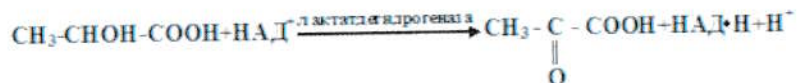
К оксидоредуктазам относятся дегидрогеназы, оксидазы, цитохромредуктазы и пероксидазы. Они различаются между собой тем, что содержат в своем составе те, или иные специфические коферменты и простетические группы:

А) аэробные дегидрогеназы: они непосредственно передают атомы водорода или электроны атому кислорода.



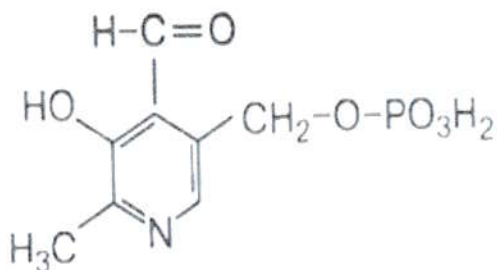
К аэробным дегидрогеназам относятся оксидазы.

Б) анаэробные дегидрогеназы: они не передают кислороду атомы водорода или электроны, а отдают их другому промежуточному акцептору. В зависимости от коферментов, содержащихся в составе, можно делить эти ферменты на – никотинамидные и флавиновые дегидрогеназы.



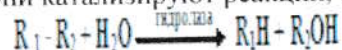
Трансферазы – катализируют перенос определенных групп атомов с одного соединения в другое.

Трансферазы делятся на несколько групп. Например, аминотрансферазы – катализируют реакцию переноса аминных групп с одного соединения в другое. Их кофермент – производное витамина В₆ – пиридоксальфосфат. Таким же образом метилтрансферазы переносят метильные (-CH₃) группы, креатинкиназы катализируют образование креатинфосфата, гексокиназы обеспечивают перенос фосфатной группы к молекуле гексозы.



пиридоксальфосфат

Гидролазы. Ферменты этого класса расщепляют, в присутствии воды, внутримолекулярные связи сложных органических соединений. Они катализируют реакции, имеющие следующий вид:



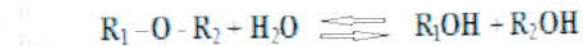
Гидролазы делятся на несколько групп: эстеразы, гликозидазы, протеазы, полифосфатазы и другие.

Эстеразы гидролизуют эфирные связи сложных эфиров:



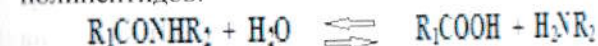
где R₁ – остаток органической или неорганической кислоты, R₂ – остаток спирта или фенола.

Гликозидазы расщепляют гликозидные связи:



где R₁ – остаток моно-, ди- или полисахарида. R₂ – может быть также моно-, ди- или полисахаридом или же веществом неуглеводной природы, содержащим спиртовую или фенольную группу (например, *агликоны* в гликозидах).

Протеазы гидролизуют пептидные связи белков или полипептидов:

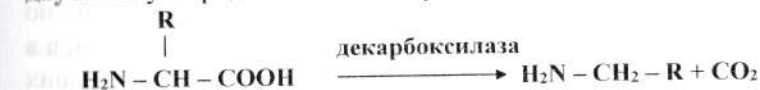


где R₁ и R₂ – остатки аминокислот, ди- или полипептидов.

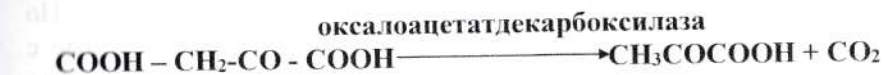
Полифосфатазы – ферменты, катализирующие расщепление фосфоангидридных связей.

Лиазы – это ферменты, отщепляющие от субстратов, негидролитическим путем, определенную группу с образованием двойной связи (или присоединяющие группу к двойной связи). К этим ферментам относятся альдолазы и декарбоксилазы.

Декарбоксилазы катализируют реакции декарбоксилирования. В результате декарбоксилирования аминокислот образуется двуокись углерода и соответствующие амины:

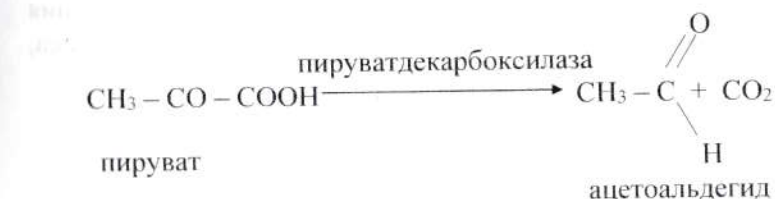


В результате реакции декарбоксилирования образуется соответствующий альдегид или кетон:



оксалоацетат

пируват



Изомеразы. Ферменты, относящиеся к этому классу, катализируют реакции изомеризации различных органических соединений. В результате реакций происходят межмолекулярные взаимные превращения водородных, фосфатных, ацильных и других групп атомов. Изомеразы в зависимости от типа реакций делятся на следующие подклассы: мутазы, таутомеразы, рацемазы, эпимеразы и другие.

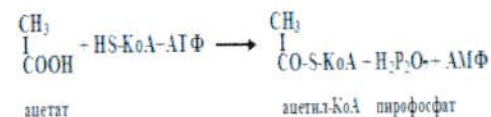
Лигазы (синтетазы) – это ферменты, катализирующие реакции синтеза за счет энергии, выделяющегося при распаде аденозинтрифосфатов. В качестве примера можно привести ацил-КоА-синтетазу, пируваткарбоксилазу и другие. Ацил-КоА-синтетаза катализирует превращение уксусной кислоты на активную ацетил – КоА.

1.7. Локализация ферментов в клетке

Ферменты всегда имеются во всех клетках, биологических жидкостях (растительные соки, желудочно-кишечные соки, кровь, лимфа, жидкость спинного мозга и др.).

Ферменты в живом организме и клетках распределяются по-разному. Например, пепсин в желудке, трипсин и липаза в соке двенадцатиперстной кишки находятся в больших количествах. Амилаза, вырабатывается не только поджелудочной железой, но также бывает и в слюне, в незначительных количествах в крови, а в печени, мышцах и в прорастающих зернах – в больших количествах. Ферменты в клетках часто встречаются в связанном с мембранами виде.

Ферментов, участвующих в процессах, которые являются общими для всех клеток, можно встретить в различных клетках. Но в специализированных клетках находятся ферменты, связанные с функцией только этих клеток. В каждом структурном компоненте клеток собраны отдельные ферменты или система ферментов, исходя из их функций. Например, в митохондриях, в основном, находятся ферменты, катализирующие реакции образования соединений, богатых энергией, т.е. ферменты цикла Кребса, переноса электронов и образования АТФ.



1.8. Строение коферментов и их классификация

Коферменты являются активным центром двухкомпонентных ферментов.

В настоящее время определены около 3000 ферментов. 800 из них свою каталитическую функцию осуществляют в присутствии коферментов, которые имеют не белковую природу. К числу таких ферментов можно отнести многие оксидоредуктазы и трансферазы, всех лигаз, а также, ряд изомераз.

Химическая природа коферментов различна. Коферменты – органические соединения с низкой молекулярной массой. Они выполняют различные функции (рис.12,13,14). Например, в окислительно-восстановительных реакциях в качестве коферментов функционируют липоевая кислота, глутатион и железопорфирины, в биосинтезе фосфолипидов – цитидиндифосфат, холин и т.п. Кроме того, многие коферменты являются производными витаминов.

Таким образом, главной функцией витаминов можно считать их участие в построении коферментов.

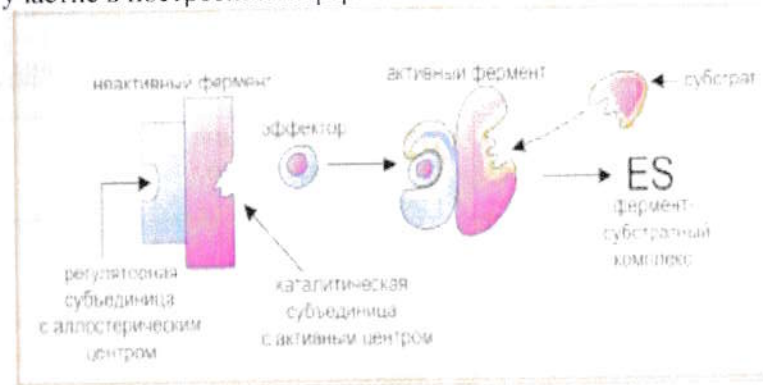


Рис. 12. Аллостерическая активация фермента

Коферменты, на основании их функции в ферментативных реакциях, можно разделить на следующие группы (таблица 2). В таблице 2. приведены отдельные коферменты и их основные функции.

Таблица 2

Отдельные коферменты и их функции

Название	Вид катализируемой реакции	Переносимая группа
Никотинамидадениндинуклеотид (НАД)	окислительно-восстановительная	H (электроны)
Никотинамидадениндинуклеотид фосфат (НАДФ)	окислительно-восстановительная	H (электроны)
Флавинадениндинуклеотид (ФАД)	окислительно - восстановительная	H (электроны)
Флавиномононуклеотид (ФМН)	окислительно - восстановительная	H (электроны)
Гем	окислительно - восстановительная	электроны
Кофермент А	активирование и перенос групп	электроны
Липоевая кислота	перенос ацильных групп	электроны
Тиаминпирофосфат	перенос ацильных групп	электроны
Биотин	связывание CO ₂	CO ₂
Пиридоксальфосфат	переаминирование аминокислот и др. реакции	
Тетрагидрофолиевая кислота	метаболизм одноуглеродных фрагментов	
Коферменты кобамида	Специальные реакции	

1.Коферменты, переносящие водород и электроны – к этой группе относятся никотинамидные и флавиновые коферменты, липоевая кислота и глутатион, связанные с ферментами класса оксидоредуктаз.

2.Коферменты, переносящие группы – к ним можно отнести коферменты, связанные с ферментами класса трансфераз, такие как аденозинтрифосфат, фосфатные эфиры углеводов, коферменты ацетилирования (ацилирования), тетрагидрофолиевую кислоту и пиридоксаль.

3.Коферменты синтеза, изомеризации и отщепляющие α-углеродные связи. К этой группе входят коферменты ферментов, относящиеся к классу лигаз – биотин и кобамидные коферменты, а также, металлопорфирины.

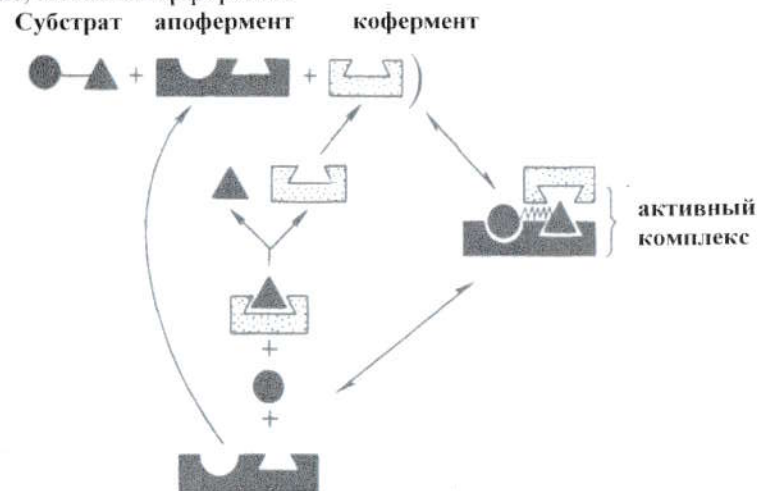


Рис. 13. Схема функции кофермента (по А. Кантарову и Б. Шепартцу).

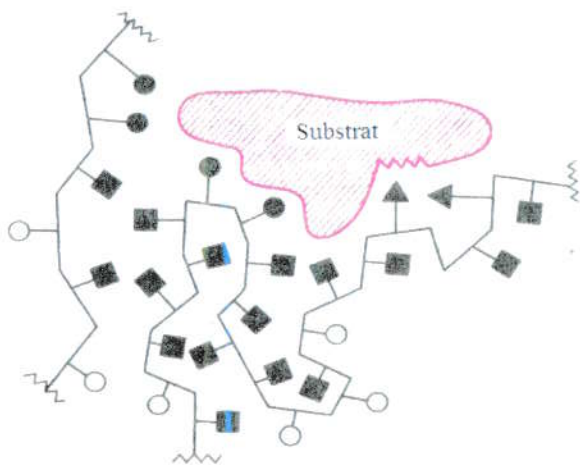


Рис.14. Схема образования нековалентных связей между ферментом и субстратом

1.9. Способы выражения активности ферментов

Комиссия по ферментам Международного биохимического союза рекомендовала использовать следующие единицы активности ферментных препаратов.

Стандартная единица активности – количество фермента, которое катализирует превращение 1 микромоля данного субстрата за одну минуту при заданных условиях (при температуре 30°C, оптимальных значениях концентраций субстрата и фермента, pH среды). Обозначается буквами Е или U.

Удельная активность – это число единиц Е, отнесенное к одному миллиграмму белка в ферментном препарате.

Молекулярная активность – число молекул данного субстрата или эквивалентов прореагировавших групп, превращаемых за 1 минуту одной молекулой фермента при оптимальной концентрации субстрата.

Катал каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью равной 1 моль/с в заданной системе измерения активности.

ГЛАВА II. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

2.1. Правила техники безопасности в биохимической лаборатории

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

Меры безопасности при работе с огнеопасными и легковоспламеняющимися жидкостями

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

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

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

Категорически запрещается:

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

Меры безопасности при работе с кислотами и щелочами

При проведении лабораторных работ часто используют концентрированные кислоты и щелочи или их растворы. В случае попадания на кожу они могут вызвать тяжелые ожоги, а в глаза - потерю зрения. Поэтому концентрированные кислоты и щелочи следует хранить только в толстостенной посуде под вытяжным шкафом.

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

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

Разлив концентрированных кислот производится в защитных очках и резиновых перчатках.

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

Меры безопасности при работе с электрооборудованием и электроприборами

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

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

Первая медицинская помощь

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

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

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

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

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

2.2. Единицы измерения

2.2.1. Система СИ

Размерности всех параметров (единицы измерения) указаны в единицах СИ (СИ — международная система единиц,

предложенная во Франции; Systeme International d'Unites). В табл. 3 — численные значения не которых физических постоянных, выраженные в единицах СИ. В табл. 4 приведены приставки, используемые при указании величин, кратных 10, а в табл. 5 — связь внесистемных единиц объема с единицами СИ.

Таблица 3

Некоторые физические постоянные и связь внесистемных единиц с единицами СИ

Постоянная и параметр с соответствующей единицей	Символ	Коэффициент пересчета в систему СИ
Постоянная Авогадро	N_A	$6,022 \cdot 10^{23} \text{ моль}^{-1}$
Постоянная Фарадея	F	$9,648 \cdot 10^4 \text{ Кл} \cdot \text{моль}^{-1}$
Постоянная Планка	h	$6,62610^{-34} \text{ Дж} \cdot \text{с}$
Универсальная газовая постоянная	R	$8,314 \text{ Дж} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$
Объем 1 моль идеального газа*		$22,41 \text{ дм}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$
Скорость света в вакууме	c	$2,997 \cdot 10^8 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$
Энергия		
Калория	Кал	4,184 Дж
Эрг	Эрг	10^{-7} Дж
Электрон-вольт	эВ	$1,602 \cdot 10^{-19} \text{ Дж}$
Давление		
Атмосфера	Атм	101 325 Па
Бар	Бар	10^5 Па
Миллиметры рт. ст.	мм Hg	133,322 Па
Температура		
Цельсия	$^{\circ}\text{C}$	$(t^{\circ}\text{C} + 273,15) \text{ К}$
Фаренгейта	$^{\circ}\text{F}$	$(t^{\circ}\text{F} - 32)5/9 + 273,15 \text{ К}$
Длина		
Ангстрем	А	10^{-10} м
Дюйм	Дюйм	0,0254 м
Масса		
Фунт	Фунт	0,4536 кг

* При стандартной температуре и стандартном давлении

2.2.2. Растворы и способы выражения концентрации

Раствором называют гомогенную смесь одного или нескольких веществ с жидким компонентом (растворителем). Концентрация каждого растворенного вещества в растворе отражает его содержание в заданном количестве (по массе или по объему) растворителя. Простейшим способом выражения концентрации является указание массы растворенного вещества в единице объема растворителя (w/v), объема в единице объема (v/v) или массы в единице массы (w/w). Кроме того, w/v, v/v и w/w можно представить в виде процентов, для чего соответствующие данные умножают на 100. 1%-й раствор хлорида натрия содержит 1 г NaCl в 100 г раствора. Реже концентрации растворов выражают в частях растворенного вещества на миллион (ppm) или в частях на миллиард (ppb) по отношению ко всему раствору. В таком случае единицами измерения могут быть граммы на миллион (миллиард) граммов или см^3 на миллион (миллиард) см^3 . Так, в воздухе содержится около 8 ppm оксида углерода CO в объемных единицах измерения. Если единицы ppm применяют для выражения концентрации водного раствора, то 1 г воды считают эквивалентным 1 см^3 . Следовательно, 8 ppm означает 8 г вещества в 1000 дм^3 раствора, 8 мг в 1 дм^3 , 8 мкг в 1 см^3 или 8 нг в 1 мм^3 (см. табл. 1.3).

Таблица 4

Приставки, используемые в размерностях

Множитель	Приставка	Символ	Множитель	Приставка	Символ
10^{24}	Йота	Y	10^{-1}	деци	d (д)
10^{21}	Зетта	Z	10^{-2}	санти	c (с)
10^{18}	Экза	E	10^{-3}	МИЛЛИ	m (м)
10^{15}	Пета	P	10^{-6}	микро	μ (мк)
10^{12}	Тера	T	10^{-9}	нано	n (н)
10^9	Гига	G (Г)	10^{-12}	пико	p (п)
10^6	Мега	M	10^{-15}	фемто	f (ф)
10^3	Кило	k	10^{-18}	атто	a (а)
10^2	Гекто	h	10^{-21}	зепто	z (Ц)
10^1	Дека	D	10^{-24}	йокто	y(й)

Таблица 5

Связь внесистемных единиц объема с единицами СИ

Внесистемная Единица	Производная внесистемной единицы	Производная единицы СИ	Единица СИ
1 литр(л)	10 ³ мл	1 дм ³	10 ⁻³ м ³
1 миллилитр(мл)	1 мл	1 см ³	10 ⁻⁶ м ³
1 микролитр (мкл)	10 ⁻³ мл	1 мм ³	10 ⁻⁹ м ³
1 нанолитр(нл)	10 ⁻⁶ мл	1 нм ³	10 ⁻¹² м ³

2.2.3. Диссоциация электролитов в растворах. Ионная сила раствора

При растворении хлорида натрия NaCl в воде происходит его диссоциация и в водном растворе присутствуют не молекулы NaCl, а ионы натрия (Na⁺) и ионы хлора (Cl⁻). Диссоциация вещества в растворе объясняется природой связи в данном соединении; в кристаллической решетке NaCl ионы натрия и хлора удерживаются исключительно за счет ионных взаимодействий. Хлорид натрия является типичным представителем неорганических солей, которые в водном растворе полностью диссоциируют. Процесс диссоциации таких веществ необратимый. Подобные соли называют сильными электролитами в отличие от частично диссоциированных слабых электролитов, к которым относятся многие другие соединения, в частности большинство органических кислот и оснований. Процесс диссоциации слабых электролитов обратим. Слабый электролит, такой как уксусная кислота, также может диссоциировать, несмотря на ковалентную связь между атомами кислорода и водорода в карбоксильной группе. Дело в том, что эта связь сильно поляризована, так что на водороде локализуется частичный положительный заряд. Диссоциация с отщеплением протона приводит к формированию на атоме кислорода отрицательного заряда, в делокализации которого принимают участие другие атомы кислорода карбоксильной группы. В результате карбоксильный анион (COO⁻) оказывается более стабильным, чем карбоксильная группа, что и способствует протеканию диссоциации. Диссоциация слабых электролитов обсуждается в разд. 1.3. Некоторые органические вещества, такие как спирты, в том числе

простые сахара типа глюкозы, вовсе не подвержены диссоциации в растворе, т. е. они не электролиты.

Для ряда биохимических исследований, как с использованием слабых, так и сильных электролитов, важнее уметь определять количество отдельных ионов в растворе, чем знать концентрацию вещества, из которого они образуются. Ионная сила (μ) является мерой электростатических взаимодействий ионов в растворе и зависит как от концентрации всех присутствующих ионов, так и от их заряда. Ионная сила рассчитывается по уравнению:

$$\mu = \frac{1}{2} (c_1 z_1^2 + c_2 z_2^2 + \dots + c_n z_n^2) \sum c z^2$$

Где $\sum$ означает сумму всех слагаемых вида $c z^2$; $c_1, c_2, \dots, c_n$ — молярная концентрация каждого отдельного иона; $z_1, z_2, \dots, z_n$ — заряды ионов (так, для Na⁺ и K⁺ $z = +1$, для Cl⁻ и NO₃⁻ $z = -1$, для Ca²⁺ $z = +2$, для SO₄²⁻ $z = -2$).

В отличие от солей типа NaCl и KNO₃, построенных из одновалентных ионов, соли типа MgSO₄, содержащие двухвалентные ионы, ионизированы в меньшей степени благодаря образованию ионных пар. В этом процессе противоположно заряженные ионы в водном растворе притягиваются друг к другу, образуя прочно связанные пары, которые ведут себя как единые частицы. Так, в 0,25 М раствор MgSO₄ только 65% этого вещества представлено ионами магния и сульфата, а оставшиеся 35% существуют как ионные пары. Из-за образования ионных пар расчет ионной силы растворов таких солей усложняется.

В водных растворах анионы и катионы окружены оболочкой из противоположно заряженных ионов. Это относится и к молекуле воды, имеющей поляризованную связь О-Н, так что на каждом атоме водорода сосредоточен заряд δ^+ , а на атоме кислорода — заряд δ^- . Такая ионная оболочка несет определенный заряд, который по знаку противоположен заряду центрального иона и несколько меньше его по величине. Наличие ионной оболочки приводит к снижению эффективного заряда центрального иона и, следовательно, к ослаблению его притяжения к противоположно заряженным ионам. Данный эффект усиливается при повышении ионной силы раствора, что лежит в основе метода осаждения белков высаливанием.

2.2.4. Приготовление растворов

Растворы - однородные системы, образованные двумя или большим числом компонентов. Компонент, содержание которого в растворе преобладает, обычно называют растворителем; компонент с меньшим содержанием называют растворенным веществом.

Способы выражения концентрации растворов

Количественное содержание компонента раствора, отнесенное к определенной массе или к определенному объему раствора или растворителя, называется концентрацией этого компонента. При этом содержание растворенного вещества обычно выражают в единицах массы, в молях или в эквивалентах.

Процентная концентрация (по массе) - это число единиц массы растворенного вещества, содержащихся в 100 единицах массы раствора. (Ниже процентная концентрация обозначена С%.) Так, 20% водный раствор КОН содержит 20 единиц массы КОН и 80 единиц массы воды.

Молярная концентрация (молярность) выражается числом молей растворенного вещества в 1 л раствора и обозначается буквой М.

Моль - единица количества вещества. Моль - это количество вещества системы, содержащее столько молекул, атомов, ионов, электронов или других структурных единиц, сколько содержится атомов в 0,012 кг изотопа углерода ^{12}C ($6,022 \cdot 10^{23}$). Масса вещества, содержащаяся в 1 моле данного простого или сложного вещества, называется мольной массой. Мольная масса вещества, выраженная в граммах на моль, имеет то же численное значение, что и его относительная молекулярная масса.

Число молей простого или сложного вещества n находят из отношения массы m этого вещества в рассматриваемой системе к его мольной массе M :

$$n = \frac{m}{M}$$

Произведение объема раствора, выраженного в миллилитрах, на его молярность равно числу миллимолей растворенного вещества.

Эквивалентная концентрация (нормальность) выражается числом экви-валентов растворенного вещества в 1 л раствора и обозначается буквами N , n или C_N .

Эквивалентом вещества называется такое его количество, которое в данной реакции равноценно (эквивалентно) 1 молю атомов водорода (1,0079 г). Масса 1 эквивалента называется эквивалентной массой.

Выражение концентрации растворов в единицах нормальности значительно упрощает вычисление объемов растворов количественно реагирующих друг с другом веществ. Эти объемы обратно пропорциональны их концентрациям, выраженным в единицах нормальности:

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{N_2}{N_1}; \quad V_1 N_1 = V_2 N_2$$

Произведение объема раствора, выраженного в миллилитрах, на его нормальность равно числу миллиэквивалентов растворенного вещества.

Концентрацию растворов выражают также через титр, т. е. массой (в г или мг) вещества, содержащегося в 1 мл раствора, и обозначают буквой Т. Найденную величину называют титром по растворенному (рабочему) веществу. В аналитической практике пользуются также титром по анализируемому веществу, т. е. массой (в г или мг) анализируемого вещества, эквивалентной тому количеству реагента, которое содержится в 1 мл раствора.

Например, титр 0,1 н H_2SO_4 (эквивалентная масса $\text{H}_2\text{SO}_4 = 49,04$ г/моль) равен:

$$\frac{49,04 \cdot 0,1}{1000} = 0,004904 \text{ г/мл}$$

При титровании этим раствором NaOH титр H_2SO_4 , выраженный по анализируемому веществу NaOH (эквивалентная масса $\text{NaOH} = 40,01$ г/моль) равен:

$$\frac{40,01 \cdot 0,1}{1000} = 0,004001 \text{ г/мл}$$

Концентрацию растворов часто выражают в единицах моляльности - числом молей вещества, растворенного в 1 кг растворителя. Моляльность обозначают буквой m .

Формулы перехода от одних выражений концентрации растворов к другим

Примем следующие условные обозначения концентрации:

$C\%$ - процентная концентрация по массе; A - число единиц массы растворенного вещества на 100 единиц массы растворителя; B - масса растворенного вещества в 1 л раствора; C_N - число эквивалентов растворенного вещества в 1 л раствора (нормальность); C_m - число молей растворенного вещества в 1 л

раствора (молярность); m - число молей растворенного вещества на 1000 г растворителя (моляльность); $\mathcal{E}$ - эквивалентная масса растворенного вещества, г/моль; M - молярная масса растворенного вещества, г/моль; d - относительная плотность.

Тогда,

$$C_{\%} = \frac{100A}{100 + A} = \frac{C_H \mathcal{E}}{10d} = \frac{C_M M}{10d}$$

$$A = \frac{100C_{\%}}{100 - C_{\%}} = \frac{100B}{(1000d + A)} = C_H \mathcal{E} = C_M M$$

$$B = C_{\%} 10d = \frac{100Ad}{1000 + A} = C_H \mathcal{E} = C_M M$$

$$C_H = \frac{B}{\mathcal{E}} = \frac{C_{\%} 10d}{\mathcal{E}} = \frac{C_M M}{\mathcal{E}}$$

$$C_M = \frac{B}{M} = \frac{C_{\%} 10d}{M} = \frac{C_H \mathcal{E}}{M}$$

$$m = \frac{10A}{A} = \frac{C_M 1000}{(1000d - B)}$$

2.2.5. Растворимость

Растворимость - величина, характеризующая способность вещества образовывать с данным растворителем однородную систему. Количественно растворимость газа, жидкости или твердого тела в жидком растворителе измеряется концентрацией насыщенного раствора при данной температуре.

Обычно растворимость твердых и жидких веществ выражают коэф-фициентом растворимости, т. е. массой вещества, растворяющегося при данных условиях в 100 единицах массы растворителя с образованием насыщенного раствора. (Насыщенным называется раствор, находящийся в равновесии с избытком растворяемого вещества.)

Каждой температуре соответствует определенная растворимость данного вещества в данном растворителе. Сведения о растворимости приводятся в справочниках.

Растворимость газов в жидкостях повышается с увеличением давления и, в большинстве случаев, с понижением температуры.

Растворимость жидких веществ в жидкостях может быть неограниченной, когда жидкие компоненты смешиваются друг с другом в любых отношениях (этиловый спирт - вода) и ограниченной в случае несмешивающихся жидкостей. В последнем случае расслаивание жидких компонентов системы зависит от температуры; обычно взаимная растворимость компонентов возрастает с температурой. Выше некоторой температурной точки, называемой критической точкой растворимости, взаимная растворимость компонентов системы становится неограниченной (расслаивания нет).

Растворимость твердых веществ в жидкостях может изменяться в широких пределах. Обычно она возрастает с повышением температуры. Однако некоторые вещества не подчиняются этому правилу: растворимость их или понижается с повышением температуры, или повышается только до некоторого предела, выше которого растворимость уменьшается.

2.2.6. Техника приготовления растворов

По точности выражения концентрации растворы делят на приблизительные, точные и эмпирические.

Растворы кислот и оснований приблизительной концентрации служат в качестве вспомогательных реагентов при выполнении аналитических, препаративных и других работ. Концентрацию подобных растворов рассчитывают либо по степени разбавления исходных веществ (растворов), либо по массе вещества (взвешивается на технических весах), растворенного в известной массе растворителя. Часто приблизительную концентрацию растворов определяют по величине плотности.

Растворы с точной, заранее установленной концентрацией, называемые рабочими, стандартными или титрованными растворами, служат для определения точной концентрации других растворов.

Концентрации многих растворов вспомогательных веществ (индикаторы, специфические реактивы и др.) устанавливаются эмпирически и приводятся в соответствующих прописях.

Независимо от того, какие по точности концентрации готовят растворы, применять следует только чистые

исходные вещества и воду высокой степени очистки, а в ряде случаев (для растворов NaOH , Na_2SO_3) - очищенную от CO_2 .

Следует иметь в виду, что скорость растворения твердого вещества зависит от размера его частиц (тонкоизмельченное растворяется быстрее).

Некоторые вещества не смачиваются водой и плавают на ее поверхности, образуя тонкую пленку. Для приготовления водных растворов подобных веществ рекомендуют порошок вначале облить небольшим количеством этилового спирта (если он инертен по отношению к компонентам раствора), а уже затем приливать воду.

Сосуды для растворения и хранения растворов оснований должны быть снабжены хлоркальциевыми трубками, заполненными аскаритом или натронной известью, чтобы защитить раствор от CO_2 . В некоторых случаях растворы следует хранить в атмосфере инертного газа (N_2 , CO_2). Растворы веществ, разлагающихся под действием света, например AgNO_3 , следует хранить в сосудах из коричневого стекла или покрытых черным лаком (в крайнем случае обернутых в черную бумагу).

Приготовление водных растворов кислот приблизительной концентрации

Водные растворы кислот (H_2SO_4 , HCl , HNO_3) обычно готовят соответствующим разбавлением исходных химически чистых концентрированных кислот. Разбавление проводят из расчета на объем, так как жидкость всегда легче отмерить, чем взвесить. Чтобы получить разбавленную кислоту (например, 1:5), к 5 объемам воды прибавляют 1 объем кислоты.

Процентное содержание концентрированных кислот контролируют по плотности, определяемой большей частью ареометром. Значения концентрации кислот в зависимости от плотности см. в справочниках.

Обращаться с концентрированными кислотами следует осторожно, так как они сильно действуют на кожу, разрушают одежду и обувь, портят полы и столы. При работе с концентрированными кислотами необходимо пользоваться резиновыми перчатками и защитными очками.

При приготовлении разбавленных растворов кислот (в особенности H_2SO_4) следует приливать кислоту в воду тонкой струей при непрерывном перемешивании стеклянной палочкой.

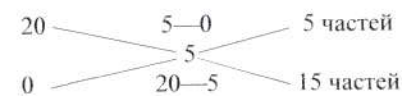
Если при этом смесь сильно разогрелась, то ее охлаждают, после чего приливают следующую порцию кислоты.

Кислоту, попавшую на обувь или одежду, необходимо незамедлительно смыть большим объемом воды, нейтрализовать аммиаком или NaHCO_3 и снова обмыть водой. Кислоту, разлитую на столе или на полу, засыпают песком, нейтрализуют Na_2CO_3 , CaO , Ca(OH)_2 , CaCO_3 и лишь после этого производят уборку.

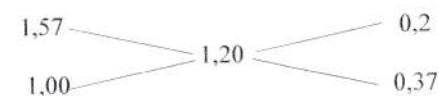
При приготовлении разбавленных растворов из более концентрированных или путем смешения растворов разных концентраций, для расчета соотношения объемов удобно пользоваться так называемым правилом креста или смешения. Это правило может быть иллюстрировано схемой получения 5% (по массе) раствора разбавлением 20% раствора:

Схема получения 5% (по массе) раствора разбавлением 20% раствора

Концентрация одного из компонентов, %		Разность	Следует смешать
имеющаяся	требуемая		



Правило креста распространяется и на случай, когда концентрация смешиваемых водных растворов выражена через плотность. Пусть дан водный раствор плотностью $1,57 \text{ г/см}^3$. Нужно из него приготовить раствор с плотностью $1,20 \text{ г/см}^3$.



Отсюда следует, что нужно смешать 20 см^3 раствора с $\rho = 1,57 \text{ г/см}^3$ с 37 частями по массе воды.

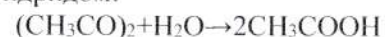
Расчет концентрации по правилу креста не отличается точностью, и пользоваться этим методом можно лишь для приготовления растворов приблизительной концентрации.

Приготовление безводного раствора хлорной кислоты

Раствор хлорной кислоты в безводной уксусной кислоте широко применяют в качестве титранта для кислотно-основного титрования в неводной среде.

Промышленность выпускает хлорную кислоту различной концентрации (от 42 до 70%), чаще всего в виде 57% водного раствора с плотностью около 1,50.

Избыточную воду из хлорной кислоты удаляют уксусным ангидридом:



Предварительно определив содержание воды в хлорной кислоте, последнюю растворяют в ледяной уксусной кислоте и рассчитывают, какой объем V_1 (в мл) уксусного ангидрида необходим для удаления из хлорной кислоты избыточной воды:

$$V_1 = \frac{(100 - A) V_p 102}{100 \cdot 18 \rho_1}$$

Где, 100 - A - содержание воды в исходном растворе HClO_4 , %; V - объем HClO_4 , взятый для приготовления раствора, мл; ρ - плотность применяемого раствора HClO_4 , г/см³; ρ_1 - плотность уксусного ангидрида, г/см³; 102 - молекулярная масса уксусного ангидрида; 18 - молекулярная масса воды.

Определенный объем HClO_4 V постепенно, при непрерывном перемешивании, вливают в 800 мл ледяной уксусной кислоты, прибавляют V_1 мл уксусного ангидрида, тщательно перемешивают, доводят объем раствора ледяной уксусной кислотой до 1 л и снова перемешивают. Через сутки раствор готов.

Приготовление растворов щелочей

При растворении NaOH или KOH необходимо пользоваться резиновыми перчатками и защитными очками. Щелочи вызывают химический ожог кожи, разрушают одежду и обувь. Брать твердую щелочь руками запрещается.

Водные растворы NaOH и KOH. При растворении твердых NaOH и KOH в воде происходит сильное разогревание; поэтому насыщенные растворы щелочей готовят в термостойкой стеклянной или, лучше, в фарфоровой посуде, постепенно добавляя твердую щелочь при перемешивании, чтобы избежать местного перегрева.

На воздухе NaOH и KOH поглощают воду и CO_2 . Образующиеся карбонаты мало растворимы в концентрированном растворе щелочей и постепенно выпадают в осадок.

Концентрированные растворы щелочей при хранении в стеклянной посуде разрушают стекло, выщелачивая из него

кремневую кислоту. Поэтому лучше хранить их в сосудах из полиэтилена.

Из концентрированных растворов получают разбавленные растворы щелочей, концентрацию которых контролируют по плотности. Ориентировочное значение объемов разбавляемого раствора щелочи и воды можно рассчитать и по правилу креста.

Приготовление 50% раствора NaOH, не содержащего карбонатов (по ГОСТ 4517-75), производят следующим образом: в фарфоровом стакане растворяют при постепенном добавлении и перемешивании 250 г NaOH в 250 мл дистиллированной воды. После охлаждения раствор переливают в полиэтиленовый сосуд, закрывают пробкой и выдерживают 2-3 недели, до полного осаждения NaCO_3 . Затем прозрачный раствор сифонируют стеклянной трубкой и соответственно разбавляют водой, не содержащей CO_2 .

Приготовление рабочих растворов точной концентрации

Приготовление раствора из навески стандартного вещества. Взятую с точностью до 0,0002 г навеску высушенного стандартного вещества, которая приблизительно соответствует рассчитанной для получения определенного объема раствора заданной концентрации, аккуратно переносят в мерную колбу и растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды, не содержащей CO_2 . Полученный раствор при периодическом взбалтывании разбавляют водой, доводя объем раствора в мерной колбе несколько ниже метки. Затем колбу с раствором выдерживают 15-20 мин при 20°C и осторожно добавляют воду до метки. Колбу закрывают пробкой и содержимое взбалтывают в течение 15-30 мин.

Зная массу исходного вещества и объем раствора, вычисляют его концентрацию.

Для упрощения последующих расчетов удобно пользоваться поправкой на нормальность (или коэффициентом нормальности) K. Эта поправка представляет собой отношение нормальности приготовленного раствора к заданной нормальности раствора, выраженной целыми, десятыми или сотыми долями нормальности. Например, нормальность приготовленного раствора оказалась равной 0,1036 н., а заданная 0,1 н. В этом случае

$$K = \frac{0,1036}{0,1000} = 1,036$$

При умножении объема дошедшего на титрование раствора на эту поправку K получают эквивалентный объем заданной концентрации (в данном случае 0,1 н.).

В табл. 6 приведены некоторые твердые стандартные вещества, с помощью которых точно устанавливается концентрация наиболее часто применяемых рабочих растворов.

Таблица 6

Стандартные вещества и рабочие растворы

Рабочий раствор	Стандартное вещество	Методика определения
HCl, H ₂ SO ₄	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O Эквивалент 190,70	Навеску - 0,4 г растворяют при нагревании в 25 мл H ₂ O, охлаждают и титруют с метиловым оранжевым до оранжевой окраски
NaOH, KOH	Na ₂ CO ₃ Эквивалент 53,00 Высушивание при 150 °C	Навеску -0,1 г растворяют в 25 мл H ₂ O и титруют с метиловым оранжевым до оранжевой окраски
	(CH ₂ COOH) ₂ янтарная кислота Эквивалент 59,04 Высушивание при 100°C	Навеску -0,12 г растворяют в 30 мл H ₂ O и титруют с фенолфталеином до розовой окраски
	H ₂ NSO ₃ H сульфаминовая кислота Эквивалент 97,10 Высушивание при 100 °C	Навеску -0,1 г растворяют в 30 мл H ₂ O и титруют с метиловым оранжевым до желтой окраски
AgNO ₃	NaCl Эквивалент 58,44 Высушивание при 120 °C	Навеску -0,1 г растворяют в 20 мл H ₂ O добавляют. 10 мл HNO ₃ (1:10) и титруют с 5 каплями 1 % спиртового раствора дифенилкарбазона до темно-голубой окраски

KMnO ₄	Na ₂ C ₂ O ₄ Эквивалент 67,00 Высушивание при 105-120 °C	Навеску -0,13 г растворяют в 50 мл H ₂ O, добавляют 10 мл H ₂ SO ₄ (1:1), нагревают до 80°C и титруют до розовой окраски
HClO ₄	C ₈ H ₅ O ₄ K гидрофталат калия Эквивалент 201,23 Высушивание при 110-116 °C	Навеску -0,5 г растворяют при нагревании в 50 мл безводной CH ₃ COOH, добавляют 2 капли кристаллического фиолетового и титруют 0,1 н. HClO ₄ до перехода окраски из синей в зеленую
Na ₂ S ₂ O ₃	I ₂ (возогнаный) Эквивалент 126,9	Навеску -0,25 г растворяют 10 мл 20% раствора KI и титруют с раствором крахмала до обесцвечивания
	KIO ₃ Эквивалент 35,67	Навеску -0,07 г растворяют в 25 мл H ₂ O, добавляют 2 г KI, 10 мл 1 н. HCl и титруют с раствором крахмала до обесцвечивания

Приготовление растворов из фиксаналов. Фиксаналы, или стандарт-титры, представляют собой точно отвешенное количество реактива или его раствора, запаянного в стеклянную ампулу. Как правило, в каждой ампуле содержится 0,1 эквивалента вещества. При количественном перенесении содержимого подобной ампулы в мерную колбу на 1 л и доведении объема раствора водой до метки при 20 °C получаются точно 0,1 н. растворы.

Выпускаются фиксаналы HCl, H₂SO₄, NaOH, KOH, Na₂CO₃, NaCl, Na₂CO₃, H₂C₂O₄·2H₂O, K₂Cr₂O₇, K₂C₂O₄, Na₂S₂O₃·5H₂O, KMnO₄, AgNO₃, NH₄SCN, KSCN, NaSCN, BaCl₂·2H₂O, (NH₄)₂C₂O₄·H₂O, Na₂B₄O₇·10H₂O, KCl, K₂CO₃, NH₄Cl, I₂ и др.

Фиксаналы рекомендуется применять во всех случаях, когда требуется быстро приготовить точный рабочий раствор, не прибегая к взвешиванию.

Вначале теплой водой смывают надпись на ампуле и хорошо обтирают ее чистым полотенцем. В мерную колбу вместимостью 1 л вставляют воронку с вложенным в нее стеклянным бойком (обычно прилагается к каждой коробке фиксанала), острый конец

которого должен быть обращен вверх. Ампуле с фиксаналом дают свободно падать так, чтобы тонкое дно ампулы разбилось при ударе об острый конец бойка. После этого другим стеклянным бойком пробивают боковое углубление ампулы и дают содержимому вытечь. Не меняя положения ампулы, в образовавшееся верхнее отверстие вставляют оттянутый в капилляр и изогнутый вверх конец трубки сильной струей промывают ампулу изнутри. Затем струей воды хорошо промывают наружную поверхность ампулы и воронку с бойком. Удалив ампулу из воронки, доводят уровень жидкости в колбе до метки. Колбу плотно закрывают и тщательно перемешивают раствор.

При пользовании фиксаналом 0,1 н. йода перед вскрытием ампулы необходимо поместить в мерную колбу 30-40 г KI для полного растворения йода.

Ампулы с фиксанами твердых веществ ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, KMnO_4 и др.) вскрывают так же, как описано выше, но воронка должна быть совершенно сухая. Когда ампула разбита, содержимое ее осторожным встряхиванием высыпают в колбу, ампулу и воронку тщательно промывают дистиллированной водой.

Фиксанал AgNO_3 при обычных условиях хранения через 2-3 года темнеет. Фиксаналы большинства других твердых веществ и кислот могут храниться неопределенно долгое время.

Фиксаналы NaOH, KOH пригодны только в течение 6 месяцев со дня их выпуска. Помутнение щелочных растворов - признак их порчи.

Рабочие растворы с точной концентрацией должны быть по возможности свежеприготовленными. Исключение составляют растворы KMnO_4 , титр которых следует устанавливать не ранее чем через 3-4 дня после их приготовления.

При хранении рабочих растворов следует периодически проверять их концентрацию. Рабочие растворы щелочей и тиосульфата натрия следует защищать от действия CO_2 (хлоркальциевые трубки с натронной известью или аскаритом).

Сосуды с рабочими растворами должны иметь четкие надписи с указанием вещества, нормальности, поправочного коэффициента, даты изготовления и даты проверки концентрации.

Расчеты при приготовлении водных растворов

Приблизительные растворы. При приготовлении приблизительных растворов количества веществ, которые должны быть взяты для этого, вычисляют с небольшой точностью. Атомные веса элементов для упрощения расчетов допускается брать округленными иногда до целых единиц. Так, для грубого подсчета атомный вес железа можно принять равным 56 вместо точного — 55,847; для серы — 32 вместо точного 32,064 и т. д.

Вещества для приготовления приблизительных растворов взвешивают на теххимических или технических весах.

Принципиально расчеты при приготовлении растворов совершенно одинаковы для всех веществ.

Количествоготавливаемого раствора выражают или в единицах массы (г, кг), или в единицах объема (мл, л), причем для каждого из этих случаев вычисление количества растворяемого вещества проводят по-разному.

Пример. Пусть требуется приготовить 1,5 кг 15%-ного раствора хлористого натрия; предварительно вычисляем требуемое количество соли. Расчет проводится согласно пропорции:

$$\begin{array}{l} 100 - 15 \\ 1500 - x \end{array} \quad x = \frac{15 \cdot 1500}{100} = 225$$

т. е. если в 100 г раствора содержится 15 г соли (15%), то сколько ее потребуется для приготовления 1500 г раствора?

Расчет показывает, что нужно отвесить 225 г соли, тогда воды нужно взять $1500 - 225 = 1275$ г.

Если же задано получить 1,5 л того же раствора, то в этом случае по справочнику узнают его плотность, умножают последнюю на заданный объем и таким образом находят массу требуемого количества раствора. Так, плотность 15%-ного раствора хлористого натрия при 15°C равна 1,184 г/см³. Следовательно, 1500 мл составляет

$$1500 \cdot 1,184 = 1776 \text{ г}$$

т. е.

$$100 - 15$$

$$1776 - x$$

$$x = \frac{15 \cdot 1776}{100} = 266,4 \text{ г}$$

Следовательно, количество вещества для приготовления 1,5 кг и 1,5 л раствора различно.

Расчет, приведенный выше, применим только для приготовления растворов безводных веществ. Если взята водная соль, например $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ то расчет несколько видоизменяется, так как нужно принимать во внимание и кристаллизационную воду.

Пример. Пусть нужно приготовить 2 кг 10%-ного раствора Na_2SO_4 , исходя из $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

Молекулярный вес Na_2SO_4 равен 142,041, а $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 322,195, или округленно 322,20.

Расчет ведут вначале на безводную соль:

$$\begin{array}{rcl} 100 & \text{—} & 10 \\ 2000 & \text{—} & x \end{array} \quad x = \frac{10 \cdot 2000}{100} = 200 \text{ г}$$

Следовательно, нужно взять 200 г безводной соли. Количество десятиводной соли находят из расчета:

$$\begin{array}{rcl} 142,04 & \text{—} & 322,2 \\ 200 & \text{—} & x \end{array} \quad x = \frac{200 \cdot 322,2}{142,04} = 453,7 \text{ г}$$

Воды в этом, случае нужно взять: $2000 - 453,7 = 1546,3 \text{ г}$.

Так как раствор не всегда готовят с пересчетом на безводную соль, то на этикетке, которую обязательно следует наклеивать на сосуд с раствором, нужно указать, из какой соли приготовлен раствор, например 10%-ный раствор Na_2SO_4 или 25%-ный $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

Часто случается, что приготовленный ранее раствор нужно разбавить, т. е. уменьшить его концентрацию; растворы разбавляют или по объему, или по массе.

Пример. Нужно разбавить 20%-ный раствор сернокислого аммония так, чтобы получить 2 л 5%-ного раствора. Расчет ведем следующим путем. По справочнику узнаем, что плотность 5%-ного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ равна $1,0287 \text{ г/см}^3$. Следовательно, 2 л его должны весить $1,0287 \cdot 2000 = 2057,4 \text{ г}$. В этом количестве должно находиться сернокислого аммония:

$$\begin{array}{rcl} 100 & \text{—} & 5 \\ 2057,4 & \text{—} & x \end{array} \quad x = \frac{5 \cdot 2057,4}{100} = 102,87 \text{ г}$$

Теперь можно подсчитать, сколько нужно взять 20%-ного раствора, чтобы получить 2 л 5%-ного раствора.

$$\begin{array}{rcl} 100 & \text{—} & 20 \\ x & & \text{—} \end{array} \quad 102,87$$

$$x = \frac{100 \cdot 102,87}{20} = 514,35 \text{ г}$$

Полученную массу раствора можно пересчитать на объем его. Для этого массу раствора делят на его плотность (плотность 20%-ного раствора равна $1,1149 \text{ г/см}^3$), т. е.

$$\frac{514,35}{1,1149} = 461,3 \text{ мл}$$

Учитывая, что при отмеривании могут произойти потери, нужно взять 462 мл и довести их до 2 л, т. е. добавить к ним $2000 - 462 = 1538 \text{ мл}$ воды.

Если же разбавление проводить по массе, расчет упрощается. Но вообще разбавление проводят из расчета на объем, так как жидкости, особенно в больших количествах, легче отмерить по объему, чем взвесить.

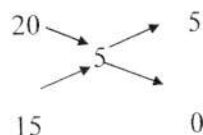
Нужно помнить, что при всякой работе как с растворением, так и с разбавлением никогда не следует выливать сразу всю воду в сосуд. Водой ополаскивают несколько раз ту посуду, в которой проводилось взвешивание или отмеривание нужного вещества, и каждый раз добавляют эту воду в сосуд для раствора.

Когда не требуется особенной точности, при разбавлении растворов или смешивании их для получения растворов другой концентрации можно пользоваться следующим простым и быстрым способом.

Возьмем разобранный уже случай разбавления 20%-ного раствора сернокислого аммония до 5%-ного. Пишем вначале так:

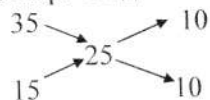
$$\begin{array}{ccc} 20 & & \\ & \searrow & \\ & & 5 \\ 0 & \nearrow & \end{array}$$

где 20 - концентрация взятого раствора, 0 - вода и 5-требуемая концентрация. Теперь из 20 вычитаем 5 и полученное значение пишем в правом нижнем углу, вычитая же нуль из 5, пишем цифру в правом верхнем углу. Тогда схема примет такой вид:



Это значит, что нужно взять 5 объемов 20%-ного раствора и 15 объемов воды. Конечно, такой расчет не отличается точностью.

Если смешивать два раствора одного и того же вещества, то схема сохраняется та же, изменяются только числовые значения. Пусть смешением 35%-ного раствора и 15%-ного нужно приготовить 25%-ный раствор. Тогда схема примет такой вид:



т. е. нужно взять по 10 объемов обоих растворов. Эта схема дает приблизительные результаты и ею можно пользоваться только тогда, когда особой точности не требуется. Для всякого химика очень важно воспитать в себе привычку к точности в вычислениях, когда это необходимо, и пользоваться приближенными цифрами в тех случаях, когда это не повлияет на результаты работы. Когда нужна большая точность при разбавлении растворов, вычисление проводят по формулам.

Точные растворы. При приготовлении точных растворов вычисление количеств нужных веществ проверяют уже с достаточной степенью точности. Атомные веса элементов берут по таблице, в которой приведены их точные значения. При сложении (или вычитании) пользуются точным значением слагаемого с наименьшим числом десятичных знаков. Остальные слагаемые округляют, оставляя после запятой одним знаком больше, чем в слагаемом с наименьшим числом знаков. В результате оставляют столько цифр после запятой, сколько их имеется в слагаемом с наименьшим числом десятичных знаков; при этом производят необходимое округление. Все расчеты производят, применяя логарифмы, пятизначные или четырехзначные. Вычисленные количества вещества отвешивают только на аналитических весах.

Взвешивание проводят или на часовом стекле, или в бюксе. Отвешенное вещество высыпают в чисто вымытую мерную колбу через чистую сухую воронку небольшими порциями. Затем из

промывалки несколько раз небольшими порциями воды обмывают над воронкой биде или часовое стекло, в котором проводилось взвешивание. Воронку также несколько раз обмывают из промывалки дистиллированной водой.

Для пересыпания твердых кристаллов или порошков в мерную колбу очень удобно пользоваться воронкой. Такие воронки изготовляют емкостью 3, 6, и 10 см³. Взвешивать навеску можно непосредственно в этих воронках (негигроскопические материалы), предварительно определив их массу. Навеска из воронки очень легко переводится в мерную колбу. Когда навеска пересыпается, воронку, не вынимая из горла колбы, хорошо обмывают дистиллированной водой из промывки.

Как правило, при приготовлении точных растворов и переводе растворимого вещества в мерную колбу растворитель (например, вода) должен занимать не более половины емкости колбы. Закрыв пробкой мерную колбу, встряхивают ее до полного растворения твердого вещества. После этого полученный раствор дополняют водой до метки и тщательно перемешивают.

Молярные растворы. Для приготовления 1 л 1 М раствора какого-либо вещества отвешивают на аналитических весах 1 моль его и растворяют, как указано выше.

Пример. Для приготовления 1 л 1 М раствора азотнокислого серебра находят в таблице или подсчитывают молекулярную массу AgNO_3 , она равна 169,875. Соль отвешивают и растворяют в воде.

Если нужно приготовить более разбавленный раствор (0,1 или 0,01 М), отвешивают соответственно 0,1 или 0,01 моль соли.

Если же нужно приготовить меньше 1 л раствора, то растворяют соответственно меньшее количество соли в соответствующем объеме воды.

Нормальные растворы готовят аналогично, только отвешивая не 1 моль, а 1 грамм-эквивалент твердого вещества.

Если нужно приготовить полунормальный или децинормальный раствор, берут соответственно 0,5 или 0,1 грамм-эквивалента. Когда готовят не 1 л раствора, а меньше, например 100 или 250 мл, то берут 1/10 или 1/4 того количества вещества, которое требуется для приготовления 1 л, и растворяют в соответствующем объеме воды.

После приготовления раствора его нужно обязательно проверить титрованием соответствующим раствором другого

вещества с известной нормальностью. Приготовленный раствор может не отвечать точно той нормальности, которая задана. В таких случаях иногда вводят поправку.

В производственных лабораториях иногда готовят точные растворы «по определяемому веществу». Применение таких растворов облегчает расчеты при анализах, так как достаточно умножить объем раствора, пошедший на титрование, на титр раствора, чтобы получить содержание искомого вещества (в г) во взятом для анализа количестве какого-либо раствора.

Расчет при приготовлении титрованного раствора по определяемому веществу ведут также по грамм-эквиваленту растворяемого вещества, пользуясь формулой:

$$a = \frac{Э_p TV}{Э_o 1000}$$

- где a — количество растворяемого вещества, г;
 $Э_p$ — грамм-эквивалент растворяемого вещества, г;
 T — титр раствора по определяемому веществу, г/мл;
 V — заданный объем раствора, мл;
 $Э_o$ — грамм-эквивалент определяемого вещества, г.

Пример. Пусть нужно приготовить 3 л раствора марганцовокислого калия с титром по железу 0,0050 г/мл. Грамм-эквивалент $KMnO_4$ равен 31,61, а грамм-эквивалент Fe 55,847.

Вычисляем по приведенной выше формуле:

$$a = \frac{3,61 \cdot 0,0050 \cdot 3000}{55,847} = 8,49 \text{ г}$$

Стандартные растворы. Стандартными называют растворы с разными, точно определенными концентрациями, применяемые в колориметрии, например растворы, содержащие в 1 мл 0,1, 0,01, 0,001 мг и т. д. растворенного вещества.

Кроме колориметрического анализа, такие растворы бывают нужны при определении pH, при нефелометрических определениях и пр. Иногда стандартные растворы хранят в запаянных ампулах, однако чаще приходится готовить их непосредственно перед применением. Стандартные растворы готовят в объеме не больше 1 л, а чаще — меньше. Только при большом расходе стандартного

раствора можно готовить несколько литров его и то при условии, что стандартный раствор не будет храниться длительный срок.

Количество вещества (в г), необходимое для получения таких растворов, вычисляют по формуле:

$$a = \frac{M_1 TV}{M_2 (A)}$$

- Где M_1 — молекулярный вес растворяемого вещества;
 T — титр раствора по определяемому веществу, г/мл;
 V — заданный объем, мл;

$M_2 (A)$ — молекулярный или атомный вес определяемого вещества.

Пример. Нужно приготовить стандартные растворы $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ для колориметрического определения меди, причем в 1 мл первого раствора должно содержаться 1 мг меди, второго — 0,1 мг, третьего — 0,01 мг, четвертого — 0,001 мг. Вначале готовят достаточное количество первого раствора, например 100 мл.

В данном случае $M_1 = 249,68$; $Cu(A) = 63,54$ (A — молекулярный или атомный вес определяемого вещества); следовательно, для приготовления 100 мл раствора, 1 мл которого содержал бы 1 мг меди ($T = 0,001$ г/мл), нужно взять

$$a = \frac{249,68 \cdot 0,001 \cdot 100}{63,54} = 0,3929 \text{ г} \quad CuSO_4 \cdot 5 H_2O$$

Навеску соли переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и добавляют воду до метки. Другие растворы готовят соответствующим разбавлением приготовленного.

Эмпирические растворы. Концентрацию этих растворов чаще всего выражают в г/л или г/мл. Для приготовления эмпирических растворов применяют очищенные перекристаллизацией вещества или реактивы квалификации ч. д. а. или х. ч.

Пример. Нужно приготовить 0,5 л раствора $CuSO_4$, содержащего Cu 10 мг/мл. Для приготовления раствора применяют $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.

Чтобы подсчитать, сколько следует взять этой соли для приготовления раствора заданного объема, подсчитывают, сколько Cu должно содержаться в нем. Для этого объем умножают на заданную концентрацию, т. е.

$$500 \cdot 10 = 5000 \text{ мг, или } 5,0000 \text{ г}$$

После этого, зная молекулярный вес соли, подсчитывают нужное количество ее:

$$249,68 - 63,54 \quad \text{или} \quad x = \frac{249,68 \cdot 5}{63,53} = 19,648 \text{ г}$$

$$x - 5,000$$

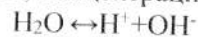
На аналитических весах отвешивают в бюксе точно 19,648 г чистой соли, переводят ее в мерную колбу емкостью 0,5 л. Растворение проводят, как указано выше.

2.2.7. Буферные растворы. Методы определения концентрации ионов водорода

Одно из важнейших свойств водных растворов — их кислотность (или щелочность), которая определяется концентрацией ионов H^+ и OH^- . Концентрации этих ионов в водных растворах связаны простой зависимостью $[\text{H}^+][\text{OH}^-] = K_w$; (квадратными скобками принято обозначать концентрацию в единицах моль/л). Величина K_w называется ионным произведением воды и при данной температуре постоянна. Чаще всего пользуются значением K_w при 25°C, которое равно $1,00 \cdot 10^{-14}$.

$$[\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-] = 10^{-7} \cdot 10^{-7}$$

В абсолютно чистой воде, не содержащей даже растворенных газов, концентрации ионов H^+ и OH^- равны (раствор нейтрален).



В других случаях эти концентрации не совпадают: в кислых растворах преобладают ионы H^+ , в щелочных — ионы OH^- . Но их произведение в любых водных растворах постоянно. Поэтому если увеличить концентрацию одного из этих ионов, то концентрация другого иона уменьшится во столько же раз.

$$\text{pH} = -\lg[\text{H}^+];$$

Эта величина может изменяться в небольших пределах — всего от -1 до 14. При этом изменению концентрации ионов H^+ в 10 раз соответствует изменение pH на одну единицу.

При комнатной температуре в нейтральных растворах $\text{pH} = 7$, в кислых растворах $\text{pH} < 7$, а в щелочных $\text{pH} > 7$. Приблизительно значение pH водного раствора можно определить с помощью индикаторов.

Буферные растворы

Растворы, способные сохранять постоянную концентрацию ионов H^+ при добавлении к ним небольшого количества сильной кислоты или щелочи, а также при разбавлении, называются буферными растворами или буферными системами.

Различают в основном протолитические буферные растворы двух типов:

- Кислотные буферные системы обычно образованы слабой неорганической или органической кислотой и солью этой же кислоты с сильным основанием. Например:

CH_3COOH	+	CH_3COONa	=	ацетатный буфер
слабая кислота		соль кислоты		

H_2CO_3 ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$)	+	NaHCO_3	=	гидрокарбонатный или бикарбонатный буфер
слабая кислота		соль кислоты		

- Основные буферные системы образованы слабым неорганическим или органическим основанием и солью этого основания с сильной кислотой. Например:

$\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (NH_4OH)	+	NH_4Cl	=	аммиачный буфер
Слабое основание		соль		
$\text{C}_2\text{H}_5\text{—NH}_2$	+	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_3\text{Cl}$	=	этиламинный буфер
слабое основание		соль		

Уровень pH буферных растворов зависит от соотношения в нем кислот и солей, поэтому уровень pH раствора всегда одинаков. Уровень pH буферных растворов теоретически рассчитывается по следующей формуле.

$$[\text{H}^+] = \frac{C_{\text{кислота}}}{C_{\text{соль}}} K \quad \text{или} \quad [\text{OH}^-] = \frac{C_{\text{основание}}}{C_{\text{соль}}} K$$

Здесь $C_{\text{кислота}}$ — концентрация кислоты; $C_{\text{соль}}$ — концентрация соли; $C_{\text{основание}}$ — это концентрация основания; Точка электролитической диссоциации K-кислоты (основания)

Для живых организмов характерно поддержание кислотно-основного гомеостаза на определенном уровне. Это находит выражение в достаточно постоянных значениях pH биологических

сред и способности восстанавливать нормальные значения pH при воздействии протолитов. В процессе метаболизма в организме постоянно происходит синтез, распад и взаимодействие огромного количества химических соединений. Все эти процессы осуществляются при помощи ферментов, активность которых связана с определённым значением pH.

Обеспечение постоянства pH крови и других органов и тканей является одним из важнейших условий нормального существования организма. Это обеспечение достигается наличием в организме многочисленных регулирующих систем, важнейшими из которых являются буферные системы. Таким образом, важнейшая физиологическая функция клеток также зависит от концентрации ионов водорода и их соотношения. Изменения концентрации соли в биологических жидкостях приводят к нарушению ряда важных физиологических функций.

Буферная емкость

Способность буферных систем противодействовать резкому изменению pH при добавлении к ним сильной кислоты или основания является ограниченной. Буферная смесь поддерживает pH постоянным только при условии, что количество вносимых в раствор сильной кислоты или щелочи не превышает определенной величины. В противном случае наблюдается резкое изменение pH, т.е. буферное действие раствора прекращается.

Это связано с тем, что в результате протекающей реакции изменяется соотношение молярных концентраций компонентов буферной системы:

$$C_{\text{кислоты}}/C_{\text{соли}} \text{ или } C_{\text{основания}}/C_{\text{соли}}.$$

При этом концентрация компонента, реагирующего с добавленной кислотой или щелочью, уменьшается, а концентрация второго компонента возрастает, т.к. он дополнительно образуется в ходе реакции.

Количественно буферное действие раствора характеризуется с помощью буферной емкости (В). При этом различают буферную емкость по кислоте (V_K) и буферную емкость по основанию или щелочи (V_O).

Буферной емкостью по кислоте является то количество химического эквивалента сильной кислоты, которое нужно добавить к 1 литру (1 дм³) буферной системы, чтобы уменьшить её pH на единицу. Ее можно рассчитать по следующей формуле:

$$V_K = \frac{n(1/z \text{ HA})}{pH_1 - pH_2}$$

Где, $n(1/z \text{ HA})$ — число молей химического эквивалента сильной кислоты, добавленное к 1 литру буферной системы; pH_1 — водородный показатель системы до добавления сильной кислоты; pH_2 — водородный показатель системы после добавления сильной кислоты.

Соответственно буферной емкостью по основанию является то количество химического эквивалента сильного основания (щелочи), которое нужно добавить к 1 литру (1 дм³) буферной системы, чтобы вызвать увеличение ее pH на единицу:

$$V_O = \frac{n(1/z \text{ B})}{pH_2 - pH_1}$$

Где, $n(1/z \text{ B})$ — число молей химического эквивалента основания, которое добавили к 1 литру буферного раствора; pH_1 — водородный показатель раствора до добавления основания; pH_2 — водородный показатель раствора после добавления основания.

Определение концентрации ионов водорода с помощью индикатора

Концентрацию (pH) ионов водорода можно определить с помощью индикаторов. Индикаторами являются слабые органические кислоты или основания, а их недиссоциированные формы отличаются от окрашенных диссоциированных форм. Диссоциация индикаторов зависит от реакционной среды.

Цветовые переходы некоторых индикаторов в зависимости от pH среды.

Цвет индикатора, интервал pH:

Цвет индикатора, интервал pH:			
Индикатор	в кислой среде	в нейтральной	в щелочной
Лакмус	красный $pH < 5$	фиолетовый $5 < pH < 8$	синий $pH > 8$
Фенолфталеин	бесцветный $pH < 8$	бледно-розовый $8 < pH < 9,8$	малиновый $pH > 9,8$
Метилоранж	красный $pH < 3,1$	оранжевый $3,1 < pH < 4,4$	желтый $pH > 6,3$

Добавляя индикатор в раствор, можно определить pH среды в зависимости от образовавшейся окраски.

Реактивы: 1) 0,15М-ный раствор KH_2PO_4 . 2) 0,15М-ный раствор NaH_2PO_4 . 3) метилрот, бромтимоловые индикаторы. 4) универсальный индикатор.

Индикаторы могут иметь разные цвета в зависимости от pH среды. Это можно увидеть в следующем примере:

№	Индикаторы	Предел изменения цвета	Цвет	
			В кислотах	В щелочи
1	Метил оксид	3,1-4,4	красный	желтый
2	Метилрот	4,2-6,2	красный	желтый
3	Бромтимол	6,0-7,6	желтый	синий
4	Фенолфталеин	8,0-9,8	бесцветный	пурпурно-красный
5	Тимолфталеин	9,3-10,5	бесцветный	темно-желто-коричневый

Ход работы: В четырех пробирках готовим буферные растворы с различными pH концентрациями, взяв 0,15 М-ные растворы KH_2PO_4 и NaH_2PO_4 в пропорциях, указанных ниже. При смешивании растворов буфер в каждом растворе делится на два.

В пробирки первого ряда добавляется метилротный индикатор. В пробирки второго ряда добавляется бромтимоловый индикатор и наблюдается изменение окраски в пробирках

Растворы	Номера пробирок			
	1	2	3	4
0,15 М KH_2PO_4 , мл	9,5	8,0	6,0	3,0
0,15 М NaH_2PO_4 , мл	0,5	2,0	4,0	7,0
pH раствора	5,59	6,24	6,64	7,17

2.2.8. Определение количества белков биуретовым методом

Белки реагируют с атомами меди в щелочных условиях, образуя сине-пурпурный цвет. Интенсивность этого цвета варьируется в зависимости от количества белка в растворе. Биуретовый метод выполняется быстрее и проще, чем метод

Кельдаля. Этот метод используется только при тестировании материалов с высоким содержанием белка.

Необходимые инструменты: Штатив; пробирки; Пипетки 1, 2, 5, 10 мл; Спектрофотометр.

Реактивы: 1. Стандартный раствор белка альбумина, этот раствор содержит 10 мг белка альбумина в 1 мл. 2. Биуретовый реагент берут из 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (натрий-тарtrat-калиевая или сегнетова соль) и растворяют в 50 мл воды. К этому раствору смешать, добавляя 30 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и добавляя к раствору 0,1 г соли КДж, доводя до 100 мл водой.

Ход работы: для построения откалиброванного графика используется стандартный раствор белка альбумина, в котором хранится 10 мг белка альбумина в 1 мл раствора. Образцы готовят следующим образом.

№	Количество белка, мг	Объем белкового раствора, мл	H_2O , мл
1	2	0,2	1,8
2	4	0,4	1,6
3	6	0,6	1,4
4	8	0,8	1,2
5	10	1,0	1,0
6	12	1,2	0,8
7	16	1,6	0,4
8	20	2,0	-
9	0	-	2,0

Добавить во все пробирки 8 мл биурета и оставить при комнатной температуре. Измерение производится путем сравнения воды в девятом растворе, который сохраняет все компоненты, кроме белка. Через 30 минут его измерить на спектрофотометре при длине волны 540 нм. Полученные результаты использовать для построения калиброванного графика. Для построения графика величина оптической плотности откладывается по оси ординат, а количество белка, соответствующего оптической плотности, откладывается по оси абсцисс.

Для определения количества белка в исследуемом растворе работа проводится в вышеуказанных условиях. Для этого исследуемый белок разводится до 2 мл, затем добавляется 8 мл биурета.

В зависимости от оптической плотности тестируемого белка определяется количество белка на графике. Количество белков рассчитывается в мг%.

2.2.9. Определение количества белков методом микробиурета

Реактивы: 1. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -2,1%-ный раствор. 2. KOH -30% -ный раствор. 3. А раствор 4. Для приготовления этого раствора смешайте 1 часть 2,1% -ного раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 9 частей раствора KOH -30%-ного. Этот раствор готовят перед использованием.

Ход работы: Выполнить калибровку по стандартному раствору белка альбумина для определения количества белка в тестируемом объекте; график создан. Образцы, содержащие от 5 мкг до 120 мкг белка, готовят для построения графика. К этим образцам добавляют 2,5 мл раствора А, измеренного при 310 нм на спектрофотометре через 30 минут.

Чтобы определить количество белка в исследуемом растворе, возьмите 0,5 мл этого раствора, добавьте 2,5 мл раствора и измерьте в условиях, описанных выше.

2.2.10. Определение содержания белка по методу Лоури

Этот метод широко используется при определении количества белка. Этот метод обладает высокой чувствительностью и может определять содержание белка в образцах от 10 до 100 мкг. Метод основан на цветах, образованных ароматическими аминокислотами в сочетании с реагентом Фолина за счет пептидных связей реакции биурета.

Построен откалиброванный график для определения количества белка. Для построения этого графика используются стандартные растворы альбумина.

Необходимые инструменты: штатив; пробирки; пипетки 0,1, 1,5 и 10 мл; спектрофотометр.

Реактивы: 1. 0,1 Н раствор гидроксида натрия. 2. Раствор А: раствор 2%-ного карбоната натрия в 0,1 Н гидроксиде натрия. 3. Раствор В: 0,5%-ный раствор сульфата меди в 1%-ном тартрате натрия. Для приготовления раствора 10 г тартрата натрия

растворяют в 300 мл воды. Затем к раствору добавляют 5 г сульфата меди и объем увеличивают до 1 литра. 4. Раствор С: чтобы приготовить этот раствор, добавить 1 мл раствора В к 49 мл раствора А. Этот раствор готовится перед анализом. 5. Реагент Фолин или раствор Е. Для приготовления раствора взять 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г соли $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 2-литровую колбу и растворить в 700 мл воды. Затем к раствору добавить 50 мл 85% кислоты H_3PO_4 и 100 мл концентрированной кислоты HCl . Затем смесь добавить в обратную колбу и кипятить 10-12 часов. После закипания добавить 150 г сульфата лития, 50 мл воды, несколько капель бромированной воды. Прокипятить без охлаждения 15 минут, чтобы удалить излишки брома. Смесь охлаждают до комнатной температуры, фильтруют и доводят до 1 литра. Кислотность фолинового реагента определяют титрованием 0,1 Н гидроксидом натрия в присутствии фенолфталеина. Реагент хранится в темной таре. Реагент фолин с кислотностью 1 Н используется для определения белка.

Ход работы: Для построения калиброванного графика готовят стандартный раствор альбумина. Для этого 4 мг альбумина растворяют в 10 мл воде, в 0,1 мл этого раствора задерживается 40 мкг белка. Добавить в пробирки 10-120 мкг раствора белка альбумина. Подготовка к этому показана в таблице ниже.

№	Количества белка, мкг	Раствор белка, мл	Дистиллированная вода, мл
1	120	0,3	0,1
2	110	0,275	0,125
3	100	0,250	0,150
4	90	0,225	0,175
5	80	0,2	0,2
6	70	0,175	0,225
7	60	0,150	0,250
8	50	0,125	0,275
9	40	0,1	0,3
10	30	0,075	0,325
11	20	0,05	0,35
12	10	0,025	0,375
13	-	-	0,4

К каждому раствору добавить 2 мл раствора С, хорошо перемешать и оставить при комнатной температуре на 10 мин. Затем добавить 0,2 мл реагента Фолина, встряхнуть пробирки и оставить в комнате на 30 минут. Затем его измерить относительно безбелкового зонда на длине волны 750 нм на спектрофотометре. По полученным данным график называется солевым. Для этого величина оптической плотности по оси ординат, количество белка в мкг отложено по оси абсцисс.

Чтобы определить количество белка в биологическом объекте, добавьте к раствору 0,4 мл исследуемого белка (разведенного в 50 или 100 раз) в условиях, описанных выше. В зависимости от оптической плотности количество белка определяется по графику, затем количество белка в неразбавленном объекте рассчитывается в мг.

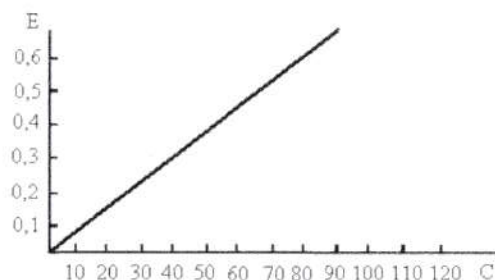


Рис.15. Калиброванный график. По оси абсцисс - количество белка в образцах, мкг (C); Оптическая плотность по оси ординат (E).

ГЛАВА III. МЕТОДЫ ЭНЗИМОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Экстракция

Обычный способ выделения ферментов — это получение экстрактов измельченного биологического материала — муки, солода проросших семян, животных тканей, бактериальной массы, мицелия грибов. В такой экстракт переходят различные белки и в том числе ферменты.

При изучении действия ферментов пользуются гомогенатами. Для получения гомогената, животную ткань измельчают гомогенизатором с тефлоновым пестиком. При этом добавляют буферный раствор соотношениями 1:10 гомогенат содержит обрывки клеток, их ядра, хлоропласты листьев и другие субклеточные структуры клеток (митохондрии и т.д.) пигменты, различные растворимые белки и т.д..

Многие ферменты, находящиеся в митохондриях, свободно переходят в раствор, как только мембрана митохондрии оказывается поврежденной или приобретает проницаемость.

Однако некоторые ферменты прочно связаны со структурой митохондрий и для их экстракции требуются специальные методы. В эти методы входят: высушивание ацетоном, обработка материала смесью бутанола с водой, экстракция высушенных митохондрий различными органическими растворителями, экстракция водными растворами детергентов; холат, дезоксихолат, твинтритон или обработка гидролитическими ферментами, например липазами, нуклеазами или протеолитическими ферментами.

3.1.1. Экстракция белков из биологических объектов

Чтобы определить качество белков, их сначала нужно разделить в чистом виде. Это один из признаков биологической ценности белков. Его аминокислотный состав проявляется в общем количестве белков, которые он выводит из организма.

Мы используем метод Т. Б. Плешкова при выделении белков от растений.

Реактивы: растительный материал, жидкий азот, боратный буфер (pH-10), 0,2%-ный раствор бисульфата натрия, белковый

спирт, 1%-ный и 10%-ный раствор уксусной кислоты, 0,2%-ный раствор каустической соды, трихлорацетат. 50%-ный раствор кислоты, ацетон, этиловый спирт, диэтиловый эфир.

3.1.2. Экстракция общих белков из растений

Существуют разные способы разделения белков из разных органов растений. Берут образец из лекарственного растения сenna, 50–100 г свежего материала (листья, стебли, плоды или других вегетативных органы) и замораживают в холодильнике или с использованием жидкого азота. Затем замороженный образец измельчают в гомогенизаторе или фарфоровой ступке с раствором боратного буфера (рН-10) в соотношении 1: 4 до образования однородной массы. Чтобы повысить растворимость белков при измельчении, добавьте немного 0,2%-ного раствора бисульфата натрия и 3-4 капли октилового спирта для предотвращения вспенивания. Полученный гомогенат замораживают в холодильнике, затем размораживают на шейкере 1-2 часа. По истечении времени его центрифугируют 10-15 минут со скоростью 3000 оборотов в минуту. Перелить раствор в мерную колбу до объема 500 мл. Осадок экстрагируют еще 5-6 раз небольшим объемом буферного раствора. Каждый раз при центрифугировании гомогената растворы переливают в мерную колбу. Весь объем раствора в колбе для экстракции до метки заполняют дистиллированной водой.

Количество растворенного азота должно составлять 90-95% от общего азота в растении. Чтобы определить белок в растворе по Келдалю, возьмите 20 мл раствора, а также на основе этого можно определить общий азот в тестируемом растительном материале.

Для осаждения растворенных белков раствор наливают в химический стакан емкостью 1000 мл и с помощью 10% -ного раствора уксусной кислоты доводят до рН 4,4-4,5. рН раствора определяется с помощью бумажного индикатора. Если среда становится кислой, ее рН можно снизить до 4,4-4,5 с помощью щелочи. Стакан с раствором нагревают на водяной бане до 70°C, осажденные белки центрифугируют и отделяют. Осажденные белки промывают уксусной кислотой. Для этого в центрифужную пробирку вливают 1%-ный раствор уксусной кислоты, перемешивают осадок, центрифугируют и выливают раствор на осадок.

Белки повторно осаждаются, чтобы разделить их в более чистом виде. Для этого в центрифужные пробирки наливают 0,2 Н раствор каустической соды, хорошо перемешивают осадок и переливают жидкость из пробирки в стакан. Пробирку еще несколько раз промывают 0,2 Н раствором едкого натра, и их также добавляют к жидкости в химическом стакане. Жидкость в химическом стакане перемешивают на водяной бане при 50°C до полного растворения белков. Нерастворимые частицы отделяют центрифугированием.

Для повторного осаждения белков в стакан, содержащий раствор белка, добавляют 50% трихлоруксусную кислоту до тех пор, пока конечная концентрация в растворе не станет 5%. В этом случае осажденные белки отделяют центрифугированием. Осадок белка в растворе центрифуги промывают ацетоном (5-6 раз), горячим этиловым спиртом (1-2 раза) и эфиром (2-3 раза) (при центрифугировании эфиром крышка центрифуги должна быть открыта). Каждый раз после центрифугирования жидкость на осадке сливается. Полученные таким образом белковые препараты сушат и хранят при комнатной температуре в вакуум-эксикаторе. Общий азот в оксидных препаратах определяют по методу Кельдаля. Получаемые белковые препараты представляют собой белый или светло-серый порошок, содержащий 14-16% азота.

3.1.3. Разделение белков на отдельные фракции

Для более глубокого изучения белков необходимо разделить их на фракции. Разделение белков на фракции основано на их растворении в разных растворителях.

Белки, выделенные из тканей растений, последовательно экстрагируются водой (альбулины), спиртом (проламины) и щелочными растворами (глутенины). Фракционирование белков также проводится в холодильных камерах при температуре около 4°C.

Ход работы: Взять 25-50 г исследуемого растительного материала, зафиксировать жидким азотом и заморозить в холодильнике. Затем замороженный материал гомогенизируют с водой (1:4) или измельчают в фарфоровой ступке до образования однородной массы. Полученную однородную массу переносят в колбу и встряхивают в течение 1 часа с помощью шейкера. Это

обеспечивает полное растворение белков. Затем пробирку оставляют в холодильнике при 0°C на 15-18 часов.

При отделении белков от семян растений семена сначала измельчают в муку мелкого помола. Их жиры и масла разделяются с помощью эфира и ацетона. Порошки ацетона сушат в эксикаторе. Берут 5-10 г ацетонового порошка, смешивают с 30-60 мл воды и встряхивают в течение 1 часа с помощью механического шейкера. Затем пробирку оставляют в холодильнике при 0°C на 15-18 часов.

3.1.4. Экстракция водорастворимых белков.

Последующие рабочие процедуры выполняются равномерно, независимо от растительного материала. После того, как белковые растворы вынут из холодильника, их центрифугируют и жидкость в осадке переливают в большой стакан. Осадок в центрифужном растворе гомогенизируют с трехкратной массой воды, помещают в колбу и встряхивают в течение 30-40 минут. Затем его снова центрифугируют и жидкость в осадке выливают снова в тот же стакан. Экстрагируют водой, повторяют центрифугирование еще 4-5 раз. В этом случае водорастворимые белки полностью экстрагируются, а осадок смешивается с 1М раствором хлорида калия в объеме, в 4-5 раз превышающем массу, и оставляется в холодильнике.

Когда ткань растения экстрагируется водой, в раствор попадают не только белки, но и другие водорастворимые соединения, включая свободные аминокислоты, сахара и минеральные соли. Поэтому полученный экстракт можно рассматривать как слабый физиологический раствор. В таком растворе есть не только водорастворимые белки (альбумины), возможно частично, также проходят белки (глобулины) в солевых растворах. Экстракт диализуют в дистиллированной воде для выделения альбуминов и глобулинов. Во время диализа низкомолекулярные вещества, включая минеральные соли, попадают в воду изнутри целлофанового мешка. В мешочке остаются только белки. В конце диализа из-за отсутствия солей в целлофановом мешке белки, растворимые в солевых растворах, немедленно осаждаются, а альбумин остается в растворе. Чтобы отделить альбумины от белков, растворимых в физиологических растворах, раствор в целлофановом пакете и осадок переносят в

центрифужные растворы. Пакет промывают 2-3 раза дистиллированной водой и также переливают в центрифужный пробирку. Затем его центрифугируют со скоростью 3-4 тысячи в минуту в течение 5-10 минут. Раствор переливают в мерную колбу на 250 мл. Осадок промывают 2-3 раза дистиллированной водой и центрифугируют. Все растворы переливают в мерную колбу и доливают до линии дистиллированной воды. Этот раствор, содержащий альбумин, хранится в холодильнике.

Оставшийся осадок в центрифужных пробирках растворяют в 10-15 мл 1М растворе хлорида калия и переливают в колбу на 250 мл. Пробирки 2-3 раза промывают раствором хлористого калия и также переливают в колбу. Жидкость в колбе заполняется до линии раствором хлорида калия. Этот раствор, содержащий легко растворимые глобулины, хранится в холодильнике.

3.1.5. Экстракция солерастворимых белков.

Растительную массу, оставленную 1М раствором хлорида калия, перемешивают в течение 1 часа с помощью шейкера. Затем центробежный раствор отделяют. Осадок 3-4 раза экстрагируют 1М раствором хлорида калия и центрифугируют. Все растворы добавляются к исходному раствору и заполняются раствором хлорида калия до метки измерительного стакана. Этот раствор состоит из глобулинов.

После разделения глобулинов оставшийся осадок экстрагируют 80% -ным раствором спирта. При этом спирторастворимые белки отделяются (проламины), экстракцию длится 1 час, затем центрифугируют и белковые растворы переливают в мерную колбу.

Осадок снова 3-4 раза экстрагируют спиртовым раствором и все растворы сливают в колбу. Колба наполняется спиртовым раствором до линии. Спиртовые растворы в холодильнике не хранятся. Их можно хранить при комнатной температуре, и количество белка следует определять, как можно скорее.

3.1.6. Экстракция щелочно-растворимых белков

Для этого остаток в центрифужной пробирке растворяют в 0,2%-ном растворе бисульфита натрия, приготовленной 0,2 М-ном

боратном буфере (рН-10). Разделение некоторых белковых фракций во многом зависит от времени нахождения растительного материала в растворителе.

После разделения всех белковых фракций оставшийся растительный материал промывают водой и фильтруют, затем остаток нагревают до 50-60°C и сушат. Общий азот в нем определяется по методу Кельдаля.

Таким образом, 6 различных белковых фракций растительного материала представляют собой альбумины, легкорастворимые глобулины и глобулины, которые разделяются с помощью хлорида калия; экстрагируются проламины, глютелины и нерастворимый азот.

3.1.7. Определение содержания белка по азоту

Для определения азота в тканях, органах, биологических жидкостях и водных экстрактах используются три различных модификации метода Кельдаля: макрометод, полумакрометод и микрометод.

Принцип метода. Когда ткань или белок заливают концентрированной серной кислотой или щелочным катализатором (минерализация), амины, имины и другие типы азота превращаются в аммиак. В конце реакции образуется сульфат аммония и определяется его количество.

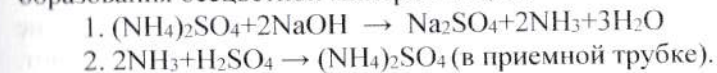
Необходимые инструменты: ножницы; скальпель; пипетки 1 и 2 мл; колба Кельдаля на 50 мл; бюретка 20 мл.

Реактивы: 1. Концентрированная серная кислота. 2. 0,1 Н раствор серной кислоты. 3. 0,1 Н раствор гидроксида натрия. 4. 33-40%-ный раствор гидроксида натрия. 5. Катализатор (пергидрол).

Ход работы: Определение общего азота в биологических объектах проводится в три этапа. Первый шаг - минерализовать белок. В колбу Кельдаля на 50 мл добавляют 0,2 мл сыворотки крови или 150-250 мг биологического объекта. Затем в пробирку добавляют 1-2 мл концентрированной серной кислоты и трубку нагревают на огне.

Исследуемый объект гидролизуют и разлагаются. Когда смесь станет коричневой, снимают колбу с огня, немного остужают и добавляют 2-4 капли пергидроля, встряхивают вещества в колбе и

снова ставят на огонь. Добавляют пергидроль еще 1-2 раза до образования бесцветной минерализации.



Третий этап. Титрование и расчет. По окончании процесса прогона приводную трубку промывают 2-3 мл дистиллированной воды и добавляют в приемную трубку. Серная кислота, не связанная с аммиаком в приемной колбе, титруется 0,1Н-ным раствором гидроксида натрия. Азот рассчитывается по следующей формуле.

$$X = \frac{(a-b) \cdot 1,4 \cdot 100}{C}$$

Где, X-тест-объекте, количество азота в мг %; а- количество 0,1 л раствора серной кислоты в приемной колбе; b - 0,1Н раствор гидроксида натрия, применяемый для нейтрализации связанной аммиаком серной кислоты; C - вес объекта испытаний, мг; 100 - обычный множитель для расчета азота в мг%.

3.1.8. Определение содержания остаточного азота в крови

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; колба Кельдаля 25 мл; фотоколориметр или спектрофотометр; воронка с фильтровальной бумагой; микропипетка 0,2 мл; пипетки 1, 2, 5 мл; колбы по 25, 50, 100 мл, ножницы.

Реактивы: 1. Кровь (смесь цитрата или оксалата в крови). 2. 86%-ный этиловый спирт. 3. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. 4. Концентрированная серная кислота. 5. Пергидрол. 6. Стандартный раствор сульфата аммония: 0,2357 г соли растворяют в 1 л воды, в 1 мл такого раствора содержится 0,05 мг азота. 7. Реактив Несслера: в первый стакан добавляют 15 г йодной соли ртути, выливают во второй стакан, перемешивают стеклянной палочкой до растворения йодной соли ртути.

Ход работы: В пробирку добавить 1,8 мл дистиллированной воды и 0,2 мл крови, затем влить 2 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты, хорошо перемешать стеклянной палочкой и дать постоять 5 минут. Жидкость становится коричневой. Жидкость в растворах фильтруют фильтровальной бумагой. Взять 2 мл фильтрата (т.е. 0,1 мл крови) в колбу Кельдаля и нагреть до тех пор, пока не добавятся

2 капли концентрированной серной кислоты, чтобы образовался белый дым. Затем прекратить нагревание колбы, охладить и добавить 2 капли пергидроля и нагреть, пока жидкость в колбе не станет равной. Затем жидкость в колбе охлаждают и разбавляют, добавляя 2-3 мл воды, измеряя ее объем и заполняя колбу (стенки колбы также промываются определенным объемом воды). Воду добавляют к 2/3 объема колбы на 25 мл, добавляют 3 мл реактива Несслера, а затем добавляют воду до метки на колбе.

В другую колбу добавляют 1 мл стандартного раствора сульфата аммония и 1 каплю концентрированной серной кислоты и доливают до 2/3 объема колбы. Затем добавляют 3 мл реактива Несслера и доливают воду до метки в колбе. Когда жидкость в колбах встряхивается, она измеряется спектрофотометром и рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{0,05 \cdot h_1 \cdot 100}{h}$$

Где, X-азотный остаток, мг%; 0,05 - количество азота в стандартном растворе 1 мл сульфата аммония; h - экстинкция оптической плотности стандартной жидкости; h_1 -оптическая плотность экстинкции исследуемой жидкости; 100 - обычный множитель для расчета азота в мг%.

3.1.9. Определение азота, не входящего в состав белков тканей

После того, как кусочек печени или мышечной ткани раздавлен ножницами, его хорошо измельчают в ступке. Затем измеряют полученную массу 500 или 1000 мг и переносят в мерную колбу на 50 мл. Добавьте 20 мл разбавленной воды, перемешайте и оставьте на 26-30 минут.

Затем добавляют 5 мл 20%- раствора трихлоруксусной кислоты и оставляют на 5-10 минут, затем фильтруют. В следующем процессе берут 2 мл фильтрата и переливают в колбу Кельдаля, в которую добавляют 0,1 мл концентрированной серной кислоты и минерализуют на песчаной бане. Затем при образовании густого белого дыма снять колбу с огня и, немного остывнув, добавить 1-2 капли пергидроля. Колбу снова нагревают на песочной бане до образования бесцветной прозрачной жидкости. По окончании минерализации в колбу добавляют 2-3 мл воды,

промывают 25 мл, несколько раз промывают водой и помещают в колбу, т. е. прибавляют 2/3 от общего объема. Затем добавить 5 мл реактива Несслера и довести до отметки в колбе.

В тех же условиях контрольный образец минерализуется, т.е. в колбу добавляют 0,1 мл серной кислоты и 2 мл воды. После охлаждения добавляют 2 мл стандартного раствора сульфата аммония и 5 мл реактива Несслера и доводят объем водой до метки в колбе. Жидкости в обеих пробирках тщательно перемешивают и определяют их оптическую плотность на спектрофотометре, ФЭК.

Количество азота рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{0,10 \cdot h_1 \cdot 25 \cdot 100}{C \cdot h \cdot 2}$$

Где, X- количество азота, не входящего в состав белка мг%; 0,10-количество азота (мг) соответствует концентрации 2 мл стандартного раствора; h- погашение оптической плотности контрольного образца; h_2 -экстинкция оптической плотности тестируемой жидкости; 25-общее количество тканевого экстракта; для расчета 100 мг%; C-масса ткани, полученной для экстракции, мг; 2- количество фильтрата, полученного за минерализацию.

Зная количество общего азота и небелкового азота в ткани, определяется количество азота, содержащегося в белках.

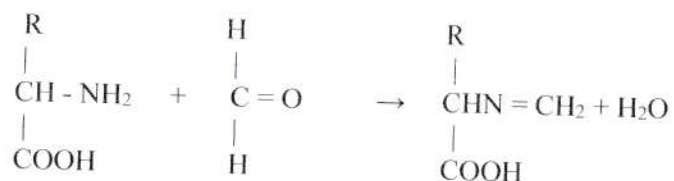
Общий азот - азот, который не входит в состав белков.

3.1.10. Определение азота в аминокетонах с титрованием формальдегидом

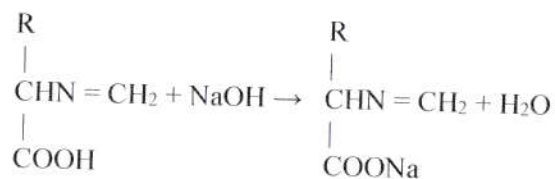
Азот свободных аминокетонных групп в полипептидах, белках и аминокислотах называется аминным азотом. При изучении структуры и состава белковых молекул, а также их продуктов, образующихся в результате гидролиза, большое значение имеет количество азота аминокетонных групп. В зависимости от количества аминного азота можно изучать активность протеолитических ферментов (катепсина) и скорость гидролиза белков. Определение аминокетонных групп в биологических материалах дает дополнительные характеристики аминокислотного и белкового обмена в организме.

Когда белки расщепляются ферментами или кислотами, образуются аминокислоты, которые свободно содержат аминокетонные и карбоксильные группы в аминокислотном составе.

Чтобы определить количество аминокрупп, свободные аминокруппы в аминокислотах объединяют с формальдегидом с образованием производного метилена, после чего карбоксильные группы титруют щелочным раствором:



Аминокислота Формальдегид Метилинаминовая кислота



В зависимости от количества карбоксильных групп, нейтрализованных щелочами, рассчитывается количество свободных аминокрупп в аминокислотах в растворе. Молекула большинства аминокислот сохраняет эквивалентное количество amino- и карбоксильных групп.

Необходимые инструменты: колбы 50 мл; пипетки 5, 10, 20 мл; бюретка 10 мл.

Реактивы: 1. 0,25%-ный раствор глицина. 2. 0,1%-ный раствор фенолфталеина. 3. 0,1 Н раствор гидроксида натрия. 4. Состав смеси готовится перед этим анализом реагентов, 1-2 капли фенолфталеина добавляют к 6 мл 20%-ного раствора формальдегида и добавляют по каплям через бюретку 0,1 Н раствор гидроксида натрия до тех пор, пока смесь не приобретет розовый цвет.

Ход работы: добавить в колбу 3 мл 25%-ного раствора глицина, добавить 1-2 капли фенолфталеина и титровать 0,1%-ном раствором гидроксида натрия через бюретку до образования розового цвета. Затем добавьте пипеткой 2 мл смеси рецептур к нейтрализованному раствору глицина (розовый цвет раствора исчезнет). Титруйте 0,1Н-ным раствором гидроксида натрия до

образования розового цвета. Определяется количество растворения 0,1 Н-ного натриевой щелочи, которое используется для титрования.

Вычисление. Например, 0,88 мл 0,1 н щелочного раствора использовали для титрования 3 мл 0,25% -ного нейтрализованного глицина, а на 1,4 мг азота соответствует 1 мл 0,1 Н щелочной раствор. Поэтому умножить количество 0,1Н щелочного раствора, используемого для титрования, на 1,4, чтобы найти количество аминного азота в 3 мл 0,25% раствора глицина.

$$0,88 \cdot 1,4 = 1,232 \text{ мг или } 0,001232 \text{ г.}$$

Это означает, что 3 мл 0,25% раствора глицина или 0,0075 г аминокислоты содержат такое же количество азота. Если 0,0075 г глицина содержит 0,001232 г, то в 100 г глицина содержится X г азота.

$$\text{Из этого } 0,0075 \text{ г} - 0,001232 \text{ г}$$

$$100 \text{ г} - X$$

$$X = \frac{100 \cdot 0,001232}{0,0075} = 16,4 \text{ г азот}$$

Это означает, что глицин содержит 16,4% аминного азота.

Подобные тесты можно проводить с гидролизрованными белками. Для этого в колбу добавить 3 мл 0,25% -ного гидролизата и работать в варианте, описанном выше для глицина.

3.1.11.Диализ белков

Диализом называют процесс разделения высокомолекулярных веществ (например, белков) и низкомолекулярных (например, солей) с помощью полупроницаемых мембран.

Полупроницаемыми называют мембраны, диаметр пор которых позволяет проходить только низкомолекулярным соединениям. Примером естественных полупроницаемых мембран могут быть капсулы Боумана—Шумлянского почек. Широко используют искусственные полупроницаемые мембраны: целлофан, коллодий, на основе которых созданы диализаторы, в том числе «искусственная почка».

Метод диализа используют в научных лабораториях, в промышленности, в клинической практике.

Метод основан на том, что низкомолекулярные вещества легко диффундируют через полупроницаемые мембраны в чистый

растворитель, образуя диализат. Диффузия будет продолжаться, пока не произойдет выравнивание концентраций диффундируемого вещества между диализируемым раствором и диализатом. Процесс возобновится, если диализат заменить чистым растворителем или, если эта смена будет происходить постоянно (проточный диализ).

Реактивы: 1. раствор яичного белка или соевой муки 2. насыщенный раствор соли (NaCl) 3. 1%-ный раствор нитрата серебра 4. 20%-ный раствор гидроксида натрия 5. 2%-ный раствор сульфата меди.

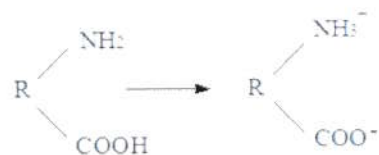
Ход работы: Одна сторона стеклянной трубки длиной 10-12 см и диаметром 0,7 см покрывают целлофаном. В стеклянную пробирку наливают 5-6 капель белкового раствора и 2-3 капли солевого раствора. Затем стеклянную трубку погружают в раствор, содержащий 2-3 мл воды. Через 10-15 минут стеклянную пробирку удаляют и дистиллированную воду проверяют на наличие хлоридов и белка.

Для определения хлоридов добавляют 0,5 мл раствора в дистиллированную воду и добавляют 0,2 мл 1%-ного раствора нитрата серебра. В этом случае хлорид серебра выпадает в осадок.

Биуретовую реакцию используют для определения белков. Для этого берут 0,5 мл дистиллированной воды, добавляют к ней 0,5 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия и 5-10 капель 2%-ного раствора сульфата меди. Отсутствие фиолетового цвета свидетельствует об отсутствии белка.

3.1.12. Определение изоэлектрической точки белка

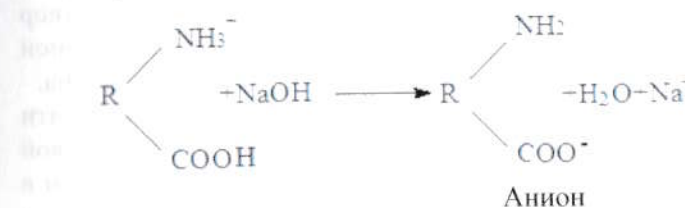
Белок как амфотерный полиэлектролит содержит положительные и отрицательные заряды, соотношение которых определяется количеством кислых и основных аминокислот в его макромолекуле.



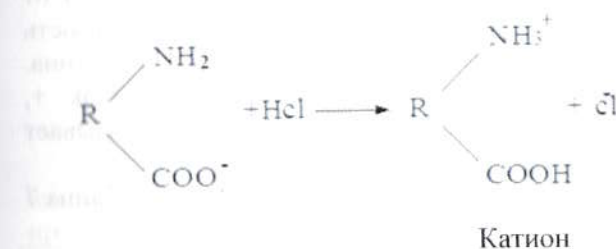
Заряженность молекулы белка является одним из факторов его устойчивости в растворах, так как мешает слипанию белковых

частиц и выпадению их в осадок. На общий заряд макромолекулы белка влияет pH среды. Для каждого белка существует значение pH, при котором сумма положительных и отрицательных зарядов его равна нулю. Это состояние белка называется изоэлектрическим, а соответствующее такому состоянию значение pH называется изоэлектрической точкой. В изоэлектрической точке растворы белков неустойчивы и белки легко выпадают в осадок, особенно в присутствии водоотнимающих веществ (этиловый спирт, ацетон и т.д.).

В щелочной среде белки имеют избыток COO⁻ групп и действуют как анионы. Например, натриевая щелочь образует натриевую соль белков:



Напротив, в кислой среде белок имеет группы аммония NH₃⁺ и действует по отношению к катоду как положительный ион:



В форме амфионов молекула белка теряет заряд, и такая коллоидная частица теряет устойчивость в растворе. Сумма положительных и отрицательных зарядов белков равна нулю, а pH раствора, который не перемещается к катоду или аноду в электрическом поле, называется изоэлектрической точкой белков. Изоэлектрическая точка разных белков соответствует разным величинам pH, поскольку количество групп с щелочным и кислотным характером в молекулах белков не равно, при разных значениях pH их скорость диссоциации одинакова, а молекула

обычно электро-нейтральна. Например, казеин имеет рН 4,2; белок яичного альбумина 4,8; желатиновый 4,9; зеин (кукурузный белок) равен 6,2. Изoeлектрическая точка протаминов и гистонов соответствует слабощелочной среде.

В изoeлектрической точке белков добавляются водопоглощающие вещества (спирт, ацетон, эфир) или танин для ускорения осаждения. Органические растворители разрушают водную оболочку макромолекулы белка, например, азотные гетероциклические группы с танином образуют нерастворимые в воде соединения.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки 2 и 10 мл.

Реактив: 1. 1%-ный раствор желатина. 2. 0,1 Н раствор уксусной кислоты. 3. 0,1Н - ный раствор натриевой соли уксусной кислоты. 4. 96%-ный этиловый спирт. 5. 0,1%-ный раствор танина.

Ход работы: Буферные растворы с разным рН готовятся в пяти пробирках: из раствора уксусной кислоты и раствора натриевой соли уксусной кислоты в количестве, указанном в таблице. Затем в каждый раствор добавляют по 1 мл раствора желатина и хорошо перемешивают. Затем к растворам добавляют по 4 мл спирта (или 1 мл раствора танина) и перемешивают. Через 15-20 минут в растворах образуется помутнение, степень помутнения зависит от буферной смеси в растворах. Известно, что максимальная мутность рН-смеси соответствует изoeлектрической точке желатина. Изoeлектрическая точка желатина составляет рН 4,7. Знак +, помещенный на осадкообразующие растворы в таблице, указывает на степень образования осадка.

Таблица 7

Определение изoeлектрической точки белков

Пробирки	Количество буферных смесей		рН смесей	1% раствор желатина, мл	Этиловый спирт, мл	Скорость осаждения (+)
	0,1Н CH_3COOH	0,1Н CH_3COONa				
1	1,8	0,2	3,8	1	4	
2	1,4	0,6	4,4	1	4	
3	1,0	1,0	4,7	1	4	
4	0,6	1,4	5,1	1	4	
5	ОД	1,8	5,7	1	4	

3.1.13.Разделение аминокислот с помощью бумажной хроматографии

Хроматография - впервые был изобретен русским ученым М.С.Цветом, который в 1906 году фракционировал окрашенные экстракты листьев растений на колонках с порошком мела.

В настоящее время существует большое количество вариантов хроматографии, в которых используются матриксы (носители) разных типов, позволяющие разделить белки по заряду (ионообменная хроматография), по размеру молекул (гель-хроматография) и способности специфически взаимодействовать с определенными химическими веществами, предварительно связанных а матриксом (аффинная хроматография) (рис. 16).



Рис. 16. Тонкослойная хроматография

Хроматография основана на разной скорости движения через адсорбент растворенных в специальном растворе веществ. При пропускании такого раствора через адсорбент каждое вещество из смеси передвигается на определенное расстояние в зависимости от своей молекулярной массы.

Адсорбентами могут быть волокна фильтровальной бумаги, порошок целлюлозы и другие пористые вещества.

Самый простой, легкий и точный метод разделения аминокислот - это бумажная хроматография. Для бумажной хроматографии можно использовать любую высококачественную фильтровальную бумагу.

Метод разделения и определения аминокислот заключается в том, чтобы нанести их смесь на фильтровальную бумагу и окунуть

один конец бумаги в соответствующий органический растворитель. Растворитель пропитывается фильтровальной бумагой и переносит (склеивает) аминокислоты. Скорость переноса аминокислот на бумагу зависит от их химической структуры, степени растворимости в растворителях. Некоторые аминокислоты имеют разную растворимость в разных растворах. Обычно одним из этих растворов является вода, а другим - органический растворитель, насыщенный водой (фенол, бутиловый спирт и т. Д.). Обычно используются органические растворители, смешанные с водой или частично смешанные.

Отношение расстояния, пройденного аминокислотой (а) к расстоянию, пройденному раствором (b), называется коэффициентом разделения аминокислот. Коэффициент разделения аминокислот (Rf) постоянен в данном растворе для каждой аминокислоты и определяется следующим образом.

$$Rf = \frac{a}{b}$$

В бумажной хроматографии аминокислоты разделяют двумя способами. Это метод хроматографии, который движется вверх и вниз.

Также существует метод односторонней и двусторонней хроматографии. В методе односторонней хроматографии разделение веществ происходит в одном направлении. В этом случае близкие к Rf аминокислоты, по 2-3 соединяются и разделяются. Для их разделения используется двусторонняя хроматография. Вовлечены два органических растворителя. Разделение осуществляется последовательно в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

Реактивы: водонасыщенный раствор фенола, 0,1%-ный раствор нингидрина, 0,1%-ный раствор смеси аминокислот (растворим в 80%-ном растворе этилового спирта).

Ход работы: Из фильтровальной бумаги готовят полоски длиной 12-14 см и шириной 1,5 см. Сверху этой ленты продеваем иглой нить 15-20 см. Нарисуйте прямую линию в 1 см от низа бумаги и круг диаметром 0,5 см в середине. В середину круга при помощи капилляра капните 2-3 капли аминокислотной смеси. Область капель высушите на воздухе. Постепенно налейте 2 мл водонасыщенного раствора фенола на дно пробирки длиной 18-20 см и диаметром 2 см, не касаясь стенок пробирки. Удерживая

подготовленную бумажную нить, опустите ее в раствор так, чтобы конец бумаги был на 2-3 мм погружен в растворитель и устойчиво стоял вертикально. Накройте пробирку пробкой и поместите в термостат при 40-50°C на 1,5-2 часа. Раствор в пробирке после подъема на 10-12 см по бумажной ленте снимают хроматограмму и сушат в течении 10-15 мин при 100°C. На хроматограмме образуются цветные пятна. Чтобы разделение аминокислот было четким, должна быть получена смесь аминокислот, которые обычно больше отличаются друг от друга по Rf.

Таблица 8

R_f простейших аминокислот при хроматографировании на бумаге типа «быстрая» в различных растворителях

Аминокислота	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Глицин	0,45	0,07	0,02	0,03	0,36	0,44	0,28	0,41	0,15
Аланин	0,55	0,10	0,03	0,05	0,44	0,67	0,43	0,54	0,24
Норвалин	—	0,22	0,12	0,19	0,71	—	—	—	—
Валин	0,62	0,18	0,11	0,15	0,65	0,73	0,64	0,65	0,43
Изолейцин	0,67	0,31	0,18	0,27	0,76	0,78	0,71	0,66	0,43
Лейцин	0,69	0,36	0,21	0,31	0,78	0,78	0,72	0,68	0,43
Фенилаланин	0,64	0,36	0,36	0,33	0,79	0,73	0,66	0,66	0,52
Серин	0,47	0,08	0,01	0,02	0,34	0,48	0,34	0,51	0,14
Пролин	0,58	0,11	0,12	0,12	0,57	0,73	0,49	0,56	0,42
Триптофан	0,58	—	—	0,30	—	0,78	0,70	0,63	0,43
Орнитин	0,16	0,02	0,00	0,00	0,24	0,30	0,31	0,29	0,10
Лизин	—	0,02	0,00	0,01	—	—	—	—	—
Аспарагиновая кислота	0,45	0,02	0,00	0,00	0,31	0,38	0,15	0,48	0,07

Глутаминовая кислота	0,51	0,02	0,00	0,01	0,38	0,45	0,19	0,48	0,09
Цистин	—	0,02	0,00	0,00	0,25	—	0,20	—	0,06

Системы растворителей: I - *n*-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:5); II - изомасляная кислота; III - лутидин - третиамилловый спирт - вода (7:7:6); IV - пиридин - изоамиловый спирт - вода (7:7:6).

3.1.14. Гидролиз белков и определение их аминокислотного состава

Чтобы определить аминокислотный состав белков, их необходимо предварительно гидролизовать. Затем методом хроматографии определяется их аминокислотный состав.

Реактивы: образец чистого белка. 6 Н раствор соляной кислоты.

Ход работы: Сначала гидролизуются белки. Для этого экстрагируют 50-100 мг чистого белка и помещают в стеклянную ампулу, в которую добавляют 10 мл 6 Н соляной кислоты. Затем ампула заполняется азотом, а ее открытая сторона закрывается нулевым слоем плавления. Гидролиз в кипящей воде длится 24 часа. По окончании гидролиза ампулу охлаждают, и раствор переливают в фарфоровую чашку. Раствор в фарфоровой посуде упаривают на водяной бане. Добавить в сухую миску 3-4 капли дистиллированной воды и снова упаривать до полного высыхания. Этот процесс повторяется 3-4 раза, пока не исчезнут кислотные свойства чашки. Ампулу также можно хранить в морозильной камере. При кислотном гидролизе аминокислота триптофан расщепляется.

Количество гидролизованного белка на хроматограмме зависит от количества аминокислот в белке. При высоком содержании белка в аминокислотах получается небольшое количество гидролизата, и наоборот, если количество аминокислот низкое, получается большое количество гидролизата. Обычно содержание белка в взятой пробе составляет от 0,6 до 2 мг. Нанесение гидролизата на хроматограмму и разделение аминокислот проводят по описанной выше методике.

3.2. Определение аминокислот методом тонкослойной хроматографии

В методе тонкослойной хроматографии все аминокислоты могут быть отделены от смеси гидролизатов белка или аминокислот. В качестве тонкого слоя часто используют силикагель, производные целлюлозы и другие вещества, готовые специальные пластинки (силуфол).

Этот метод основан на различных уровнях разделения аминокислот в двух несмешивающихся жидких фазах (неподвижная водная фаза и фаза движущегося органического растворителя). Когда аминокислоты хорошо растворимы в водной фазе, они медленно перемещаются впереди органических растворителей. Скорость вытеснения всех аминокислот различна. Коэффициент скорости сдвига рассчитывается следующим образом.

$$R_f = \frac{a}{b}$$

Здесь: *a* - расстояние от места падения аминокислоты до центра места образования этой аминокислоты, см; *b* - фронт раствора, см.

После разложения аминокислот пластину сушат и опрыскивают раствором нингидрина. Когда α -аминокислоты окисляются при взаимодействии с нингидрином, они распадаются на аммиак, альдегид и угольную кислоту, и нингидрин возвращается. Возвращенный нингидрин и другая молекула нингидрина реагируют с аммиаком с образованием сложного мурексида, которое придает ему сине-фиолетовый цвет.

Необходимые инструменты: хроматографическая камера; термостат; 0,1 мл пипетки.

Реактивы: 1. 0,1 М цитратный буфер, pH-5,3. 2. 0,1%-ный раствор нингидрина в ацетоне. Кадмий добавляют к реагенту нингидрина для стабилизации цвета хроматографических пластин. Этот раствор готовится в соотношении 5: 1.

1. 5 частей раствора 1% - ного нингидрина в ацетоне. 2. Смесь ацетата кадмия; Для приготовления этой смеси смешивают 50 мл уксусной кислоты и 100 мл воды и растворяют в этой смеси 1 г ацетата кадмия. 3. Гидролиз белков. 4. Пластина «Силуфоль УВ-254».

Ход работы: Отмерить 2–2,5 см от нижней части пластины УВ-254 и простым карандашом нарисовать слой. Гидролизаты тестируемого белка закапывают на расстоянии 1,5–2 см друг от друга. Затем по каплям берут 10–20 мл этого протеинового гидролизата и пятно сушат горячим воздухом – переливают вертикально в камеру хроматографии. Хроматографию проводят в специальных камерах с использованием 0,1 М цитратного буфера pH-5,3 в качестве растворителя. Растворитель заливается в камеру на толщину 1–1,5 см.

Когда уровень растворителя поднимается до 4/5 высоты пластины, пластину вынимают из камеры и сушат горячим воздухом. Затем пластину осторожно опрыскивают раствором 1% нингидрина в ацетоне. Нагреть пластину при 105 °С в термостате в течение 10 минут. В результате аминокислоты появляются в виде сине-фиолетовых пятен. Затем рассчитывается коэффициент скорости сдвига (R_f) каждой аминокислоты по приведенной выше формуле.

Контрольные (стандартные) растворы хроматографируют вместе с гидролизатом тестируемого белка. Это позволяет быстро идентифицировать аминокислоты в тестируемом образце. Следует отметить, что в методе тонкослойной хроматографии аминокислоты оцениваются качественно и определить их количество не представляется возможным.

3.3. Определение белковых фракций электрофорезом в полиакриламидном геле

Электрофорез – этот метод основан на способности белков, обладающих определенными суммарными положительными и отрицательными зарядами, перемещаться в электрическом поле в соответствии с величиной заряда, размером и формой молекулы. Электрофорез можно проводить в буферном растворе или в пористых носителях: агарозном, крахмальном и полиакриламидном геле, на целлюлозных и нитроцеллюлозных пластинах.

Простейший метод электрофореза на пластинах целлюлозы был использован В.Ингрэном в 1956 году при фракционировании фрагментов протеолитического расщепления гемоглобина человека. С помощью этого метода были получены пептидные карты – «финггерпринты» – отпечатки пальцев.

Часто используемый метод электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) был разработан в 1959 году С.Рэймондом и затем усовершенствован Б.Дэвисом и Л.Орнштейном. В 1966 году Дж.Майзелем было предложено модификация данного метода электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия (рис.17).

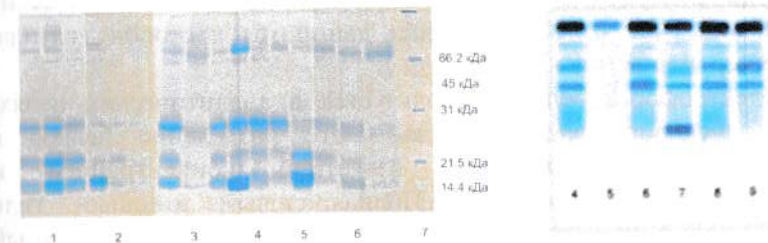


Рис.17. Электрофорез

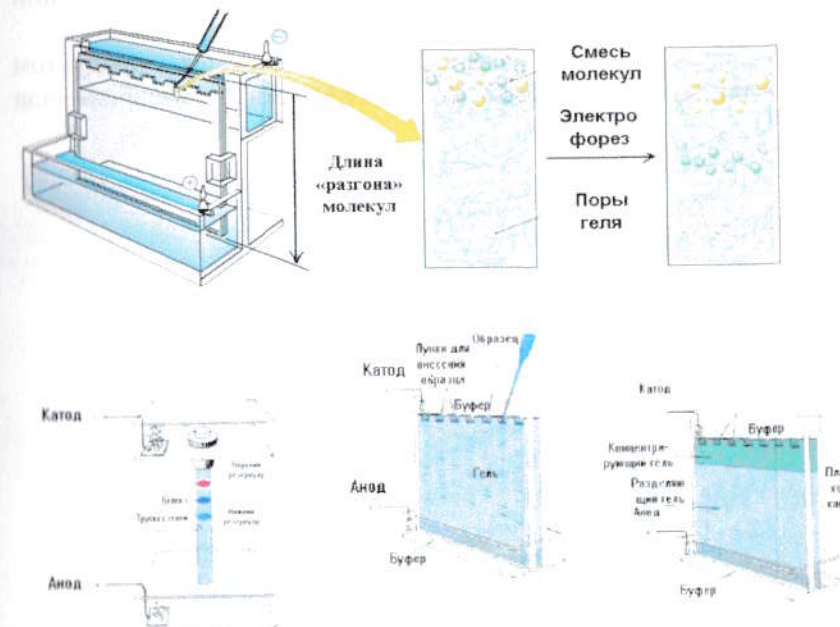


Рис.18. Строение прибора для гель-электрофореза

Близким к хроматографии является метод электрофореза в геле, где разделению смеси веществ в растворе способствует электрический ток.

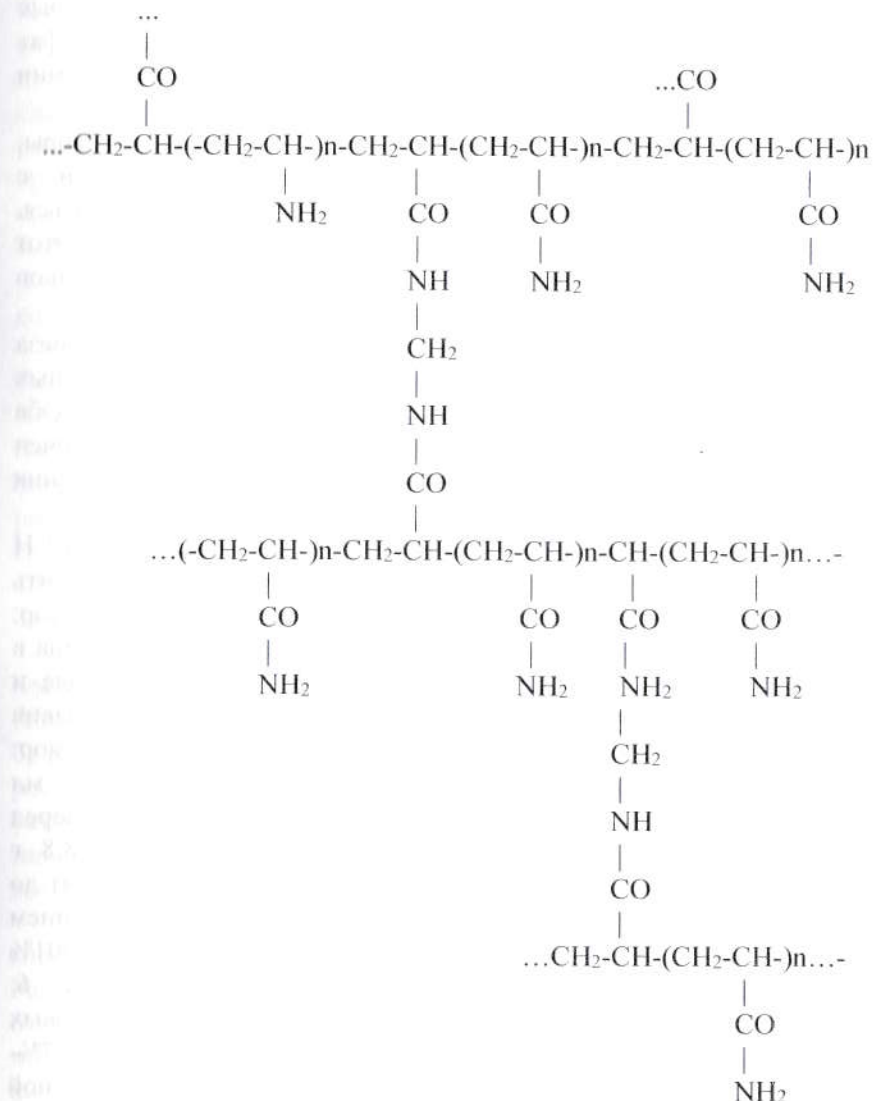
Методы хроматографии и электрофореза позволяют разделить смеси веществ, выделенные из клетки, определить их качественный и количественный состав.

Для разделения смеси белков на компоненты используется метод электрофореза: в электрическом поле отдельные белковые молекулы с определенной скоростью перемещаются к одному из электродов. При этом одни белки двигаются в сторону катода, другие перемещаются к аноду.

Электрофорез белков используется в аналитических целях. Метод дискового электрофореза - это разделение белков в концентрированном геле с известной концентрацией и определенными молекулами. Полиакриловый амидный гель используется в дисковом электрофорезе. Полиакриловый амидный гель состоит из трех разных частей:

1) стартовая часть геля большого сита; 2) концентрирующий гель с большим ситом; 3) мелкое сито для разделения геля.

Полиакриламидный гель-акриламид является продуктом сополимеризации $\text{CH}_2 = \text{CH-CO-NH}_2$ и N_1N метиленбисакриламида



Вязкость, прочность и эластичность геля зависят от степени полимеризации и сшивания полиакриламида, а также от количества N , N_1 -метиленбисакриламида, участвующего в сшивании. Гель полимеризуется в стеклянных пробирках, закрепленных в виде

колонки. Системы окисления-восстановления используются в качестве катализаторов реакций сополимеризации, которые являются источником свободных радикалов, например: персульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ и N, N, N, N₁-тетраметилэтилендиамин (TEMED): $(\text{CH}_3)_2 = \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} = (\text{CH}_3)_2$.

Электродные растворы, то есть буферные растворы, действуют как проводники в скользящих частях гелей с электродом, и в этом случае pH и состав буферов будут изменяться. Метод электрофореза имеет очень высокую чувствительность. Этот метод позволяет обнаруживать более 30 фракций белков сыворотки.

Необходимые инструменты: Аппарат для электрофореза изготовлен из оргстекла и состоит из двух электродных резервуаров, верхнего и нижнего, емкостью 1,5 л каждый. Оба резервуара имеют угольные электроды, к которым подключен постоянный ток. Устройство УИП-1 используется как источник питания переменного тока.

Реактивы. 1. Раствор А: в колбу на 100 мл добавить 48 мл 1 N HCl, 36,3 г триса и 0,46 мл TEMED, и после растворения добавить воду до метки на колбе. Раствор должен иметь pH 8,9. 2. В-раствор: добавить 30,0 г акрилового амида и 0,8 г метиленабисакриламида в 100 мл колбу, растворить в 70-80 мл дистиллированной воде и профильтровать, затем довести объем раствора до 100 мл, добавив дистиллированную воду, затем хорошо перемешать. 3. С-раствор: 0,14 г персульфата аммония растворяют в 100 мл дистиллированной воды, этот раствор готовят перед использованием. 4. Электродный буфер: 6,0 г триса и 28,8 г глицина растворяют в дистиллированной воде, и объем доводят до 100 мл путем добавления воды, pH 8,3. Перед применением развести в 10 раз. 5. Раствор красителя-индикатора: 0,001% раствор бромфенолового синего в дистиллированной воде. 6. Реагент Амидо-Шварца используется для окрашивания белковых фракций. 1%-ный раствор 10 мл В Амидо-Шварца готовится 7%-ном растворе уксусной кислоты. 7. 7%-ный раствор уксусной кислоты. 8. Сыворотка крови.

Ход работы: Приготовление геля. Один конец чистой и сухой трубки заклеивают липкой лентой, надевают резиновые кольца и устанавливают на штатив.

В отдельной колбе или стакане смешать 1 часть раствора А, 2 части раствора В, 4 части раствора С и 1 часть дистиллированной воды. Пипеткой внести по 2,5 мл приготовленной смеси в каждую пробирку. 0,2-0,3 мл дистиллированной воды налить в смесь слоями с помощью капилляра, чтобы поверхность геля была равномерно ровной и препятствовала прохождению кислорода. Для полимеризации гели в пробирках хранить 30 минут при комнатной температуре или в термостате при 30°C в течение 15-20 минут. По окончании полимеризации слой воды с гелем удаляется полосками, приготовленными из фильтровальной бумаги, и верхнюю часть геля промыть электродным буфером.

Белковый раствор, используемый для анализа, готовится из буферного раствора, используемого для приготовления геля. Концентрация белкового раствора должна составлять 1-5 мкг / мл. Например, для проверки сыворотки крови 3 мкл сыворотки крови (приблизительно 200 мкг белка) смешивают с 0,15 мл буферного раствора, используемого для приготовления геля, и добавляют сахарозу или глицерин для увеличения концентрации до 20-25%, по 10 на пробирку. 100 мкл приготовленного белкового раствора. Затем трубки до конца заполняются электродным буфером.

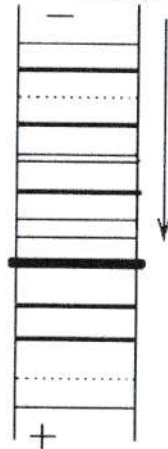
Электрофорез проводится в холодильнике. Температура электродных буферов перед использованием доводится до + 4° С. Аппарат для электрофореза также охлаждается. К 500 мл буферного раствора добавляют 1 мл красителя-индикатора 0,001% раствора бром фенолового синего. При закрытии крышки устройства электрод подключается к источнику переменного тока, нижний электрод служит анодом (+), а верхний электрод служит катодом (-).

К каждой пробирке прикладывают ток 0,5-1,0 мА (20-30 минут), а затем увеличивают до 2-5 мА для каждой пробирки. Разделение оксидных фракций занимает 2-3 часа, т.е. источник тока отключается, когда краситель остается на расстоянии 3 мм от нижнего конца трубки. Электродные буферы переливают из контейнеров с инструментами в другие контейнеры, а трубки откручивают. Чтобы удалить гель из пробирок, в шприц набирают дистиллированную воду и направляют иглой между стенками пробирки и гелем, после чего гель медленно удаляется. Для окрашивания белковых зон в гелях в пробирки добавляют 10 В

раствор амидо-Шварца и оставляют на 10-15 минут. Затем его переливают в другую емкость.

Гели промывают 7%-ным раствором уксусной кислоты. Чтобы обесцветить части геля, не содержащие белков, его следует несколько раз промыть этим раствором. Процесс отбеливания занимает 10-12 часов. Затем проводится электрофорез в зависимости от интенсивности окраски зон с белковыми фракциями и их расположения.

Внешний вид белкового электрофореграммы.



3.3.1. Изоэлектрофокусирование

Изоэлектрофокусирование - 70-х годов XX века в Швеции был разработан метод разделения белков в электрическом поле. Метод основан на фракционировании белков в определенном значении pH, задаваемом электрофоретическим буферным раствором. При изоэлектрофокусировании белки разделяют в градиенте pH, создаваемом с помощью специальных реагентов (амфолинов). В процессе изоэлектрофокусирования белки передвигаются, а электрическом поле в строгом соответствии только зарядом молекул и останавливаются (фокусируются) в тех точках градиента pH, которые соответствуют их изоэлектрическим точкам, то есть, где молекулы становятся электро-нейтральными. Метод позволяет не только тонко разделить белки по заряду, но и быстро и точно определить их изоэлектрические точки (рис.19).

Разработанное в 1975 году П.Офареллом сочетание методов изоэлектрофокусирования и электрофореза ПААГ с СДС получило название *двумерного электрофореза* [25].

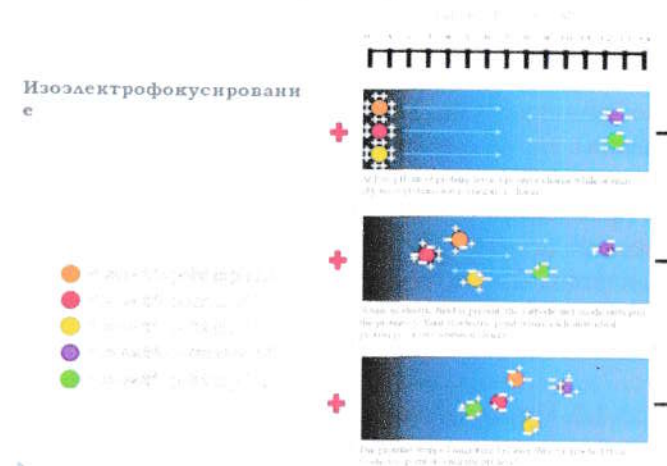


Рис. 19. Изоэлектрофокусирование.

3.4.Выделение клеточных структур из биологического материала

3.4.1.Гомогенизирование

Гомогенизация тканей - это процесс, используемый для подготовки образцов тканей для определенных типов исследований. Это включает в себя побуждение клеток к лизированию или распаду на части, чтобы высвободить их содержимое. Устройства, предназначенные для гомогенизации тканей, используются во многих лабораториях, и для определенных типов клеток могут использоваться специальные методы, например, когда клетки трудно разрушить из-за их структуры.

Разработан ряд методик для исследования изолированных отделов клетки. Для того чтобы выделить клеточные органеллы, исследуемый образец измельчают и затем гомогенизируют за буферной среде с использованием гомогенизатора Поттера-Элведжема (тефлоновый пестик, вращающийся в стеклянном

цилиндре). Это сравнительно мягкий метод, который особенно предпочтителен для выделения лабильных молекул и ультраструктур. Другие методики разрушения клеток включают ферментативный лизис, разрушающий клеточные стенки, или механическое разрушение замороженных тканей (размолот или с помощью вращающихся ножей; под большим давлением; осмотическим шоком; многократным чередованием замораживания и оттаивания).

Для выделения интактных органелл важно, чтобы среда, в которой проводится гомогенизация, была изотонической, то есть осмотическое давление буфера должно соответствовать давлению внутри клетки. Если раствор гипотоничен, органеллы будут «впитывать» дополнительную воду и лопнут, а в гипертонических растворах они, напротив, сморщиваются [8].

3.4.2. Приготовление гомогената из растительных и животных тканей

3.4.2.1. Приготовление гомогената из растительных тканей

В физиолого-биохимических исследованиях используются семена, корни, корневища, корнеплоды, стебли, листья, цветки растений. Перед началом анализа исследуемый образец взвешивают на аналитических весах, а затем ткань измельчают. Все операции производят при низкой температуре, с охлаждением инструментов, используемых во время опытов, а реактивы должны быть помещены в ледяную баню. Если разрушение растительных тканей проводили на механической мельнице, то перед экстракцией помол необходимо взвесить, так как часть образца ткани во время измельчения может быть потеряна. Для измельчения растительных тканей с низкой влажностью (5-15%) используют механические мельницы. Разрушение тканей с высокой влажностью (65-90%) проводят на гомогенизаторах. Ткани со средней влажностью (15-65%) обычно предварительно высушивают в сушильных шкафах с вакуумом при низкой температуре (60-70°C), что обеспечит максимальную сохранность в них функционально активных веществ. Перед началом экстракции биогенных соединений из разрушенных тканей растений необходимо правильно подобрать растворитель. Экстракцию полярных, заряженных соединений проводят, используя полярные растворители (вода, 50%-ный

раствор этанола, ацетон). Экстракцию гидрофобных компонентов гомогената тканей проводят, используя неполярные растворители (гексан, хлороформ, диэтиловый эфир и др.) или водные растворы с детергентами (тритоны: X-45, X-100, X-114, X-102, X-165, X-305; бридж: 35, 56, 58; луброл PX и WX; твин: 20, 40, 60, 80 и др.). Для полного разрушения растительных и животных тканей используют ультразвук. Отделение неразрушенных клеток и ядер проводят центрифугированием. Режим центрифугирования подбирается индивидуально. Так, гомогенат ткани для энзимологических исследований центрифугируют со скоростью (7000 - 12000)-g в рефрижераторных центрифугах при 0°C. Полученный после центрифугирования супернатант хранят в холодильнике при +4°C. Расчет объема супернатанта производят путем сложения величин объемов предварительно определенной в исследуемой растительной ткани гидровлаги и раствора, взятого для экстракции биогенных соединений. Качественный и количественный состав веществ, содержащихся в супернатанте, определяют, используя стандартные методики. Следует придерживаться следующего правила при выборе методики. Используемый метод должен быть специфичным, т.е. исключать возможность побочных реакций, затрудняющих интерпретацию полученных результатов, и легко воспроизводимым.

Целое растение или его часть после взвешивания подвергают гомогенизированию путем механического растирания в ступке при постоянном охлаждении. Полученную однородную массу центрифугируют. Над осадочную жидкость подвергают исследованию.

Зерновки с влажностью 8-10% и другие сухие части растений измельчают на мельнице 2 г зерновок измельчают в течение 1 мин. Полученный сухой порошок взвешивают и растворяют в бидистиллированной воде или другой среде выделения, охлажденной до 0°C, в соотношении 1:3 (на 1 г зерновок добавляют 3 мл охлажденной среды выделения). После перемешивания исследуемый образец центрифугируют при 7000g.

Над осадочную жидкость (супернатант) используют для биохимических исследований.

1.4.2.2. Приготовление гомогената из животной ткани

Хотя исследование гомогенатов тканей практически не применяется в клинко-диагностических лабораториях, оно широко используется для научных целей в экспериментальных работах, также может проводиться исследование биопсийного материала и кусочков ткани, взятой во время операции.

Целью гомогенизации является разрушение тканевой структуры клеточных стенок и или мембран. Гомогенат ткани может быть использован как материал для исследования активности ферментов, содержания различных метаболитов, а также для дальнейшего фракционирования клеточных компонентов.

Выбор метода разрушения клеточной структуры и среды суспендирования зависит от ткани, а также от целей исследования.

Навеску ткани, отмытую от крови, быстро измельчают ножницами или пропускают через металлический пресс, иногда растирают в ступке с кварцевым песком (мышечная и соединительная ткань). Все процедуры выполняются максимально быстро и на холоде.

Для приготовления гомогенатов тканей из таких органов, как печень, селезенка, тимус с целью максимального сохранения клеточных структур чаще всего используют стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком типа Поттера и Даунса — соответственно с ручным или механическим приводом.

Эффективность гомогенизации зависит от скорости вращения пестика (800-1000-2000 об/мин), зазора между пестиком и стаканом (обычно 0,14-0,16 мм), количества движений пестика вверх-вниз (8-10 движений) и времени гомогенизации (0,5-1,5 мин). Стакан гомогенизатора обязательно помещается в ледяную баню, полученный гомогенат фильтруют через один слой капрона или 3-4 слоя марли, чтобы отделить неразрушенные кусочки ткани [19].

Результат гомогенизации можно контролировать морфологически с использованием так называемых "витальных" красителей типа акридинового оранжевого, определяя процент неразрушенных клеток, или биохимически, определяя активность ферментов цитозоля и субклеточных частиц.

К другим методам разрушения тканевой и клеточной структуры относятся: действие осмотического шока, многократное замораживание-оттаивание, обработка ферментами (трипсин,

лизосим, β -гиалуронидаза, липаза), обработка органическими растворителями (толуол, этилацетат), ультразвуком, высоким давлением.

Гомогенизация

Среда суспендирования для гомогенизации тканей обычно имеет нейтральное значение pH и необходимое осмотическое давление, предохраняющее частицы от набухания и разрыва. Готовится она чаще всего на основе буферного раствора (обычно трис-HCl, pH=7,4) с добавлением 0,25 М сахарозы или 0,2 М KCl. Иногда добавляют вещества, препятствующие инактивации ферментов (например, этилендиаминтетраацетат — ЭДТА, связывающий двухвалентные ионы металлов или глутатион, препятствующий переокислению липидных компонентов).

Соотношение ткань/среда (вес/объем) может быть различным. Обычно готовят исходный 10% гомогенат (1 г ткани на 9 мл среды).

Необходимые инструменты: - 2 мл, 5 мл, 10 мл, центрифуга; центрифужные растворы; пробирки; очки; воронка; бинт; ножницы; пинцет; скальпель; гомогенизатор; стеклянные стержни; пипетки; фильтровальная бумага; Буфер ТКМ из 0,25 М сахарозы - pH- 7,2; 0,001 М-трис, 0,0025 М калий, 0,0025 М магний; печень крысы.

Ход работы. Все процессы проходят в холодном помещении (0-4°C). Крысу забивают и отделяют печень. Ткань сначала промывают холодным буфером, а затем тщательно размельчают ножницами. Полученную массу помещают в гомогенизатор (специальную стеклянную емкость) и натирают тефлоновым стержнем, соединенным с электродвигателем.

Этот процесс называется гомогенизацией. Одну часть измельченной ткани и 10 частей измельченного буфера получают для гомогенизации, и этот процесс продолжают до тех пор, пока не образуется такой же массовый гомогенат [20].

Гомогенат добавляют в пробирки и центрифугируют. Гомогенат разделяют на отдельные фракции методом дифференциального центрифугирования. Поскольку компоненты ячейки имеют разную плотность и размер, они вращаются и осаждаются с разной скоростью, схема фракционирования которой показана выше [25].

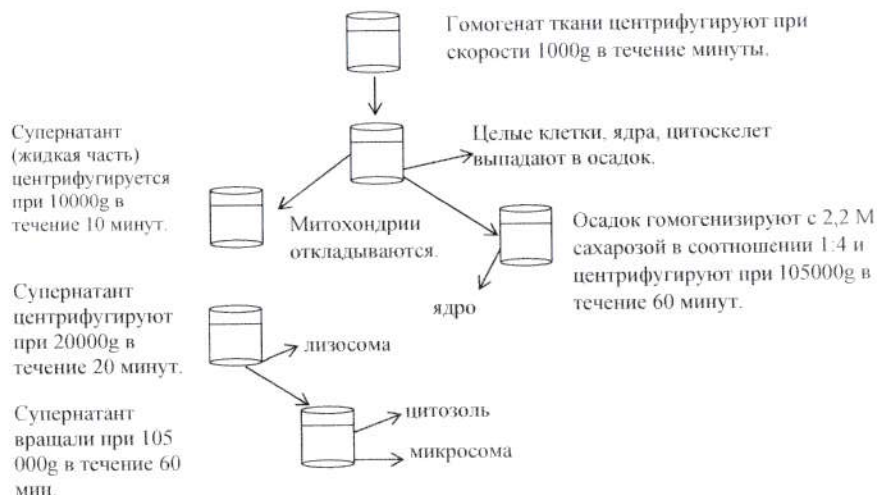


Рис.20. Схема выделения клеточных компонентов из ткани печени методом ультрацентрифугирования.

3.4.2.3. Выделение клеточных органелл растительной ткани

Для того чтобы изучить состав и функции клеток и субклеточных органелл, применяют метод дифференциального центрифугирования. Дифференциальное центрифугирование субклеточных органелл основано на различии в их размерах и плотности. Дифференциальное центрифугирование используется для разделения компонентов гомогената на ряд фракций (обычно пять): ядра, хлоропласты, митохондрии, рибосомы и над осадочная фракция (смесь растворимой фазы цитоплазмы с растворимым содержимым вакуоли и любых других разрушившихся органелл). Каждая из фракций осаждается при определенной скорости центрифугирования и времени. При высокоскоростном центрифугировании крупные компоненты клетки (например, ядра) быстро оседают (седиментируют) при относительно низких скоростях и образуют осадок на дне центрифужной пробирки. При более высоких скоростях в осадок выпадают более мелкие компоненты, такие как хлоропласты и митохондрии. Разрушение клеток проводят в изотонической среде в гомогенизаторах.

Полученную однородную массу (гомогенат) затем разделяют на фракции методом центрифугирования, теория которого излагается по Л. А. Остерману [25, 27].

3.4.2.4. Выделение клеточных ядер из растительной ткани

В клетках эукариот, имеющих ядра значительной величины, отделение их от других органелл достигается дифференциальным центрифугированием. При выделении ядер из растительного материала возникают значительные трудности, связанные с особенностями клеток растений. Введение в среду выделения гексиленгликоля (2-Methyl-2,4-pentanediol) и соли защищает ядра от разрушения, добавление не ионного детергента (Triton X-100) облегчает высвобождение ядер из клеток и предотвращает агрегацию ядер.

Методика выделения интерфазных клеточных ядер основана на выделении субклеточных структур растительных клеток с использованием разделения их на составные части центрифугированием. При центрифугировании крупные ядра оседают (седиментируют) при относительно низких скоростях и образуют осадок на дне центрифужной пробирки [1,12,27,38].

Материалы и оборудование: 1) семена злаковых растений (*Secale cereale* L.) 2) гексиленгликоль (2-Methyl-2,4-pentanediol), 3) PIPES-KOH, 4) магний хлористый ($MgCl_2$), 5) Triton X-100, 6) меркаптоэтанол (2-mercaptoethanol), 7) ингибитор протеаз (PMSF), 8) фарфоровая ступка с пестиком, 9) miracloth (марля), 10) электронные весы, 11) pH-метр, 12) магнитная мешалка с якорем, 13) автоматические вариопипетки, 14) пробирки центрифужные (2 шт.), 15) центрифуга с охлаждением, 16) воронка, 17) колотый лед (хладоэлемент), 18) глицерол, 19) детергент (мыльный раствор), 20) фильтровальная бумага, 21) поддон, 22) термостат, 23) перчатки, 24) шпатель, 25) ножницы.

Ход работы:

1. Подготовка растительного материала

Посадка семян: Семена злаковых обработайте детергентом (промойте мыльным раствором) и поместите на поддон, покрытый увлажненной водопроводной водой фильтровальной бумагой. Поддоны поместите в термостат при температуре 22°C и проращивайте в темноте в течение 2 суток.

Срезка проростков: Проростки срежьте и измельчите ножницами. Взвесьте 10 г растительного материала.

2. Приготовление буферов для выделения интерфазных клеточных ядер Приготовление буфера для гомогенизации растительного материала: Состав буфера для растирания (РБ):

1M 2-Methyl-2,4-pentanediol (гексиленгликоль);

10 mM PIPES-KOH (pH 7,0);

10 mM $MgCl_2$;

0,2% Triton X-100;

5 mM 2-mercaptoethanol;

0,8 mM PMSF

Приготовление буфера для отмывки клеточных ядер.

Состав буфера для отмывки (ОБ):

0,5M 2-Methyl-2,4-pentanediol (гексиленгликоль);

10 mM PIPES-KOH (pH 7,0);

10 mM $MgCl_2$;

0,2% Triton X-100;

5 mM 2-mercaptoethanol;

0,8 mM PMSF

3.4.2.5.Выделение интерфазных клеточных ядер

1. Измельчение растительного материала: Навеску растительной ткани (10 г), измельченную ножницами на кусочки длиной 1-2 см в предварительно охлажденных ступках на холоде, разотрите пестиком с добавлением 40 мл РБ буфера до однородной массы. Консистенцию гомогената контролируйте визуально.

2. Фильтрация: Перенесите гомогенат из ступки с помощью шпателя в воронку с 4 слоями или 6 слоями марли и профильтруйте в центрифужную пробирку. Полученный фильтрат - это клеточный сок, содержащий органеллы и загрязненный обрывками клеток и крахмала.

3. Осаждение ядер: Экстракт отделите от осадка центрифугированием в бакет-роторе в течение 20 мин при 25g и температуре 4°C. При центрифугировании осаждаются 9 обрывки клеток и крахмал. Осторожно (т.к. осадок рыхлый) отделите супернатант от осадка. Далее супернатант, содержащий ядра и другие органеллы, центрифугируйте при 350g при температуре 4°C в течение 20 мин. При этом ядра осаждаются. Осторожно слейте супернатант. В дальнейшей работе используйте осадок.

4. Отмывка ядер: Осадок осторожно ресуспендируйте с 8 мл ОБ буфера на льду, и центрифугируйте при 800g и температуре 4°C в течение 10 мин. Повторите отмывку еще 2 раза.

5. Получение препарата клеточных ядер: К осадку добавьте 2 объема буфера для отмывки ядер (ОБ) (соотносительно с объемом осадка) и осторожно ресуспендируйте ядра.

Хранение препарата: К полученному осадку с ОБ добавьте равный объем стерильного глицерола, разделите, (36) стеклянный стакан (50, 100, 200 мл) и воронка.

Ход работы:

1. **Получение растительного материала:** Семена злаков (озимой пшеницы) промойте детергентом, слабым раствором $KMnO_4$, затем водой. Выращивайте в кювете на влажной фильтровальной бумаге в термостате (в темноте) при 24-26°C. По истечении 3-х суток срежьте побеги. Нарезанные побеги длиной 2-3 см промойте дистиллированной водой, обсушите и поместите на несколько минут в холодильник. Взвесьте 30 г растительного материала.

2. **Приготовление сред для получения препарата митохондрий:** Все растворы для выделения митохондрий готовятся на бидистиллированной воде. Во время всей процедуры выделения растворы и посуда должны быть хорошо охлажденными (находиться в воде со льдом, холодильнике или на хладоэлементе). Все среды готовят накануне выделения митохондрий и на ночь оставляют в холодильнике. В начале рассчитайте необходимый объем всех сред. Среда выделения готовится в соотношении 1:4 (на 30 г растительного материала требуется 120 мл среды). Перед процедурой выделения митохондрий в среду выделения добавляют цистеин (50 мг/100 мл). Среда промывания - готовится 20 мл среды (10-12 мл используется). Среда ресуспендирования - готовится 10 мл среды (к митохондриям добавляется 0,6 мл). pH всех сред доводят до 7,4. Раствор 20% БСА готовится на среде промывания и хранится в морозильной камере. БСА связывает жирные кислоты и фенольные вещества, которые интерферируют с митохондриальной фракцией, а также работает как субстрат для протеаз для защиты митохондриальных белков от повреждений. В стеклянном стакане растворите указанные компоненты, за исключением цистеина, доведите pH (при постоянном перемешивании) до значения 7,4 и бидистиллированной водой доведите до нужного объема. Затем

раствор профильтруйте, отлейте объем, необходимый для среды промывания и для среды ресуспендирования. В среду ресуспендирования добавьте необходимые компоненты, доведите pH до значения 7,4. В оставшуюся после фильтрации среду (объем среды выделения) добавьте цистеин, перемешайте, доведите pH до значения 7,4 и профильтруйте. Растворы поместите в холодильник.

2.1 Приготовление среды для выделения митохондрий:

Состав среды выделения (pH 7,4, г/100 мл)

Концентрация вещества	Количество в г/100 мл среды
300 мМ сахара	10,260
40 мМ MOPS	0,837
5 мМ ЭДТА	0,186
10 мМ KCl	0,075
1 мМ MgCl ₂	0,009
0,1% БСА	0,100
0,05% цистеин	0,050

2.2 Приготовление среды для промывания митохондрий:

Состав среды для промывания, pH 7,4. Среда для промывания состоит из тех же компонентов, что и среда выделения, за исключением цистеина.

Концентрация БСА - 0,4%.

300 мМ сахара
40 мМ MOPS
5 мМ ЭДТА
10 мМ KCl
1 мМ MgCl ₂
0,4% БСА

2.3 Приготовление среды для ресуспендирования митохондрий:

Состав среды ресуспендирования, pH 7,4. Среда для ресуспендирования имеет такой же состав, что и среда промывания, но не содержит БСА.

300 мМ сахара
40 мМ MOPS
5 мМ ЭДТА
10 мМ KCl
1 мМ MgCl ₂

3.4.2.6. Выделение митохондрий

30 г растительного материала поместите в стакан, замороженный в лед (или помещенный на холодоэлемент) и залейте средой выделения (60 мл).

В среду выделения предварительно добавьте раствор 0,1% БСА (0,6 мл 20% раствора БСА на 120 мл среды выделения = 0,1% БСА).

Навеску измельчите ножницами, быстро и тщательно разотрите в ступке пестиком (или измельчите в гомогенизаторе).

Полученный гомогенат профильтруйте через капроновую ткань, залейте оставшейся средой выделения и отожмите пинцетом в химический стакан с воронкой.

Отфильтрованный гомогенат разлейте по центрифужным пробиркам, которые попарно уравновесьте.

В течение всей процедуры выделения химический стакан с воронкой и капроновой тканью, центрифужные пробирки находятся на льду или холодильнике.

Уравновешенные пробирки центрифугируйте при 2000 x g в течение 3 мин при 40С. Надосадочную жидкость (супернатант) быстро и осторожно перелейте в чистые охлажденные центрифужные пробирки, уравновесьте и центрифугируйте при 3000 x g в течение 5 мин. Супернатант слейте и отбросьте.

Центрифужные пробирки опрокиньте на фильтровальную бумагу, чтобы дать стечь оставшейся жидкости.

Одну центрифужную пробирку поместите в стаканчик со льдом, залейте половиной объема среды промывания и аккуратно промойте осадок с помощью охлажденной кисточки.

Общий объем среды промывания - 12 мл (перед промыванием в среду добавьте 0,4% БСА (0,3 мл 20% БСА на 12 мл среды = 0,4% БСА). Слейте промытый осадок в следующую пробирку с осадком, опять промойте и так до тех пор, пока не останется только одна пробирка. Оставшейся средой вторично промойте уже промытые пробирки и слейте в одну.

Центрифужную пробирку уравновесьте такой же пробиркой, наполненной водой и центрифугируйте при 3000 x g в течение 5 мин. Супернатант слейте и отбросьте, осадок ресуспендируйте с помощью кисточки в 0,6 мл охлажденной среды ресуспендирования. Пробирка с суспензией митохондрий поместите в стакан со льдом и

используйте для работы. Суспензию митохондрий можно хранить в холодильнике в течение 30-60 мин.

3.4.3.1. Выделение клеточных органелл животной клетки

Выделение ядер из животной ткани

Ядра изолировали из нормальной ткани печени крыс по методу Блобела и Поттера в модификации Кузьминой с соавторами.

Для изоляции ядер животных забивают декапитацией для более полного обескровливания. Быстро извлекается печень и помещает её на охлажденную среду, содержащую 0,25М сахарозу на буфере ТКМ (буфер ТКМ содержит 0,005М $MgCl_2$, 0,025 М KCl и 0,001М трис- HCl , pH-7,5). Охлажденную ткань печени измельчается ножницами и гомогенизируют при $+4^{\circ}C$ в гомогенизаторе Поттера-Эльвейема с тефлоновым пестиком в 0,25М сахарозе на буфере ТКМ. Полученный гомогенат фильтруется через 4 и затем 8 слоев марля и центрифугируется при 300-400g в течение 10 минут. Центрифугат используется для получения митохондрий.

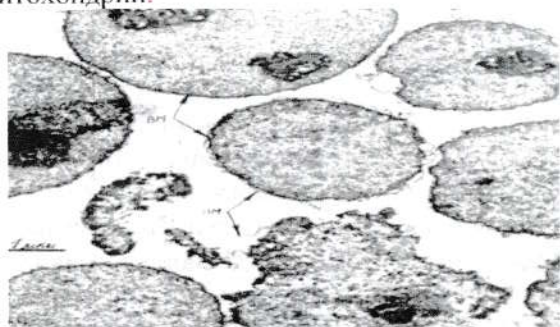


Рис.21. Электронная микрофотографии изолированных ядер из нормальной и регенерирующей печени крыс.

BM – внутренняя мембрана ядерной оболочки;

NM – наружная мембрана ядерной оболочки

3.4.3.2.Выделение митохондрий из животной ткани

(Дифференциальное центрифугирование)

Митохондрии - внутриклеточные органеллы большинства эукариотических клеток, имеющие собственную ДНК. Митохондрии - энергетические станции клеток. Метод дифференцированного центрифугирования для исследования субклеточных структур, в частности митохондрий, разработал доктор Альберт Клод, получивший Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1974 году.

В данном эксперименте рассматривалось выделение митохондрий из клеток печени крыс методом центрифугирования. В процессе выделения использовались новые бакеты уникальной формы, бакетный ротор R8S, который можно применять для высокоскоростного центрифугирования с охлаждением при ускорении $11\,500 \times g$ и конические пробирки объемом 50 мл.

Оборудование: центрифуга: высокоскоростная центрифуга с охлаждением, ротор, бакетный ротор, пробирки: 50 мл пробирки с коническим дном.

Ход работы:

1. Приготовьте 10% гомогенат печени крыс (количество ткани: от 10 до 20 г);
2. Центрифугируйте при скорости 1 800 об/мин, ускорении $600 \times g$, в течение 10 минут, при $+4^{\circ}C$, режимы ускорения/торможения - 9/9;
3. Перенесите супернатант в 50 мл коническую пробирку;
4. Центрифугируйте при скорости 5 600 об/мин, ускорении $5500 \times g$, в течение 20 минут, при $+4^{\circ}C$, режимы ускорения/торможения - 9/9;
5. Слейте супернатант. При деkantации слегка встряхните пробирку несколько раз, чтобы избавиться от красно-коричневой липосомной фракции в верхней части осадка. Добавьте необходимое количество 0,25-ти молярного раствора сахарозы в желто-коричневый осадок митохондрий и снова центрифугируйте при скорости 5 800 об/мин, ускорении $6000 \times g$, в течение 15 минут, при $+4^{\circ}C$, режимы ускорения торможения - 9/9;

Чем больше раз повторять вышеописанную операцию, тем выше степень чистоты выделенных митохондрий, однако при

повторах снижается их активность, поэтому рекомендуется повторять вышеописанную операцию не более двух раз.

Осадок: фракция митохондрий

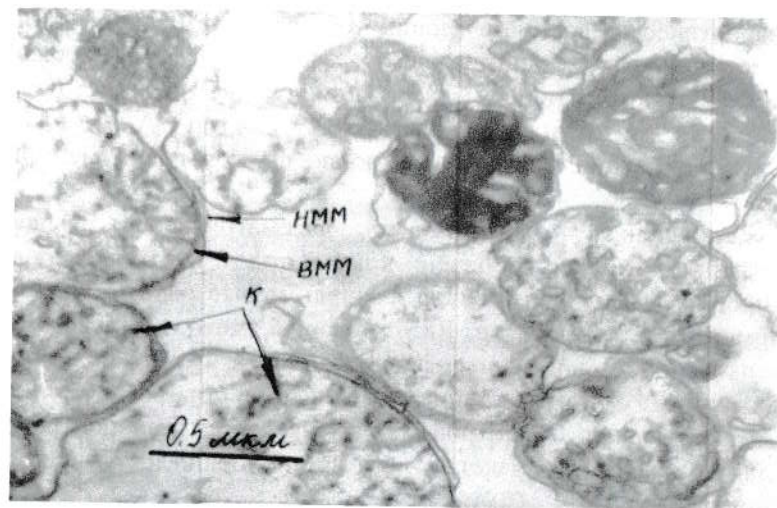


Рис.22. Электронная микрофотография изолированных митохондрий из печени крыс через 18-20 часов после частичной гепатэктомии. Увеличение: - 45.000x

НММ - наружная митохондриальная мембрана
ВММ - внутренняя митохондриальная мембрана
К - кристы.

ГЛАВА IV. ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЩИХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ

4.1. Ферментативный гидролиз крахмала

Фермент амилаза расщепляет крахмала до моносахаридов.

Фермент амилаза содержится в слюне, соке поджелудочной железы, крови, печени. Злаки - один из важнейших источников фермента амилазы.

Фермент амилаза расщепляет крахмал на сахар. Одним из важных источников фермента амилазы являются злаки. В большом количестве они накапливаются в сухом зерне и особенно в составе проросшего зерна. Ферменты проросших зерен обладают наибольшей активностью.

Крахмал с йодом дает синий цвет, в зависимости от размера частиц декстрина, образовавшихся в результате его разложения, йод меняется на фиолетовый, коричнево-красный желтый и желтый (цвет йода в воде). Следовательно, если фермент амилазы добавлен к раствору крахмала, смесь сначала изменится на синий, затем на пурпурный, красновато-желтый и желтоватый цвет под действием йода в пределах определенного времени.

Ход работы. Взять 9 пробирок и влить в каждую по 2-3 мл дистиллированной воды и по одной капле 1%-ного раствора йода. Отдельно взять в пробирку №10 2-3 мл 0,5%-ного раствора крахмала и залить 1 мл фермента. Установить время и хорошо встряхнуть смесь в пробирке. Затем с помощью пипетки добавить 1 каплю смеси в первый раствор. Жидкость в растворе дает синий цвет. Таким образом, каждые 30 секунд, 2, 3, 4 ... и т. В 9-ю пробирку добавляется одна капля из смеси в 10-й пробирке. Жидкости в растворах хорошо перемешиваются и образуются соответствующие цвета. Если жидкость во втором растворе посинела, следующий раствор нужно добавлять немного позже, например, каждую минуту. Если вторая пробирка станет пурпурной или красноватой, необходимо ускорить время, то есть ставить каждые 15 секунд.

Если желтый цвет в одном из растворов не меняется, это означает, что гидролиз крахмала завершился. Результаты эксперимента записаны в таблице ниже.

Реактивы: Слюна (слюна, разбавленная в 10 раз дистиллированной водой); ферментный сок (5-10 грамм проросшей или 5-дневной травы мелко измельчают и заливают в колбу 100 мл дистиллированной воды). Хорошо перемешивают, настаивают 30 минут, затем фильтруют. Отфильтрованная жидкость - ферментный сок. 1%-ный раствор йода, 0,5%-ный раствор крахмала.

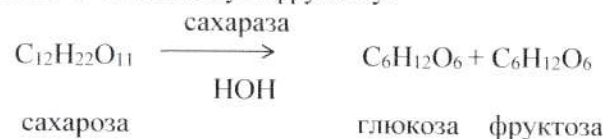
Таблица 9

Влияние фермента амилазы на крахмал

Пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Название продукта, из которого образуется окраска жидкости									

4.2. Определение активности фермента сахаразы

Фермент сахараза (инвертаза) гидролизует сахарозу и расщепляет ее на глюкозу и фруктозу.



Фермент сахараза содержится в большинстве растений. Особенно много его у дрожжевых грибов. Для определения активности ферментов используется ряд методов. Один из них основан на восстановительных свойствах вышеуказанных продуктов реакции, в которых глюкоза и фруктоза окисляются до соответствующих кислот, а ионы меди возвращаются.

Реактивы: Сок фермента сахаразы, сироп, полученный из дрожжевых грибов. Для этого в фарфоровой ступке растирают 5 граммов дрожжей, затем добавляют 5 мл дистиллированной воды и продолжают измельчение. В раствор добавляют еще 10 мл горячей (60 °С) воды и измельчают 10 минут. При этом растворяется фермент сахараза. Смесь фильтруют, в фильтре используют ферментный сок. 0,5%-ный раствор сахарозы, 20%-ный раствор гидроксида натрия, 2%-ный раствор медного купороса.

Ход работы. Наполнить 2 пробирки 1 мл 0,5%-ного раствора сахарозы. В одну пробирку добавить 1 мл воды, а в другую - 1 мл сока фермента сахаразы и инкубировать при 35°С в течение 15 мин. По истечении указанного времени нагреть обе пробирки, добавив 2 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия и 5-6 капель 2%-ного раствора сульфата меди. В растворе, подверженном действию фермента, образуется красный осадок.

4.3. Термолабильность ферментов

Поскольку ферменты имеют белковую природу, их важной характеристикой является их термолабильность, то есть их чувствительность к высоким температурам. Ферментативные процессы не могут протекать при температуре выше 70°С.

При 80-100 ° С ферменты полностью теряют каталитические свойства, белковая часть подвергается денатурации. Для всех ферментов существует определенная температура, при которой фермент имеет высокую активность. Оптимальная температура для большинства ферментов, выделенных из клеток и тканей теплокровных животных, составляет 37-40°С.

Оптимальная температура ферментов в растении 40°С - 60°С. При низких температурах ниже 0°С активность ферментов снижается или полностью прекращается. Однако они не денатурированы.

Принцип метода. Исследовано влияние температуры на активность фермента амилазы в различных условиях.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки; 50 мл в стакане; спиртовка; термостат; ледяная ванна.

Реактивы. 1. Разбавленная слюна (прополоскать рот дистиллированной водой, затем добавить в рот 10-15 мл воды, подержать 2-3 минуты и вылить в стакан). Сок фермента амилазы. 2. Раствор 1%-ного крахмала в 0,3%-ном растворе натрия хлорида. 3. Калий йодный раствор йода (1 г калия йода растворяют в 1 мл дистиллированной воды, объем раствора проводят 300 мл воды). 4. 5%-ный раствор медного купороса (CuSO₄ • 5H₂O).

Ход работы. В три пробирки добавить 1-2 мл разбавленной слюны (амилазы). Слюна в первой пробирке кипятится 2-3 минуты. Затем во все пробирки добавить по 3-4 мл крахмала. Первую и вторую пробирки инкубировать в термостате при 37 °С в течение

15-20 минут. Третью пробирку вылить в ледяную баню на 15-20 минут.

№	Фермент	Условия эксперимента	Субстрат	Инкубация	А	Б
					пробирки	
1	Амилаза	Денатурированные ферменты	Крахмал	15-20 минут 37°C		
2	Амилаза	Фермент в нативном состоянии	Крахмал	15-20 минут 37°C		
3	Амилаза		Крахмал	15-20 минут 37°C		

После инкубации жидкость в каждой пробирке делится на две части и добавляется в пробирки, которые обозначаются как пробирки линии А и В. Несколько капель йода в растворе йода калия добавляют в растворы линии А, а в растворах линии В нагревают 2-3 мл 20%-ного гидроксида натрия и 3-4 капли 5%-ного раствора сульфата меди, т. е. проводят реакцию Троммера. Результаты эксперимента сведены в таблицу и сделан вывод о термоподвижности ферментов.

4.4. Влияние pH окружающей среды на активность ферментов

Характерные особенности ферментов включают их чувствительность к изменениям pH окружающей среды. Активность ферментов резко меняется в зависимости от значения pH. Оптимальное значение pH не одинаково для разных ферментов. Например: оптимальное значение pH 1,5-2,0 для пепсина; амилаза слюны - 6,8-7,0; трипсин - 7,8. Большинство ферментов проявляют наибольшую активность в нейтральной, слабощелочной или слабокислой реакции. Ферменты обладают наибольшей активностью в изoeлектрическом состоянии. В кругах оптимальной активности частицы фермента в электрическом поле обычно не движутся ни к катоду, ни к аноду. Изменение pH приводит к снижению или полному прекращению активности фермента. В результате структура активного центра фермента нарушается.

Реактивы: 1. 1%-ный раствор йода в йоде калия. 2. 1%-ный раствор крахмала. 3. 0,2 Н раствор соляной кислоты.

Ход работы. К 8 пробиркам добавить по 1 мл дистиллированной воды, затем к первой пробирке добавить 1 мл 0,2 Н раствора соляной кислоты и перемешать. Затем взять 1 мл жидкости из этой же пробирки, добавить ко второй пробирке и перемешать, затем взять 1 мл, влить в третью пробирку и так далее. Взять 1 мл раствора из восьмой пробирки и вылить. Таким образом, образуются разные концентрации соляной кислоты, которые соответствуют разным значениям pH среды. Затем к каждому раствору добавить 2 мл 1%-ного раствора крахмала и 1 мл разбавленного раствора слюны, растворы встряхнуть и слить в термостат при 37 °C на 20 минут. После охлаждения во все растворы добавить 1-2 капли 1%-ного раствора йода калия. В растворах 5 и 6 определяется, что произошел полный гидролиз крахмала, в этих растворах pH среды раствора составляет около 6,8-7,2, поэтому амилаза имеет оптимальную активность.

4.5. Специфичность ферментов

Ферменты - это биологические катализаторы, обладающие определенным действием. Их уникальность - одна из важных особенностей живых организмов. Образование комплекса фермент-субстрат в каталитических процессах зависит от структуры белковой молекулы фермента, образования химических связей между его активными частями и соответствующими группами субстрата. Каждый фермент влияет только на определенный субстрат или конкретный тип химической связи в молекуле. Таким образом, специфическая природа ферментов должна соответствовать ферменту субстрату, поскольку ключ заблокирован.

Принцип метода. Исследовано влияние ферментов амилазы и сахаразы на различные субстраты, то есть крахмал и сахарозу.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки; термостат, спиртовая лампа.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор крахмала. 2. 2%-ный раствор сахарозы. 3. Разбавленная слюна; Ферментный сок амилазы. 4. Сахараза (10 г дрожжей гомогенизируют в 100 мл дистиллированной воде). 5. 20%-ный раствор гидроксида натрия. 6. 5%-ный раствор медного купороса.

Ход работы. В первую и во вторую пробирку добавляют по 2-4 мл раствора крахмала; в третье и четвертые пробирки заливают 2-4 мл разбавленной слюны (амилазы), во вторую и в четвертую пробирку добавляют 2-4 мл фермента сахаразы, затем растворы встряхивают и сливают в инкубатор в термостате при 37 °С на 20 минут. После инкубации к растворам 1 и 2 добавляют 1-2 капли йода из раствора йода калия. Нагревают, добавив 2-4 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия и 2-4 капли 5%-ного раствора сульфата меди в пробирках 3 и 4. Результаты реакции заносятся в таблицу и суммируются.

№	Субстрат	Фермент	Инкубация	Окраска сформированный с йодом	Результаты реакции Троммер
1	Крахмал	Амилаза	20 мин. 37°С		
2	Крахмал	Сахараза	20 мин. 37°С		
3	Сахароза	Амилаза	20 мин. 37°С		
4	Сахароза	Сахараза	20 мин. 37°С		

4.6. Вещества, влияющие на активность ферментов (ингибиторы и активаторы)

На активность ферментов также влияет ряд химических веществ, участвующих в реакционной среде. Присутствие определенных ионов в реакционной среде увеличивает скорость ферментативной реакции. Такие вещества называют активаторами. Активаторами часто являются катионы металлов, такие как Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} . Вещества, снижающие активность ферментативной реакции, называют ингибиторами. Примерами ингибиторов являются цианиды, соли тяжелых металлов.

Реактивы: слюна или ферментный сок амилазы (солод), 0,04% -ный раствор хлорида натрия, 0,1%-ный раствор медного купороса, 1%-ный раствор крахмала, 1%-ный раствор йода.

Ход работы. Подготовить пробирки в три ряда (по 6 в каждый ряд) и добавьте во все по 1 мл воды. Затем в первую пробирку каждого ряда налить по 1 мл сока фермента амилазы. С помощью пипетки смешать жидкость в первой пробирке, потом смесь налить во вторую пробирку и снова перемешать, так далее переливают со

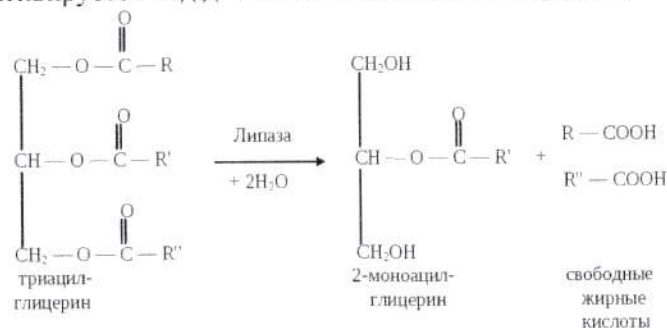
второго к третьему. Удалить 1 мл лишней смеси из последних шести пробирок. То же самое проделать в остальных рядах.

К растворам первого ряда добавить 1 мл воды, к растворам второго ряда - 1 мл 0,04%-ного раствора хлорида натрия, 1 мл 0,1%-ного раствора медного купороса к растворам третьего ряда. Затем ко всем растворам добавить 2 мл крахмала и инкубировать при 40°С в течение 10 мин. В конце акта во все пробирки добавить по 2-3 капли йода и определить действие активаторов и ингибиторов.

ГЛАВА V. МЕТОДЫ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

5.1. Влияние желчи на активность липазы

В молоко добавляют небольшое количество липазы и щелочной фенолфталеин до тех пор, пока смесь не приобретет розовый цвет, затем жидкость постепенно обесцвечивается при помещении в водяную баню с температурой 37 °С. Обесцвечивание ускоряется при добавлении желчи. Это свидетельствует о том, что липаза активируется под действием солей желчных кислот.



Необходимые инструменты: штатив с пробирками; водяная баня.

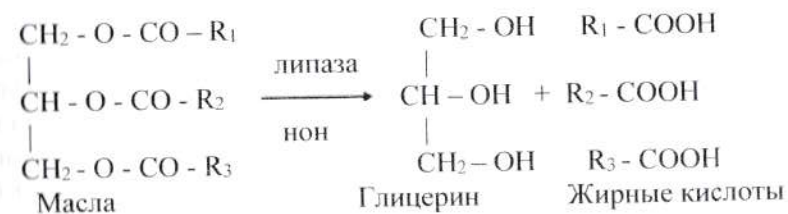
Реактивы. 1. Сваренное молоко разводят в воде. 2. 10%-ный раствор карбоната натрия. 3. 0,5%-ный раствор фенолфталеина в спирте. 4. Желчь. 5. Экстракт липазы - то есть экстракт поджелудочной железы - очищают от жира поджелудочной железы, мелко измельчают и растирают в ступке с добавлением экстракта липазы. В первый раствор также добавляется 1-2 капли желчи. Жидкости в растворах встряхивают и выливают в водяную баню при 37 °С, при этом наблюдается обесцвечивание фенолфталеина в экспериментах с желчью и без желчи в 5 раз большего количества воды. Полученный экстракт процеживают через марлю.

Ход работы. В две пробирки залить 1 мл молока и добавить 1-2 капли раствора фенолфталеина. К каждому раствору по каплям добавляют из раствора карбоната натрия до образования розовой окраски, и одновременно добавляют 2-4 капли.

5.1.2. Определение активности фермента липазы

Ферменты липазы широко распространены в растениях, особенно в семенах маслянистых растений. Активность фермента липазы также наиболее высока в проросших семенах.

Фермент липаза расщепляет жиры на жирные кислоты и глицерин.



Под действием фермента липазы количество жирных кислот увеличивается, поэтому активность фермента определяется титрованием кислотности реакционной среды.

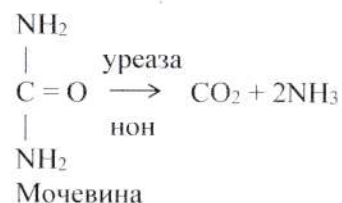
Реактивы: 2-3 дня набухшего семенного ядра, ацетатный буфер, 0,2М раствор (рН - 4,8) хлопкового масла, 96% - ный раствор этилового спирта, эфир, фенолфталеин, 0,1 Н раствор гидроксида калия.

Ход работы. Чтобы получить фермент липазу, взять 2 грамма семян 2-3 дневного клеверины, измельчить их в фарфоровой ступке с использованием молотого стекла до образования однородной массы и добавьте 5 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН - 4,8) размешен в колбу объемом 100 мл. Добавить в колбу 2 мл чистого хлопкового масла и инкубировать при 40 °С в течение 2 часов. За это время 3-4 раза встряхнуть колбу. По истечении времени добавить в колбу 20 мл 96%-ного этилового спирта и 20 мл эфира. Добавить 2-3 капли фенолфталеина и титруйте 0,1 Н гидроксидом калия.

Контроль готовится так же, как и эксперимент, за исключением того, что его сразу титруют без инкубации.

5.1.3. Определение активности уреазы

Фермент уреазы расщепляет мочевины на диоксид углерода и аммиак.



Реактивы: семена сои и арбуза, 1%-ный раствор мочевины, фенолфталеин.

Ход работы. Взять 5 г ядер семян сои или арбуза и хорошо размолоть их в фарфоровой ступке до образования муки. Затем взять 2 пробирки и добавить в каждый по 1 г муки из семян сои или арбуза. Добавить 1 мл воды к первой пробирке и 1 мл 1%-ного раствора мочевины ко второй пробирке. Растворы инкубируют при 40 °С в течение 15 мин. Затем к обоим растворам добавить 1-2 капли фенолфталеина. Среда во втором растворе является щелочной средой из-за аммиака, образующегося под действием фермента, и имеет розовый цвет.

5.1.4. Ферментативный гидролиз белка

Пепсин - самый важный протеолитический фермент, который вызывает изменения белков в желудке и содержится в желудочном соке. Клетки слизистой оболочки желудка вырабатывают пепсиноген, пепсиноген превращается в активный протеолитический фермент - пепсин - под действием соляной кислоты желудочного сока. Оптимальная концентрация ионов водорода для пепсина - pH -1,5-2,5. В кислой среде (pH-1,5-2,5) расщепляет белки на гидролитические пептоны. Внутри белковой молекулы пепсин разрывает пептидные связи между ними. Пепсин разрывает связи, образованные в основном аминокетонами ароматических аминокислот и пептидными связями, такими как Ala-Ala, Ala-Ser.

Клетки слизистой оболочки желудка вырабатывают пепсиноген, превращение пепсиногена в пепсин в физиологических условиях является автокаталитическим процессом. Молекулярная масса пепсиногена составляет 42500, а пепсина - 34500. Во время активации из пепсиногена высвобождается 6 полипептидов.

Таким образом, соляная кислота создает оптимальные условия для действия пепсина. Кроме того, под действием этой кислоты

белки набухают и денатурируются, что облегчает пищеварение. Переваривание белков под действием пепсина наблюдается на примере фибрина, т.е. под действием пепсина образуется водорастворимый пептон.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; водяная баня; пипетка 5 мл.

Реактивы. 1. Фибрин. 2. 0,1% - ный раствор пепсина в 0,2%-ной соляной кислоте. 3. 0,25%-ный раствор соляной кислоты. 4. 10%-ный раствор карбоната натрия. 5. 1%-ный раствор медного купороса. 6. 10%-ный раствор гидроксида натрия.

Ход работы. Взять четыре пробирки, в первую добавить 4 мл раствора соляной кислоты, во вторую - 4 мл раствора пепсина соляной кислоты, в третью - 4 мл с содой нейтрализованного раствора пепсина в соляной кислоте, а в четвертую - 4 мл кипяченого и охлажденного раствора пепсина в соляной кислоте.

Каждую пробирку заполняют небольшими кусочками фибрина, затем все пробирки одновременно помещают в водяную баню при 37-40 °С. Через 30 минут проверяется результат реакций, в первой пробирке фибрин набухает под действием соляной кислоты, во второй пробирке видно, что фибрин растворяется после инкубации под действием раствора пепсина в соляной кислоте. Фибрин в третьей пробирке не изменяется, поскольку пепсин не активен в нейтральной среде. Фибрин в четвертой пробирке набухает под действием соляной кислоты, потому что при кипячении пепсин теряет свое биологическое состояние.

Жидкости во всех растворах фильтруют, с каждым фильтратом проводят реакцию биурета и на основании полученных данных делают заключение.

5.1.5. Определение активности фермента тирозиназы

Фермент тирозиназа - это фермент, который катализирует окислительно-восстановительные реакции и широко распространен в растениях. Они играют важную роль в образовании цветных веществ меланинов в растительных продуктах.

Реактивы: картофель, 0,1%-ный раствор тирозина (0,1 г тирозина растворяют в 100 мл 0,01 Н раствора Na₂CO₃ на медленном огне).

Ход работы. Картофель измельчить на терке и отжать сок через 2–3 слоя марли. Добавить в две пробирки по 1 мл картофельного сока. В первую пробирку добавить 2–3 капли воды, ко второй пробирке добавить 2–3 капли 0,5%-ного раствора тирозина. Жидкость в растворе хорошо перемешать и инкубировать при 40 °С в течение 60 мин. Время от времени растворы 3–4 раза хорошо перемешать. Со временем в растворе, в который добавлен тирозин, образуется черный цвет. Этот цвет характерен для меланина, который образуется из тирозина под действием фермента тирозиназы.

5.1.6. Определение активности фермента фосфатазы

Фермент фосфатаза широко распространен в растительном мире и играет важную роль в метаболическом процессе. Этот фермент относится к классу гидролаз и участвует в гидролизе сложных эфиров фосфорной кислоты.

Ферменты фосфатазы, обнаруженные в разных частях хлопка, делятся на «щелочные фосфатазы» (оптимум pH выше 8) и «кислые фосфатазы» (оптимум pH ниже 6), в зависимости от их воздействия в различных средах.

Реактивы: раствор трис-буфера (см. Приложение), 0,05%-ный раствор глицерофосфата натрия, 10% -ный раствор трихлоруксусной кислоты.

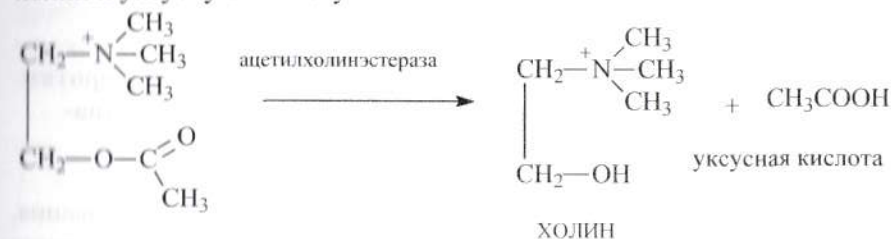
Ход работы. 1–3 г экстрагированных (3–5 суток) семян экстрагируют и измельчают в фарфоровой ступке с помощью 1–5 мл трис-буфера (pH -5,5 или pH- 9,0) до образования однородной массы. Полученный гомогенат центрифугируют 10 минут при скорости 1500–3000 оборотов в минуту. Затем объем центрифугата увеличивают до 10 мл. Этот раствор является источником фермента фосфатазы.

Взять 2 пробирки, по 1 мл буферного раствора и 1 мл 0,05%-ного раствора глицерофосфата натрия. В первую пробирку добавить 2 мл раствора фермента и поместить на водяную баню при 37 °С на 30 минут. Ко второй пробирке добавить 2 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и добавить 2 мл раствора фермента. Второй раствор тоже поместить в водяную баню. По истечении времени к первому раствору добавить 2 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Обе пробирки затем

центрифугируют при 3000 об / мин в течение 10 минут. Количество фосфора в центрифугата определяется колориметрическим методом. Разница в количестве фосфора в опытном и контрольном растворах является признаком активности фермента.

5.1.7. Определение активности фермента холинэстеразы

Ацетилхолин играет посредническую роль в проведении нервных импульсов. Холинэстераза расщепляет ацетальхолин на холин и уксусную кислоту:



Эта реакция приводит к образованию кислой среды из-за накопления уксусной кислоты, что можно обнаружить с помощью индикатора. В данном исследовании, в зависимости от условий, используется индикатор бромтимолового синего, формирующий цвет. Зона изменения цвета находится в диапазоне pH 7,6–6,0. Желтый в кислой среде, зеленый в синем в щелочной среде.

Субстрат с ферментом инкубируют при разных температурах. Ферментативный гидролиз ацетилхолина определяется цветом инкубационной смеси.

Оптимальная температура для ферментов, выделенных из большинства тканей животных, составляет 37–40°C. При понижении температуры ферментативный катализ замедляется, и при 0°C реакция не происходит.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки, водяная баня; ледяная ванна.

Реактивы. 1. 0,5% - ный раствор ацетилхолина, источника вывороточного фермента холинэстеразы. 0,2% - ный раствор бромтимолового синего разбавленный 1:50 (2,5 г индикатора бромтимоловый растворяют 4,5 мл 0,1 н гидроксида натрия, полученный раствор переносят в колбу на 50 мл и 12,5 мл 0,1 н раствора, добавляется из раствора борной кислоты, затем объем

раствора доводится до метки колбы раствором 0,1 М КСl. Перед использованием раствор разбавляют в 2,5 раза).

Ход работы. Берут три пробирки, каждая из которых заполнена 2,5 мл сыворотки и 0,5 мл индикатора бромтимолового синего. Первый раствор выливают на водяную баню при 40 °С, второй - на водяную баню комнатной температуры, третий - на ледяную баню. Через 10 минут добавляют ко всем растворам 0,5 мл раствора ацетилхолина, перемешивают жидкости и снова хранят при той же температуре. Через 10–15 минут определяется цвет, сформированный в пробирках, и определяется, что он зависит от температуры фермента.

5.1.8. Определение активности АсАТ и АлАТ в сыворотки крови динитрофенилгидрозоновым методом (Рейтмана-Френкеля)

Принцип метода. В результате переаминирования, происходящего под действием АсАТ и АлАТ, образуется щавелеуксусная кислота способна в процессе ферментативной реакции превращаться в пировиноградную кислоту. При добавлении 2,4-динитрофенилгидрозина в щелочной среде образуется окрашенный гидрозон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Реактивы: 0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4.

142 г натрия фосфата двухзамещенного ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 13,6 г калия фосфата однозамещенного (KH_2PO_4) доводят каждый в отдельности до 1 л дистиллированной водой. Соль предварительно растирают в ступке в порошок. Для получения буферного раствора pH 7,4 смешивают 840 мл 0,1 моль/л раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 160 мл 0,1 моль/л раствора KH_2PO_4 . Величину pH буфера доводят под контролем pH-метра. Полученный раствор с индикатором бромтимоловым синим должен давать голубую окраску. К приготовленному раствору в качестве консерванта можно добавить 5–10 мл хлороформа;

0,04%-ный раствор бромтимолового синего 100 мг индикатора растворяют в ступке с 3,2 мл 0,05 моль/л раствором натрия гидроксида. После растворения смывают водой в мерную колбу на 250 мл и доводят объем водой до метки;

Субстратный раствор для определения аспаратаминотрансферазы. 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 2,66 г DZ – (или 1,33 г Z – аспаргиновой кислоты) отвешивают на аналитических весах и растворяют в 1 моль/л раствора натрия гидроксида, который следует прибавлять осторожно, небольшими порциями до полного растворения составных частей и до получения pH 7,4. Раствора приливают количественно в мерную колбу на 100 мл, ополаскивая 0,1 моль/л фосфатным буфером, pH 7,4.

Доливают буфер в колбу до метки, тщательно перемешивают, прибавляют 1 каплю хлороформа и сохраняют в холодильнике в замороженном виде. Перед употреблением раствор полностью оттаивают;

Субстратный раствор для определения аланинаминотрансферазы. 29,2 мг α -кетоглутаминовой кислоты и 1,78 г DL-аланина (или 0,89 г L-аланина) отвешивают на аналитических весах, дальнейшая работа, как и с предыдущим реактивом;

Раствор 2,4-динитрофенилгидрозина. 19,8 мг реактива растирают в небольшом количестве 1 моль/л раствора соляной кислоты при нагревании на водяной бане. После того как раствор остынет, доводят объем соляной кислотой до 100 мл. На

5.1.9. Определение активности гаммаглутамилтранспептидазы (γ -глутамилтрансферазы) в сыворотке крови с помощью набора реактивов

Принцип метода. γ -глутамилтранспептидазы (ГТТ) катализируют реакцию переноса α -глутаминового остатка с хромогенного субстрата на глицилглицин. При этом высвобождается *p*-нитроанилин, оптическую плотность которого измеряют фотометрически. Активность фермента определяют по приращению оптической плотности раствора кинетическим методом или методом постоянного времени. Активность фермента наиболее высока в почках, поджелудочной железе, печени и предстательной железе.

Реактивы: субстрата 200 мг α -глутамил-*p*-нитроанилина; 2,47 г буферной смеси (глицил-глицин 1,26 г, трис 1,21 г); 3,0 мл стандартного 5 моль/л раствора *p*-нитроанилина; дополнительный реактив-10%-ная уксусная кислота.

Оборудование: фотоэлектроколориметр или спектрофотометр, длина волны 400-430нм.

Приготовление рабочих растворов.

1.Буферный раствор, рР 8,1.

2.2,47г буферной смеси растворяют в 70-80мл дистиллированной воды в мерной колбе на 100мл и доливают водой до метки. Раствор стабилен при хранении в холодильнике.

2.Субстратно-буферный раствор. Отбирают 40мг субстрата и растворяют в 118мл дистиллированной воды, добавляя

17мин буферного раствора и доводят до температуры 37°C. Раствор устойчив при 15-25°C в течение 10ч.

Ход определения. Кинетический метод. В кювету длиной 1см, термостатированную при 37°C, помещают 1,2мг субстратно-буферного раствора, предварительно нагрето до 37°C. Затем вводят 0,1мл сыворотки или плазмы крови, перемешивают и начинают отсчет времени. Измеряют оптическую плотность раствора при 400-430 нм против воды в течение 1-5мин после старта.

Для калибровочной пробы 1,0мл стандартного раствора п-нитроанилин (содержимое ампулы) доводят дистиллированной водой до 5мл. Измеряют оптическую плотность раствора в условиях аналогичных опытной пробе.

Расчет активности γ -глутамилтранспептидаза ведут по формулам:

$$X = 21660 \frac{\Delta A}{A} \text{ или}$$

$$X = 77,98 \frac{\Delta A}{A},$$

Где, X-активность фермента, нмоль/с·л или мкмоль/г·мл;

21660-коэффициент для перевода в моль/с·л;

77,98- коэффициент для перевода в мкмоль/г·л;

ΔA -разность экстинкций опытной пробе в пересчете на 1мин инкубации;

A-экстинкция калибровочной пробы.

Активность γ -глутамилтранспептидазы определяют по калибровочному графику. Для построения его из стандартного раствора п-нитроанилина (содержимое ампулы) готовят разведения в соответствии с таблицей 10.

Таблица 10

Разведения п-нитроанилина для построения калибровочного графика

№ пробирки	Стандартный раствор п-нитроанилина, мл	Дистиллированная вода, мл	Активность фермента	
			нмоль/с·л	мкмоль/г·мл
1	0,1	0,9	550	1,98
2	0,2	0,8	1100	3,96
3	0,4	0,6	2200	7,92
4	0,8	0,2	4400	15,84
5	1,0	-	5500	19,8

В пробирке отмеряют по 0,1мл полученных растворов добавляют по 7мл 10%-ного раствора уксусной кислоты, перемешивают и фотометрируют против воды в условиях, аналогичных опытной пробе. Строят график зависимости оптической плотности раствора от активности фермента.

5.2.Определение активности мембранносвязанных ферментов

5.2.1. Определение цитохром-с-оксидазной активности

Основные компоненты цитохромной системы локализованы в митохондриях.

Цитохром-с-оксидаза — чрезвычайно важный концевой дыхательный фермент. Цитохром *a₃* представляет собой терминальный участок дыхательной цепи — цитохромоксидазу, которая осуществляет окисление цитохрома *c* и образование воды. Элементарный акт, представляет собой двухэлектронное восстановление одного атома кислорода, т.е. каждая молекула кислорода одновременно взаимодействует с двумя электротранспортными цепями. При транспорте каждой пары, электрон во внутримитохондриальном пространстве, может накапливаться до 6 протонов.

Цитохром-с-оксидазную активность определяли спектрофотометрически по скорости окисления восстановленного дитионитом цитохрома-с. Измерение проводили на СФ при длине волны 550 нм.

В кювету наносили 0,2 М калий фосфатный буфер, pH-7,0 – 2,2 мл и восстановленный дитионитом $2 \cdot 10^{-5}$ цитохром с – 0,2мл. Реакцию начинали с добавления белка митохондрии, суспендированных в 0,25 М сахарозе на трис-HCl буфере. Конечный объем пробы составил 3мл.

Цитохром-с-оксидазную активность рассчитывали по следующей формуле:

$$A = \frac{E(550)}{B \times 12,8}$$

Где E- изменение экстинкции при 550 нм за 1 минуту.

12,8- коэффициент экстинкции для цитохрома -с.

Активность цитохром-с-оксидазы выражали в нмолях цитохрома с, окисленного за 1 мин. на 1 мг белка.

5.2.2.Определение НАД.Н-цитохром-с-редуктазной активности

НАД.Н- цитохром-с- редуктазная активность измерялась по скорости восстановления окисленного цитохрома-с в присутствии НАД.Н и KCN, т.е. по повышению оптической плотности при 550 нм.

В кювету емкостью 3 мл внесли 0,2М калий-фосфатный буфер, pH 7,4 – 2,2мл, $3 \cdot 10^{-5}$ М цитохрома-с 0,1мл, $6 \cdot 10^{-4}$ М НАД.Н - 0,1мл, нейтрализованный $1 \cdot 10^{-3}$ М KCN-0,1мл. реакцию начали добавлением белка исследуемой суспензии. Конечный объем пробы -3мл. Измерения проводили при 550нм на спектрофотометре-46.

5.2.3.Определение активности ротенон нечувствительной НАД.Н: цитохром-с-редуктазной

Кюветы спектрофотометра заполняют средой, содержащей: фосфатный буфер (pH 7,4), 1мМ KCN, 1мкМ ротенон, 1,5 мМ НАДН, 10-20 мкМ цитохром-с. Устанавливают длину волны 550 нм. Для этого кюветы помещают в кюветное отделение,

устанавливают длину волны по шкале прибор на отметке 550 нм и добавляют к среде нейтрализованной (pH 7,4) раствор аскорбиновой кислоты (конечная концентрация -5-10 мМ).

Цитохром -с немедленно восстанавливается, и раствор меняет цвет от красновато-оранжевого до ярко-розового. Устанавливают шкалу длин волн на 550 см по максимальному поглощению раствора восстановленного цитохрома-с, и регистрируют увеличение поглощения при 550 нм. Рассчитывают удельную активность препаратов в микроэлектронно эквивалентах за 1 мин в расчете на 1 мг белка. Коэффициент миллимолярной экстинкции для цитохром-с: =19. Активность фермента, характерного для внешней мембраны, определяют по разнице скоростей реакцией в присутствии и в отсутствие ротенона.

5.2.4.Определение активности фермента глутаматдегидрогеназы

Глутаматдегидрогеназа (α -глутамат: НАДФ-оксидоредуктаза) находится во внутренней мембране и матриксе митохондрий. Этот фермент катализирует реакции, протекающие при окислении субстрата, с выделением водорода. Освобождающийся от донора водород переносится на различные акцепторы. Определение активности фермента измеряется по скорости окисления или восстановления НАДФ⁺, НАДФН.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; центрифуга; гомогенизатор; ледяная ванна; спектрофотометр; пипетки.

Реактивы. 1. 0,25 М раствор сахарозы. 2. 0,05 М Na, К - фосфатный буфер, pH 8,2. 3. 0,5%-ный раствор тритона X-100 готовят в буфере с Na₂HPO₄. 4. 0,25 М сахарозный трис-HCl-буфер, pH 8,2. 5. 10^3 М раствор ЭДТА. 6. Раствор НАДФ $18 \cdot 10^{-4}$ М. 7. 0,75 М раствор глутаминовой кислоты. 8. Ткань.

Ход работы. Активность глутаматдегидрогеназы определяется во фракциях митохондрий. Для отделения митохондрий берут 0,5 г ткани и измельчают ножницами. Для гомогенизации ткани используют 0,1 М раствор ЭДТА 0,25 М сахарозы. Гомогенат ткани готовят в соотношении 1:10 потом центрифугировали в течение 10 минут при 1200 об/мин. Осадок сбрасывается, жидкая часть центрифугировали при 12000 об / мин.

в течение 10 минут. Осадок дважды промывают 0,25 М раствором сахарозы, затем разрушают митохондриальную мембрану раствором Тритона X-100, гомогенизируют 1 мл раствора тритона X-100 и 1 мл фракции митохондрий и затем помещают на лед на 20 минут. Применить митохондриальную суспензию на 30 минут при 12000 об / мин. центрифугировали. Осадок отбрасывают и определяют активность глутаматдегидрогеназы с жидкостью.

Для определения активности фермента инкубационную смесь готовят следующим образом (в мл на образец):

0,25 М сахароза, буфер трис HCl	0,6
ЭДТА	0,3
Вода	1,7
НАДФ	0,1

Кювета спектрофотометра заполнена 2,7 мл инкубационной смеси и 0,1 мл экстракта митохондрий. Реакцию инициируют добавлением к инкубационной смеси 0,2 мл 0,75 М глутаминовой кислоты. Оптическая плотность образца измеряется каждые 15 секунд в течение 1,5–2 мин.

Активность глутаматдегидрогеназы (мкмоль НАДФ / мин. / 1 мг белка) рассчитывают по следующей формуле.

$$X \frac{\Delta E \cdot V 1000}{6,22a}$$

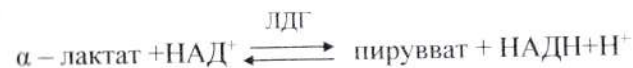
В этом случае ΔE - изменение оптической плотности раствора за 1 минуту; V - общий объем пробы (3 мл); a - количество белка в пробе, мг;

6,22 - микромолярный коэффициент экстинкции пиридиновой нуклеотидной формы на длине волны 340 нм.

5.2.5. Определение активности фермента лактатдегидрогеназы

5.2.5. Определение активности лактатдегидрогеназа

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (α -лактат НАД оксидоредуктаза, КФ1.1.1.27) относится к числу наиболее активных ферментов, осуществляющих окислительно-восстановительные превращения. Лактатдегидрогеназа катализирует реакцию:



При значениях pH, близких к нейтральным, равновесие реакции сдвинуто в сторону образования молочной кислоты и НАД⁺. ЛДГ локализована преимущественно в цитоплазматической фракции, однако, в ряде тканей фермент обнаружен и на внешней мембране митохондрий.

Существует несколько методов определения активности лактатдегидрогеназы, основанных как на использовании естественных, так и искусственных акцепторов водорода. Основу данного определения составляет метод Бергмейра и соавт.

Принцип метода. Активность лактатдегидрогеназы оценивается по скорости окисления НАДН, которая регистрируется спектрофотометрически по убыли величины оптической плотности при длине волн 340 нм.

Растворы:

1,0,25Н раствор сахарозы, содержащий 1 мМ ЭДТА (pH 7,4) (м.м. сахарозы 342,5 г/моль, м.м. ЭДТА 292,24 г/моль) : 8,6 г сахарозы, 0,029г ЭДТА растворяют в 50 см³ дистиллированной воды. Доводят pH до 7,4. Раствор переносят в мерную колбу объемом 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

2,0,02М Трис-HCl буфер (м.м. трис 121,14г/моль) : 0,24г триса растворяют 25 см³ дистиллированной воды. Доводят pH до 7,6 с помощью 1М раствора HCl. Раствор переносят в мерную колбу объемом 100мл и доводят до метки дистиллированной водой.

3,0,06М раствор пирувата натрия (м.м. пирувата натрия 110,04 г/моль) : 0,066г пирувата натрия растворяют в 10мл 0,02М трис-буфера.

4,0,005М раствор НАДН (м.м. 663,46 г/моль) : 0,033г НАДН растворяют в 10мл трис-буфера

Ход работы.

1.Навеску ткани печени (200мг) гомогенизируют при температуре 4°C с 1,8мл охлажденной средой выделения : 0,25М раствор сахарозы, содержащий 1мМ ЭДТА pH 7,4.

2.Полученный гомогенат центрифугируют 15 минут при 10000 об/мин, в супернатанте определяют активность фермента. Центрифугат разводят в раз.

Реактивы, мл	Опыт	Контроль
Трис- HCl, 0,02М, pH 7,5	2,85	2,85
Пируват натрия, 0,06М	0,05	0,05
H ₂ O	-	0,10
НАДН, 0,005	0,05	0,05

5. В опытную пробирку добавляют 0,1 мл центрифугата, быстро перемешивают и измеряют исходную величину оптической плотности (A_1). Измерение повторяют через 1 и 2 мин и рассчитывают $\Delta A/\text{мин}$.

6. Активность лактатдегидрогеназа рассчитывает по формуле:

$$X = \frac{\Delta A \cdot V \cdot K \cdot 60}{6.22 \times a} \text{ (МК МОЛЬ} \cdot \text{Г}^{-1} \cdot \text{Г}^{-1}),$$

5.2.6. Определение активности аденозинтрифосфатазы в мышечной ткани

$$\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{АТФаза}} \text{АДФ} + \text{P}_i - 10 \text{ ккал / моль.}$$

Необходимые инструменты: гомогенизатор, аналитические весы, ножничные пипетки на 1 и 2 мл, штатив с пробирками, воронки, фильтровальная бумага, термостат, спектрофотометр; центрифуга.

1. Мышечная ткань.

2. Раствор 0,25 М сахарозы в трис-НСl (рН 7,4).
3. 20% - ный раствор трихлоруксусной кислоты.
4. Инкубационная смесь: Трис-НСl (рН-7,5) -0,2 М, КСl-0,05 М, NaCl -0,58 М, ЭДТА - 0,01 М, MgCl₂ - 0,02 М , АТФ -0,02 М
5. Буферная смесь, рН 4 - эту буферную смесь готовят из раствора 0,2 М уксусной кислоты и 0,4 М CH₃COONa · 3H₂O.
6. 1% - ный раствор молибдата аммония.
7. 1% - ный раствор аскорбиновой кислоты в 1 М купоросе.

Ход работы. 100 мг мышечной ткани измельчают и гомогенизируют с 5 мл 0,025 М раствора сахарозы трис - HCl (pH 7,4). Полученный гомогенат фильтруют через марлю. Добавляют 2 мл гомогената в две пробирки. Первая пробирка - это контрольный образец, в который добавлен 1 мл 20% - ного раствора трихлоруксусной кислоты. Затем к обоим растворам добавляют 2 мл инкубационной смеси и помещают в термостат при 37°C на 30 минут - инкубация.

По окончании инкубационного периода к исследуемой пробе добавляют 1 мл 20% -ного раствора уксусной кислоты. Затем объем жидкости в пробирках доводят до 10 мл раствором 0,25 М сахарозы и центрифугируют со скоростью 2500 обр / мин в течение 10 минут. Осадок сливают и проводят окрашенную реакцию с жидкой частью.

Для этого берут 1 мл центрифуги и добавляют к ней 2 мл раствора молибдата аммония, 1 мл раствора аскорбиновой кислоты в сульфате меди и 6 мл ацетатного буфера. Как только растворы смешаются, оставьте на 30 минут. Полученную интенсивность цвета затем измеряют на спектрофотометре при длине волны 750 нм.

Активность фермента АТФ аза определяется количеством микромолей, которая показывает, сколько АТФ фермент в 1 г ткани может разрушить за 1 минуту. Активация фермента АТФазы рассчитывается следующим образом (мкмоль /Рi / г / мин).

$$E = \frac{(a-b) \cdot 5}{0,031 \cdot C \cdot 30}$$

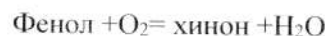
Где: а - количество фосфора в экспериментальной пробе (это количество находится на калиброванном графике), мг; b - количество фосфора в контрольной пробе (это количество также находится на калиброванном графике), мг; 0,031- количество Рi (мг), которое образуется при разложении одного мкмоль АТФ под действием АТФазы, 5 - объем гомогената, мл; С - вес ткани, г; 30 - время инкубации.

Создание калиброванного графика. Для этого готовится стандартный раствор, в котором содержится 0,025 мг фосфора на 1 мл раствора. Из этого раствора готовят фосфор различной концентрации: 0,0123 мг; 0,025 мг, 0,0373 мг, 0,050 мг; 0,0623 мг; 0,0746 мг; 0,0869 мг, 0,0982 мг; 1,105 мг.

Для этого в пробирки добавляют 0,5, 1,0; 1,5, 2,0; 2,5; 3,0, 3,5; 4,0; заливают 4,5 мл стандартных растворов. Затем проводят описанную выше цветовую реакцию, и через 30 минут оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 750 нм. Затем по результатам создается калиброванный график. По этому графику определяется количество фосфора в экспериментальном и контрольном образцах.

5.2.7.Определение активности полифенолоксидазы

Фенольные соединения- важные компоненты окислительно-восстановительных процессов. Полифенолоксидаза (КФ1.14.18.1) катализируют реакции окисления полифенолов. Окисляясь кислородом воздуха, они превращаются в хиноны.



Полифенолоксидаза действуют на полифенолы, О-дифенолы, монофенолы, дубильные вещества. Активность полифенолоксидазы

определяют спектрофотометрическим способом, измеряя светопоглощение продуктов окисления пирокатехина при 420нм.

Оборудование: спектрофотометр; центрифуга; гомогенизатор; весы.

Посуда: колбы на 500мл, 100мл, 25мл, центрифужные пробирки.

Материалы и реактивы: 0,1М фосфатный буфер, рН 7,0; 0,05М раствор пирокатехина.

Приготовление растворов.

Буферный раствор готовится из исходных 0,1М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 — рН 7,0. Раствор пирокатехина (5,5мг/мл) готовят, растворяя навеску в д.в.

Ход работы. В опытную кювету вносят 0,5мл супернатанта, 2,0мл буфера и после перемешивания реакцию инициируют внесением 0,5мл раствора пирокатехина. Реакцию окисления пирокатехина регистрируют на спектрофотометре по возрастанию светопоглощения при 420нм.

Для определения величины скорости самоокисления пирокатехина в контрольную кювету вносят 2,5мл 0,1М фосфатного буфера и 0,5мл раствора пирокатехина регистрируют, как и опытную пробу. Из величины скорости опытной пробы вычитали значения скорости самоокисления пирокатехина.

Метод расчета. Активность полифенолоксидазы в относительных единицах на 1 г сырой массы, рассчитывают по следующей формуле:

$$A = \frac{dD}{dt} = \frac{dD \times V1 \times V3}{dt \times P \times V2}$$

Где, dD — величина светопоглощения, усл.ед.;

l- ширина кюветы, см;

P- навеска растительной ткани, г;

V1- объем для экстракции, мл;

V2- объем супернатанта, вносимого в кювету, мл;

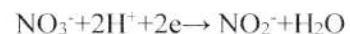
V3- конечный объем пробы в кювете, мл;

dt- время реакции, мин.

5.2.8.Определение активности нитратредуктазы

Принцип метода. Нитратредуктаза относится к индуцибельным ферментам, активность которого в растительных клетках возрастает в присутствии нитратов. Нитратредуктаза

катализует реакцию восстановления нитратов до нитритов, в результате которой осуществляется перенос двух электронов от НАД(Ф)Н к нитрату.



За реакцией наблюдают по уменьшению светопоглощения при 340 нм ($E=6,22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ в результате окисления НАД(Ф)Н).

Оборудование: спектрофотометр, аналитические весы, центрифуга, штатив.

Посуда: колбы на 500мл – 3 шт; пипетки на 0,1мл; 0,2мл; 5мл – 1 шт.

Материалы и реактивы: побеги проростков пшеницы; 0,1М Na-фосфатный буфер, pH 7,5; 0,5 М KNO_3 , 0,006 М НАДН.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1М растворы одно- и двухзамещенных фосфатов натрия на pH-метре до pH 7,5.

Растворы KNO_3 (50,5мг/мл) и НАДН (4мг/мл) готовят, растворяя навески в д.в.

Ход работы. В кювету вносят 0,1мл 0,5М KNO_3 , 0,1мл 0,006М НАДН и 2,1мл 0,1М Na- фосфатный буфер, pH 7,5. Реакцию инициируют внесением 0,2мл супернатанта. За ходом реакции следят на спектрофотометре, записывая изменения светопоглощения раствора при 340нм в течение 5мин с интервалом 15-20с (V_1).

Фоновую реакцию прописывают аналогично опытной, только вместе 0,1мл 0,5М KNO_3 вносят 0,1мл д.в. (V_2). Результаты наблюдения записывают в таблицу 11.

Таблица 11

Величины светопоглощения НАД.Н от времени протекания реакции восстановления нитратов в присутствии нитратредуктазы

Измерения Время реакции t, с Светопоглощение D, усл. ед.

1
2
3
4

Метод расчета. Активность ферментов определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D, t) или по формуле для очищенных образцов (мк М/мин) и супернатанта тканей (мк моль/ мин г) (2):

$$V = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \times l \times dt} \quad (1)$$

$$V_0 = (V_1 - V_2) \frac{V_1 \times V_3}{P \times V_2} \quad (2)$$

Где, dD – величина светопоглощения ($D_1 - D_2$), усл.ед.;

6,22- коэффициент микромолярного светопоглощения;

l- ширина кюветы, см;

P- навеска растительной ткани, г;

V_1 - объем супернатанта, мл;

V_2 - объем супернатанта, вносимого в кювету, мл;

V_3 - конечный объем пробы в кювете, мл;

dt- время реакции, мин.

Рассчитанные величины активности нитратредуктазы записывают в таблицу 12.

Таблица 12

Величины активности нитратредуктазы побегов проростка пшеницы

№ опыта	V_1 , мкМ/мин	V_2 , мкМ/мин	V_0 , мк М/мин	V_0 , мк моль/мин влажной массы
1				
2				
3				
4				

ГЛАВА VI. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА КЛЕТКИ

6.1. Определение активности креатинкиназы

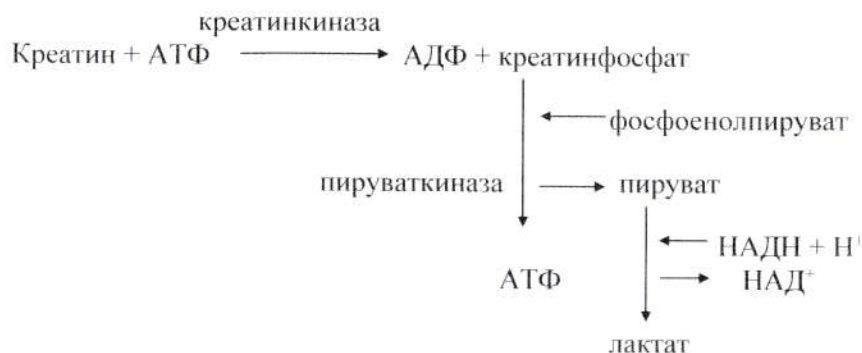
Креатинкиназа – важнейший фермент энергетического обмена клетки, осуществляющий обратимую реакцию переноса фосфатного остатка по следующей схеме:



Данная реакция позволяет резервировать химическую энергию в клетке в состоянии покоя и обеспечивать быстрый синтез молекул АТФ при переходе в активное состояние. С функционированием креатинкиназы тесно связаны такие процессы как энергообеспечение секреции гормонов и нейротрансмиттеров, фагоцитоза, мышечного сокращения, не мышечных форм подвижности, поддержания ионных градиентов, проведения нервного импульса.

Определение активности креатинкиназы в скелетной мускулатуре крыс

Принцип метода. Концентрацию АДФ измеряют в сопряженной с пируваткиназой и лактатдегидрогеназой системе по количеству образовавшегося НАД⁺ по следующей схеме:



Реактивы:

1. 150 ммоль/л глицил-глициновый буфер, pH 7,0.

2. 75 ммоль/л раствор креатина
3. 50 ммоль/л раствор АТФ
4. 100 ммоль/л раствор $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
5. 15 ммоль/л раствор фосфоенолпирувата
6. 10 ммоль/л раствор НАДН
7. Пируваткиназа, лактатдегидрогеназа (коммерческие препараты)
8. 30 ммоль/л раствор дитиотрейтола

Ход работы. В спектрофотометрическую кювету вносят следующие компоненты реакции (конечные концентрации): 50 ммоль/л глицил-глициновый буфер, 25 ммоль/л креатин, 5 ммоль/л АТФ, 10 ммоль/л $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0,1 ммоль/л НАДН, 0,5 ммоль/л фосфоенолпируват, 1 ммоль/л дитиотрейтол, 0,4 ед/мл пируваткиназы, 0,4 ед/мл лактатдегидрогеназы.

1 грамм скелетной мышцы крысы тщательно измельчают ножницами и гомогенизируют на льду в 150 ммоль/л глицил-глициновом буфере, pH 7,0 в течение 2 мин. Полученный гомогенат используют для определения активности креатинкиназы.

Реакцию запускают добавлением исследуемого ферментного препарата. Измеряют уменьшение оптической плотности НАДН при 340 нм в течение 3 минут с интервалом в 30 с. Рассчитывают величину падения оптической плотности за 1 мин. Делают соответствующий вывод об активности фермента в скелетной мускулатуре.

6.2. Определение активности пируваткиназы в скелетной мускулатуре крыс

Принцип метода. Пируваткиназа катализирует последнюю ключевую реакцию гликолиза:



Активность пируваткиназы определяют по образованию пирувата, количество которого измеряют в системе, содержащей лактатдегидрогеназу и НАДН:

пируват, Mg-АДФ
 Фосфоенолпируват → пируват + Mg-АТФ
 ↓ лактатдегидрогеназа, НАДН
 лактат + НАД⁺

Реактивы:

60 ммоль/л Трис-НСl буфер, pH 7,4
 3 моль/л раствор KCl
 0,3 моль/л раствор MgCl₂
 60 ммоль/л раствор АДФ
 24 ммоль/л раствор фосфоенолпирувата
 5 ммоль/л раствор НАДН
 Лактатдегидрогеназа (коммерческий препарат)
 Пируваткиназа (растворимая клеточная фракция)

Ход работы: Получение растворимой клеточной фракции скелетной мускулатуры крысы.

5 г скелетной мускулатуры задних конечностей крысы помещают в ледяную среду выделения. После охлаждения ткань обсушивают фильтровальной бумагой, переносят в чашку Петри, стоящую на льду, очищают от жира и соединительной ткани, измельчают ножницами и гомогенизируют в 6-кратном по отношению к весу ткани объеме среды выделения.

Тканевой гомогенат центрифугируют при 15000g в течение 20 мин. Супернатант фильтруют через 4 слоя марли и разводят средой выделения 1:200.

В спектрофотометрическую кювету вносят компоненты реакционной смеси до следующих конечных концентраций: 50 ммоль/л Трис-НСl, pH 7,4, 100 ммоль/л KCl, 6 ммоль/л MgCl₂, 3 ммоль/л АДФ, 0,8 ммоль/л фосфоенолпируват, 0,1 ммоль/л НАДН, 1 ед/мл лактатдегидрогеназы, 0,04 мл растворимой клеточной фракции.

Реакцию начинают добавлением 24 ммоль/л раствора фосфоенолпирувата.

Регистрируют уменьшение оптической плотности при 340 нм в течение 3 мин, каждые 30 сек. Активность фермента выражают в микромолях окисленного НАД⁺ за 1 мин.

6.3. Измерение активности сукцинатдегидрогеназы в митохондриях печени крыс

Принцип метода. Сукцинатдегидрогеназа — важнейший фермент цикла Кребса, обеспечивающий превращение янтарной кислоты (сукцинат) в фумаровую кислоту. Метод определения активности данного фермента основан на восстановлении солей тетразолия при ферментативном переносе H⁺ от субстрата на соли тетразолия через ФАД⁺- фермента. Особенностью тетразолия является его способность легко восстанавливаться, образуя ярко окрашенные, растворимые в воде, но нерастворимые в ацетоне соединения — формазаны.

Реактивы:

1. 0,2 моль/л раствор хлорида магния
2. 33 мкмоль/л раствор АТФ
3. 0,2 моль/л фосфатный буфер (pH 8,0)
4. 0,1 % раствор нитротетразолиевого синего в этаноле
5. Ацетон
6. 66 мкмоль/л раствор сукцината натрия
7. Среда инкубации: 0,2 мл 0,2 моль/л раствора хлорида магния, 0,2 мл раствора АТФ, 0,4 мл фосфатного буфера (pH 8,0).

Ход работы.

Выделение митохондрий печени крыс.

Изолированную печень промывают в охлажденной среде выделения (0,25 моль/л раствор сахарозы, содержащий 0,01 моль/л раствор ЭДТА), измельчают ножницами в чашке Петри, стоящей во льду. В гомогенизатор переносят 1 г измельченной ткани, добавляют 9 мл охлажденной среды выделения и гомогенизируют в течение 1 мин.

Гомогенат центрифугируют в течение 10 мин при 600 g для удаления обломков клеток и ядерной фракции. Полученный супернатант центрифугируют при 14000 g в течение 10 мин. Осевшую митохондриальную фракцию суспендируют в 0,25 моль/л растворе сахарозы, не содержащем ЭДТА, и вновь центрифугируют (14000 g, 10 мин). Супернатант сливают, на полученный осадок митохондрий осторожно наслаивают 0,3 мл

0,25 моль/л раствора сахарозы. Легким движением смывают верхний рыхлый слой осадка.

Процедуру повторяют еще дважды, и полученный плотный осадок митохондрий тщательно суспендируют с помощью пипетки в 0,5 мл 0,25 моль/л раствора сахарозы.

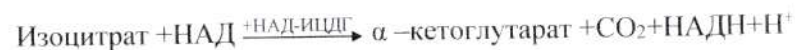
К 0,8 мл среды инкубации добавить 0,2 мл суспензии митохондрий.

Преинкубировать систему 10 мин при 37 °С. Запустить реакцию добавлением 0,1 мл раствора сукцината натрия. Добавить 0,4 мл 0,1% раствора нитротетразолиевого синего и инкубировать пробы 30 мин при 37 °С.

Реакцию останавливают добавлением 3,5 мл ацетона. Осадок удаляют центрифугированием при 3000 об/мин 10 мин. Измеряют величину оптической плотности раствора при 540 нм. Активность фермента СДГ выражается в нмоль/мин на 1 мг белка.

6.4. Определение активности НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы

НАД-изоцитратдегидрогеназы (НАД- Дз-изоцитрат: НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.41; НАД - ИЦДГ) является одним из наиболее интересных ферментов цикла трикарбоновых кислот. Она катализирует необратимую реакцию окисления изоцитрата сопровождающуюся декарбоксилированием и образованием α - кетоглутарата:



Аналогичный процесс окисления до α -кетоглутарат и CO_2 но обратимый, катализирует НАДФ - специфичная изоцитратдегидрогеназа.

НАД - ИЦДГ локализована исключительно в митохондриях и часто используется как маркерный фермент этих субклеточных частиц. Фермент имеет довольно сложное строение, молекулярная масса его около 340 тыс. Молекула состоит из субъединиц 4 из них способны связывать НАДН (аллостерический ингибитор), а 4 другие НАДФН, который потенцирует действие НАДН. субстратом реакции является активный комплекс трео - O_2 -изоцитрата с ионом Mn^{2+} .

Важной особенностью регуляции активности НАД - ИЦДГ является контроль со стороны адениновых нуклеотидов. если в тканях животных АДФ аллостерически активирует фермент, снижая величину K_m для изоцитрата, то АТФ напротив, является ингибитором фермента, конкурентным по отношению к НАД. Таким образом, скорость НАД-изоцитратдегидрогеназной реакции в тканях контролируется соотношением между высок- и низко - энергетическими компонентами аденин нуклеотидного пула АДФ, кроме того, вызывает значительное повышение стабильности фермента *in vitro*, что имеет определенное методическое значение.

Основная функция НАД - ИЦДГ в клетке-участие в энергетическом обмене, образующийся в ходе реакции восстановленный НАД передается непосредственно в дыхательную цепь митохондрий. Окисление изоцитрата, катализируемое НАД - ИЦДГ, как и цитратсинтезная реакция, относится к наиболее медленным этапам ЦТК и может лимитировать общую скорость потока метаболитов через цикл.

В основу определения активности НАД - ИЦДГ положены методы, предложения Гебеллом и Клингенбергом (1964) и Глаутом (1969).

Принципы метода. Об активности НАД-изоцитратдегидрогеназы судят по скорости окисления изолимонной кислоты (уравнение реакции приведено выше), которое сопровождается восстановлением эквимольных количеств НАД⁺. Увеличение количества восстановленной формы НАД в инкубационной среде регистрируется спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Реактивы:

1. Солевая среда для выделения митохондрий - 0,145М раствор KCl и 0,0033М раствор KHCO_3 , pH 7,4 (готовят накануне опыта).

2. Среда для солемобилизации фермента. Для это необходимо приготовить три раствора:

А - 0,6%-ный раствор тритона X-100 в 30 мМ растворе Na_2HPO_4 (pH 7,2);

Б - 22,5%-ный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;

В - 1,5 мМ раствор MnCl_2 на 30%-ном глицерине.

Непосредственно перед использованием сливают равные объемы растворов А,Б,В.

3. Инкубационная среда для проведения ферментативной реакции общим объемом 2,9 мг содержит следующие компоненты (в мкмольях):

Буфер трис-HCl, pH 7,2	- 100
MnCl ₂	- 4
АДФ	- 2
НАД	- 1
Изоцитрат натрия	- 16

Среду готовят непосредственно перед использованием.

Ход определения. Выделяют митохондрии из 0,1-1,0 г исследуемой ткани в солевой среде обычным методом дифференциального центрифугирования. Применение сахарозной среды для выделения митохондрий из тканей дает худшие результаты, затрудняя спектрофотометрирование из-за образования сильной муты в кювете.

К осадку митохондрий добавляют среду для самобилизации фермента из расчета 2 мл среды на митохондрии, выделенные из 1 г печени, сердца, почек, 4 мл-на митохондрии из 1 г мозга. Осадок митохондрий вместе со средой солиобилизации количественно переносят в маленький стеклянный гомогенизатор и суспендируют вручную. Для разрушения митохондрий пробу оставляют на 25-3-мин во льду. Такой способ разрушения митохондрий при определении активности НАД – ИЦДГ предложен японскими исследователями Ватанобой и соавт. (Watanabe e.a., 1974. Watanabe T., Yoto H., Ogasawa N. – Biochem. Biophys. Acta, 1974, vol. 358, p.340-346), которые показали, что присутствие в смеси наряду с обычным детергентом тритоном X-100 дополнительных компонентов (сульфат аммония, глицерин) стабилизирует структуру НАД – изоцитратдегидрогеназы после разрушения митохондрий.

Для проведения ферментативной реакции в кювету спектрофотометра шириной 1 см наливают 2,9 мл инкубационной среды. Реакцию начинают внесением в кювету 0,1 мг митохондриального препарата; первое считывание показаний спектрофотометра при длине волны 340 нм проводят точно через 20с после внесения препарата. Затем показания прибора регистрируют в течение 1 мин через каждые 15с.

Для расчета активности НАД – изоцитратдегидрогеназы используют изменение оптической плотности (ΔE) в интервале между 15-й и 30-й секундами от начала измерения. Активность (в нмольях НАДН/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле:

$$X = 4 \Delta E V / 6,22 a,$$

где, 4 ΔE – изменение оптической плотности пробы за 1 мин;

V – объем пробы в кювете (3мл);

6,22 – коэффициент микромолярной экстинкция восстановленной формы пиридиновых нуклеотидов при длине волны 340 нм;

a – количество белка в пробе (в мг), определенное параллельно в том же препарате митохондрий по методу Лоури.

Описанный метод определения активности НАД – ИЦДГ высоко специфичен, чувствителен и дает возможность определить активность фермента в 0,5-1,0 мг митохондриального белка. Следует, однако, учесть, что после разрушения митохондрий фермент быстро инактивируется, поэтому ферментативную реакцию в кювете спектрофотометра следует проводить как можно скорее после получения препарата.

Среднее значение активности НАД – изоцитратдегидрогеназы (из 20-25 определений) в митохондриях различных тканей крыс представлены ниже (в мольях НАДН/мин на 1 мг белка):

Кора больших полушарий	- 50,74 $\pm$ 3,63
Стволовая часть мозга	- 43,45 $\pm$ 2,21
Печень	- 11,80 $\pm$ 2,16
Почки	- 13,83 $\pm$ 3,07
Сердце	- 28,20 $\pm$ 5,30

6.5. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы

Принцип метода.

НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДФ-ИДГ) (изоцитрат: НАДФ-оксидоредуктаза декарбоксилирующая, КФ 1.1.1.42) катализирует обратимую реакцию окислительного декарбоксилирования изолимонной кислоты, в ходе которой образуется α -кетоглутарат, CO₂ и восстановленная форма НАДФ – НАДФН:



Константа равновесия реакции, катализируемой НАДФ-ИДГ в среднем равна 1, но в физиологических условиях равновесие в большинстве случаев сдвинуто в сторону образования кетокислоты.

Молекулярная масса мНАДФ ИДГ 58 кДа, фермент состоит из одной полипептидной цепи. Молекулярная масса цитНАДФ ИДГ выше, чем у митохондриальной, она равна, по данным разных авторов, от 75 до 96 кДа. Фермент состоит из 2 субъединиц. Фермент локализован как в митохондриальной, так и цитоплазматической фракциях клеток. У взрослых животных в органах с активно протекающими биосинтетическими процессами (печень, жировая ткань) значительная часть (70 – 80 %) активности НАДФ-ИДГ сосредоточена во внемитохондриальной фракции. В головном мозгу новорожденных животных в период интенсивной миелинизации, которая характеризуется активными биосинтетическими процессами, значительная часть изоцитрата окисляется с помощью НАДФ-ИДГ, локализованной в цитоплазме. В ходе постнатального развития животного активность НАДФ-ИДГ в цитоплазме клеток мозга уменьшается и достигает значений, как у взрослых особей.

В митохондриях печени около 8 – 10% от общего содержания изоцитрата подвергается окислительному превращению с помощью НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы. Для протекания НАДФ-ИДГ реакции необходимы ионы Mg^{++} или Mn^{++} , поскольку истинным субстратом реакции является комплекс двухвалентного катиона с недиссоциированным изоцитратом (в отличие от НАД-ИДГ, где активной формой является изоцитрат—). Активность фермента обусловлена наличием сульфгидрильных групп, причем, из 5 SH-групп только 2 связаны с активностью фермента, одна из них находится в активном центре, а другая необходима для поддержания активной конформации фермента. НАДФ-зависимая ИДГ ингибируется НАДН, АТФ и высокими концентрациями НАДФН.

Принцип метода. В процессе окислительного превращения изолимонной кислоты до α -кетоглутаровой происходит восстановление НАДФ; количество восстановленного НАДФ эквивалентно количеству окисленного изоцитрата.

Изменение содержания НАДФН регистрируется на спектрофотометре при длине волны 340 нм.

Реактивы:

1. 0,1 М трис-НСl-буфер, pH 7,4.
2. 0,02 М $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$.
3. 0,003 М НАДФ
4. 0,08 Мр-р D,L-изоцитрат Na.

Оборудование: Спектрофотометр СФ-46 (ЛОМО), автоматические пипетки объемом 10-100 мкл и 200-1000 мкл, пробирки, спектрофотометрические кюветы, весы аналитические

Ход работы

Навески НАДФ и изоцитрата растворяют перед приготовлением инкубационной среды. В пробу вносят компоненты инкубационной среды, которые заранее смешивают в указанных пропорциях в объеме, зависящем от количества проб.

1. трис-НСl	- 1,5 мл
2. Mn^{++}	- 0,5 мл
3. НАДФ	- 0,5 мл
4. D,Лизорат	- 0,1 мл
5. H_2O	- 0,3 мл

В кювету вносят по 2,9 мл готовой инкубационной среды, затем, не вынимая кювету из прибора, добавляют 0,1 мл суспензии митохондрий или цитоплазмы, перемешивают. Реакцию начинают внесением препарата, содержащего фермент (0,1 мл цитоплазмы либо суспензии митохондрий).

Изменение оптической плотности раствора в результате восстановления НАДФ регистрируют в течение 3-5 мин с интервалом в 1 мин

Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{\Delta E \cdot 3 \cdot 1000}{6,22 \cdot b}$$

где ΔE – изменение оптической плотности за 1 мин;

3 – объем исследуемой пробы;

1000 – коэффициент перевода микромолей в наномоли;

b – содержание белка в исследуемом образце, мг;

6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции НАДФН ($\text{мМ}^{-1} \text{см}^{-1}$).

6.6. Определение активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы

НАД-зависимая малатдегидрогеназа (НАД - МДГ) (L-малат: НАД- оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.37) катализирует реакцию окисления яблочной кислоты до шавелевоуксусной: $\text{малат} + \text{НАД}^+ \leftrightarrow \text{оксалоацетат} + \text{НАДН} + \text{H}^+$

Реакция обратима.

Фермент локализован как в митохондриальной, так и в цитоплазматической фракциях клеток. Как митохондриальная, так и цитоплазматическая формы НАД-МДГ отличаются по свойствам. Митохондриальная НАД-МДГ имеет более низкую молекулярную массу: 62-65 кДа, цитоплазматическая - около 72 кДа. Обе изоформы фермента состоят из 2 субъединиц.

Отличительной особенностью митохондриальной НАД - МДГ от цитоплазматической формы фермента является субстратное ингибирование его при восстановлении оксалоацетата. Зависимость скорости восстановления кетокислоты от ее концентрации имеет четкий оптимум 0,9 - 1,0-10 ~4 М. В то же время по мере роста концентрации малата, наблюдается субстратная активация фермента из митохондрий. По стереоспецифичности мМДГ относится к дегидрогеназам типа А.

Механизм действия фермента последовательный, принудительно упорядоченный без кинетически значимых тройных комплексов в обеих направлениях реакции. Первым к энзиму присоединяется кофермент, затем субстрат с немедленным образованием и отделением продукта. Последним этапом, который лимитирует скорость всей реакции, является отщепление кофермента.

При электрофорезе обе изоформы НАД - МДГ дают несколько полос с малатдегидрогеназной активностью; количество и соотношение их различно в разных тканях и изменяется при различных воздействиях на организм.

Роль НАД - зависимой малатдегидрогеназы в животных тканях полифункциональна.

Митохондриальная изоформа энзима, катализируя один из этапов ЦТК, участвует в поддержании энергетического баланса, поставляя восстановленную форму пиридиннуклеотида в дыхательную цепь митохондрий. Вторая важная функция системы

из митохондриальной и цитоплазматической форм НАД - МДГ - участие в начальных этапах глюконеогенеза, которая выражается в обеспечении субстратом фосфоенолпируваткарбоксилазной реакции. Еще одна роль малатдегидрогеназы - участие фермента в переносе восстановительных эквивалентов через митохондриальную мембрану. Осуществление этой функции возможно благодаря высокой активности обеих изоформ фермента и эффективному транспорту малата через мембрану митохондрий. Функционирование «малатного челнока» является одним из основных механизмов, регулирующих соотношение окисленных и восстановленных форм НАД в митохондриальном и цитозольном компартментах клетки. Соотношение между степенью восстановленности пиридиновых нуклеотидов и концентрацией ЦУК контролирует скорость лимитирующего этапа ЦТК - цитратсинтазную реакцию.

Исходя из вышесказанного, изучение НАД - МДГ реакций в различных компартментах клетки представляет значительный интерес.

Задание 1. Определение активности НАД - зависимой малатдегидрогеназы (прямая реакция)

Принцип метода. Определение активности НАД - МДГ в субклеточных фракциях проводят, используя прямую малатдегидрогеназную реакцию, в которой количество окисленного малата эквивалентно количеству восстановленного пиридиннуклеотида. Спектры поглощения восстановленной и окисленной форм пиридиновых нуклеотидов существенно отличаются: спектр поглощения НАД⁺ имеет максимум при длине волны 260 нм, спектр поглощения НДР 340 нм. Таким образом, метод сводится к количественному определению образовавшегося восстановленного никотинамидадениндинуклеотида. Для этого регистрируют изменение оптической плотности реакционной смеси при 340 нм. Проведение ферментатической реакции в щелочной среде способствует сдвигу равновесия в сторону окисления яблочной кислоты.

Реактивы:

1. Na-глициновый -85 мМ, рН 10,0

буфер -85 мМ

2. D, L-малат -25 мМ

4. 0,1 % раствор детергента тритона X - 100 (готовят перед использованием разводя средой выделения субклеточных фракций более концентрированный (1%-й) раствор детергента, хранящийся в холодильнике).

5. Среда для выделения субклеточных фракции - 0,25 М раствор сахарозы содержащей 1 мМ ЭДТА (pH 7,4); возможно использование и других сред выделения; реактив готовят накануне эксперимента и хранят в холодильнике.

Оборудование: Спектрофотометр СФ - 46 (ЛОМО), автоматические пипетки объемом 10 -100 мкл и 200 -1000 мкл, пробирки, спектрофотометрические кюветы, весы аналитические.

Ход работы:

Выделение субклеточных фракций (митохондриальной и цитоплазматической) проводят методом дифференциального центрифугирования. После выделения и отмывки осадок митохондрий ресуспендировали в среде выделения из расчета 1 мл среды на осадок выделенный из 1 г ткани.

Суспензию митохондрий обрабатывают детергентом «Тритон X-100» добавляя 0,1 %-й р-р из расчета 2 мл на осадок митохондрии, выделенный из 1 г ткани. Пробу оставляют на 30 мин во льду.

Перед спектрофотометрированием суспензию митохондрий разводят и для анализа активности цитоплазматической формы НАД МДГ использовали надосадочную жидкость, которую также разводили. Степень разведения определялась активностью фермента в исследуемой ткани и устанавливалась опытным путем в предварительном эксперименте.

Для проведения энзиматической реакции в кювету спектрофотометра вносят 2,9 мл среды инкубации:

1. Na-глициновый буфер, pH 10,0 - 1,0 мл
2. D, L-малат натрия - 1,0 мл
3. НАД - 0,1 мл
4. H₂O - 0,8 мл

Реакцию начинают добавлением 0,1 мл тканевого препарата (разведенная суспензия митохондрий или над осадочная жидкость).

Оптическую плотность измеряют при длине волны 340 нм, считывая показания через 1 мин в течение 3-5 мин.

Активность фермента рассчитывают по формуле.

$$A = \frac{\Delta E \cdot V}{6,22 \cdot b}$$

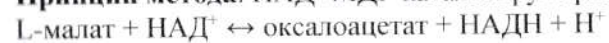
где, ΔE изменение оптической плотности пробы за 1 минуту;
V- конечный объем пробы в кювете (3 0 мл);

6,22 — коэффициент миллимолярной экстинкции восстановленной формы пиридиннуклеотидов при длине волны равной 340 нм;

b — количество белка в пробе (в мг), определенное параллельно в том же тканевом препарате по методу Лоури.

Задание 2. Определение активности НАД — зависимой малатдегидрогеназы (обратная связь).

Принцип метода. НАД+МДГ катализирует реакцию:



Равновесие которой при нейтральном значении pH сдвинуто влево. Об активности фермента судят по изменению количества восстановленной формы пиридиннуклеотида, которое эквивалентно количеству оксалоацетата, использованного в реакции.

Т.к. оксалоацетат в водном растворе нестабилен и может частично превращаться в пируват, его готовят непосредственно перед внесением в кювету.

Реактивы: 0,15 М фосфатный буфер pH 7,4; 0,006 М НАДН, взвесь митохондрий, 0,01 М оксалоацетат.

Оборудование: Спектрофотометр СФ — 46 (ЛОМО) автоматические пипетки объемом 10-100 мкл и 200 — 1000 мкл, пробирки, спектрофотометрические кюветы, весы аналитические.

Ход работы

Инкубационная среда для определения активности НАД - МДГ содержит следующие компоненты- содержат следующие компоненты

- | | |
|----------------------------------|-------|
| 1. 0,15 М фосфатный буфер pH 7,4 | - 2,5 |
| 2. 0,006 М НАДН | - 0,2 |
| 3. Взвесь митохондрий | - 0,2 |

Суспензию митохондрий готовят из расчета 1 мл 0,25М сахарозы на осадок митохондрий из 1 г ткани и непосредственно используют.

Пробирки, содержащие инкубационную смесь, преинкубируют 20 мин при температуре 25°C. затем содержимое переносят в кювету и измеряют исходную величину оптической

плотности E_1 . Реакцию начинают внесением 0,1 мл 0,01 М оксалоацетата. Изменение величины оптической плотности регистрируют по уменьшению оптической плотности через 1 мин в течение 3-5 мин. Активность фермента рассчитывают в наномолях НАДФ • мин⁻¹ • мг⁻¹ белка по формуле:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V}{6,22 \cdot b}$$

где, ΔE изменение оптической плотности пробы за 1 минуту;

V- конечный объем пробы в кювете (3 0 мл);

6,22 – коэффициент миллимолярной экстинкции НАДФН при длине волны 340 нм;

1000 - коэффициент перевода микромолей в наномоли;

b – содержание белка в исследуемой пробе мг.

6.7.Определение активности НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы

Известно, что малатдегидрогеназа катализируют реакцию окисления малата с образованием оксалоацетата.

В реакции качестве кофермента участвуют НАДФ. Реакция протекает при нейтральной pH среде.

Оборудование: спектрофотометр; ФЭК; центрифуга; гомогенизатор; pH-метр; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы шириной 1см; пипетки на 0,1мл – 3шт, на 0,2мл – 1шт, на 5мл – 1шт; колба на 500мл – 3шт.

Материалы и реактивы: препарат митохондрий; 0,1М трис- HCl буферного раствора, pH 7,2; 89,4мМ раствор малата натрия; 2,4мМ НАДФ; 44,9мМ раствор MgSO₄.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1М растворы триас и HCl на pH-метре до pH 7,2. Растворы малата натрия (13,9мг/мл), MgSO₄ (5,4мг/мл) и НАДФ (1,8мг/мл) готовят; растворяя навески в H₂O.

Выделение МДГ. Осадок митохондрии обрабатывают детергентом тритоном X-100, добавляя 2,0мл 0,1%-ного раствора к осадку митохондрий, выделенных 1г тканей. Суспензию разводят 20мин при 7000g. осадок отбрасывают, а супернатант 20 мин при

7000g. Осадок отбрасывают, а супернатант используют в дальнейших исследованиях.

Ход работы. В начале измеряют фоновую реакцию, которая обусловлена активностью присутствующих в супернатанте посторонних дегидрогеназ. Для этого в кювету вносят 2,1 мл 0,1М трис- HCl буфера, 0,1 мл 44,9 мМ раствора MgSO₄, 0,1 мл 2,4мМ раствора НАДФ и после перемешивания растворов в кювете добавляют 0,2 мл супернатанта. Реакцию регламентируют с помощью спектрофотометра при 340 нм ($E=6,22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$), записывая изменения светопоглощения (D_1) в течение 1 мин с интервалами 15-20с.

Затем измеряют активность МДГ, внося в кювету 2,0мл буфера, 0,1мл 89,4мМ раствора малата натрия, 0,1мл 44,9мМ раствора MgSO₄, 0,1мл 2,4мМ раствора НАДФ.

После перемешивания смеси в кювете реакцию инициируют внесением 0,2мл супернатанта. Записывают инициируют внесением 0,2мл супернатанта. Записывают изменения светопоглощения (D_2) при 340нм, как описано выше. Полученные результаты измерений записывают в таблицу.

За меру активности фермента принимали количество микромолей НАДФ, восстановленного за 1 мин.

Метод расчета. Активность ферментов МДГ (мкмоль/мин на 1мг белка) вычисляют по формуле:

$$A = \frac{\Delta D \times V}{6,22 \times t \times a}$$

Где, ΔD – величина светопоглощения ($D_1 - D_2$), усл.ед.;

V- конечный объем пробы в кювете, мл;

6,22- коэффициент микромолярного светопоглощения НАДФН при 340нм;

t- время реакции, мин;

a- количество белка в пробе, определенной в суспензии митохондрий, мг

Таблица 13

Величина светопоглощения НАДФН от времени протекания реакции окисления малата натрия в присутствии малатдегидрогеназы

Измерения	Время реакции, t, с	Светопоглощение D, усл.ед.
1		
2		
3		
4		

Оформление работы. Определить активность фермента в супернатанте и в исследуемой навеске раскрыть роль МДГ в метаболизме клеток растений и животных

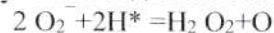
ГЛАВА 7. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы, глутатионредуктаза и т.д. за счет наличия баланса антиоксидантов и прооксидантов в тканях поддерживается нормальный гомеостаз живых организмов, в которых физиологически обусловлена генерация свободных радикалов т.е., активных форм кислорода: O_2 , O_2^- , H_2O_2 , $OH^\cdot$

Ферментативные антиоксиданты

Энергетическое жизнеобеспечение клеток млекопитающих поддерживается -довольно сложным комплексом процессов главное место которых принадлежит окислительным реакциям с вовлечением молекулярного кислорода как основного окислителя или акцептора электронов. Несмотря на высокую специфичность таких реакций, как окислительное фосфорилирование в митохондриях клеток или микросомальные реакции с участием монооксигеназа многочисленные данные свидетельствуют о том, что во всех реакциях с участием металлопротеинов и молекулярного кислорода наблюдается образование элементоорганических форм неполного восстановления кислорода (O_2^- , H_2O_2 , $OH^\cdot$, O_2), а также продуктов окислительных реакций; органических перекисной диеновых конъюгатов, альдегидов и кетонов. В процессе в клетках для защиты от АКМ выработались специализированные системы ферментативных антиоксидантов, к которым относятся супероксидредуктаза (SOD), восстанавливающая O_2^- в перекись водорода, СОД, катализирующая реакцию дисмутации O_2^- с образованием перекиси водорода и молекулярного кислорода, каталаза, восстанавливающая H_2O_2 , глутатионзависимые пероксидазы трансферазы удаляющие органические перекиси. Ферментативные антиоксиданты характеризуется высокой специфичностью действия, направленного против определённых форм АКМ; специфичностью клеточной и органной локализации, которые зачастую перекрываются комплементарным образом; специфичностью использования металлов в качестве катализаторов, к которым относятся медь, цинк, марганец, железо (часто в составе гема), никель, а также металлоид селен. Особая роль в защите клеток млекопитающих от окислительного стресса отводится пероксисома, так как в данных клеточных компонентах,

а довольно больших количествах локализованы четыре ферментативных антиоксиданта, каталаза, Cu, Zn-COD, Mn-COD и глутатионпероксидаза. Важность защитного действия ферментативных антиоксидантов для аэробных организмов подчеркивается фактом токсического действия молекулярного кислорода на облигатные анаэробы, у которых выявляется отсутствие отдельных антиоксидантных ферментов.



и разложения перекиси водорода



Супероксидредуктаза

Недавно охарактеризован ещё один интересный фермент, содержащийся в анаэробных микроорганизмах-Супероксидредуктаза (COP) (КФю 1.15.1.2, донор: супероксидредуктаза). Вначале COP выделяли из бактерий, главным образом сульфатредуцирующих анаэробов, как белок с неизвестной функцией.

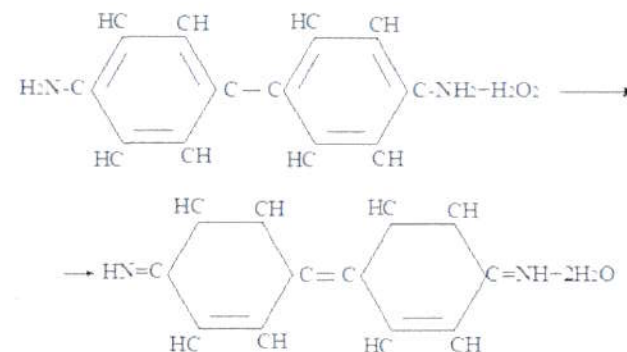
7.1. Определение активности пероксидазы в крови

Пероксидаза представляет собой гемопrotein, химически по своей природе распространенный в тканях животных и растений, и его простетическая группа состоит из порфирина железа. Фермент катализирует реакции окисления ряда органических соединений (фенолов, полифенолов, ароматических аминов) в присутствии перекиси водорода.

Принцип метода. Пероксидаза катализирует реакции окисления бензидина до дифенохинондиимина:

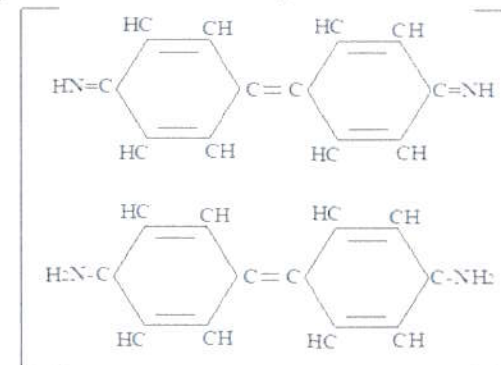
Необходимые инструменты: колбы 25 мл; пипетки; спектрофотометр.

Реактивы. 1. Новая кровь. Разбавлено 1:1000. 2. Раствор 1%-ного бензидина в уксусной кислоте.



Дифенохинондиимин

Молекула дифенохинондиимина конденсируется с молекулой бензидина с образованием синего соединения.



Бензидиновый синий

3. 3%-ный раствор перекиси водорода.
4. 30%-ный раствор гидроксида натрия.
5. Этиловый спирт.
6. 0,01 Н раствор перманганата калия.
7. В колбу на 25 мл добавляют стандартный раствор с 2 мл 1%-ного раствора бензидина, 3 мл 0,01 Н раствора перманганата калия и оставляют на 10 минут, затем добавляют 10 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и доливают спирт до метки колбы. Этот раствор готовят перед определением активности фермента.

Ход работы. В колбу на 25 мл добавляют 2 мл раствора бензидина, 2 мл 3%-ного перекиси водорода и 1 мл разбавленной крови. После встряхивания пробирки через 3 мин добавляют 10 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и снова встряхивают пробирку. Образуется окрашенный осадок, который растворяют в спирте и добавляют спирт к метке колбы. Интенсивность окраски в исследуемых и стандартных растворах измеряют с помощью спектрофотометра.

Активность фермента рассчитывается по следующей формуле.

$$X = \frac{h_2 \cdot 25}{h_1 \cdot 5}$$

Здесь h_1 - эксцентриситет оптической плотности стандартного раствора; h_2 - эксцентриситет оптической плотности исследуемого раствора; 25 - Объем раствора в пробирке, мл; 5 - объем бензидина, перекиси водорода и крови в пробирке, мл.

7.2. Определение активности пероксидазы в растительном материале (по А.Н.Бояркину)

Метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина до образования синего продукта окисления определённой концентрации, заранее устанавливаемой на фотоэлектроколориметре.

Навеску растительного материала массой 200-500 мг тонко растирали в фарфоровой ступке с водой, переносили в мерную колбу на 50 см³ и доводили до метки водой.

После 10 минут настаивания вытяжку центрифугировали при 4000 об/мин. в течении 5 минут. Для измерения активности лучше брать такое разведение вытяжки, чтобы изменение окраски происходило за 20-60 с.

В 2 кварцевые кюветы фотоэлектроколориметра с рабочей длиной 20 мм приливали по 2 см³ ферментной вытяжки или центрифугата, 2 см³ буферного раствора (0,2 н. ацетатный буфер с рН 5,4) и 2 см³ бензидина. Кюветы устанавливали против светофильтров. Измеряют оптическую плотность на фотометре КФК-3 при длине волны, равной 590 нм. Вначале устанавливают

нулевую точку по контрольной кювете, в которую вносили, помимо вышеперечисленных компонентов реакционной смеси, 2 см³ воды. После этого в опытную (измерительную) кювету приливают 2 см³ 0,3%-ной перекиси водорода из пипетки с широким отверстием. С внесением первой капли перекиси водорода включают секундомер. Секундомер останавливают, когда показание оптической плотности доходит до пика.

Пероксидазную активность вычисляли по найденной скорости реакции и выражали в удельных единицах на 1 г белка по формуле:

$A = D(a \cdot b \cdot v) / (c \cdot t)$, где D - оптическая плотность, равная 0,125; a - отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, к массе водорастворимых белков в пробе, см³/г; b - степень дополнительного разведения вытяжки после центрифугирования; v - степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси в кювете; c - толщина слоя (2 см); t - время, с.

7.3. Определение активности каталазы в крови

Каталаза (1.11.1.6) относится к классу оксидоредуктаз.

Катала́за - фермент, который катализирует разложение образующегося в процессе биологического окисления пероксида водорода на воду и молекулярный кислород. Содержится почти во всех организмах. Участвует в тканевом дыхании.

Её молекулярная масса оценивается в 250 кДа. Фермент широко распространён в клетках животных, растений и микроорганизмов. Относится к хромопротеидам, имеющим в качестве простетической (небелковой) группы окисленный гем.

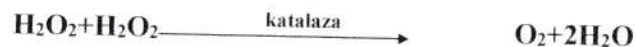
В процессе окисления ряда веществ при дыхании живой клетки образуется пероксид водорода:



где, AH_2 — восстановленный субстрат; A — окисленный субстрат.

Пероксид водорода в повышенных концентрациях оказывает токсическое действие на цитоплазму клеток.

Роль каталазы заключается в том, что она защищает организм от вредного влияния пероксида водорода, образующегося при дыхании. Это происходит в соответствии с уравнением



Таким образом, фермент окисляет одну молекулу пероксида водорода с одновременным восстановлением второй молекулы пероксида водорода до воды. Вместо пероксида водорода фермент может использовать в качестве субстрата и органические пероксиды.

Принцип метода. Об активности фермента судят по скорости убыли перекиси водорода в среде инкубации. Концентрацию перекиси водорода определяют по реакции с молибдатом аммония, который дает стойкий окрашенный комплекс.

Оборудование. Центрифуга с охлаждением, магнитная мешалка, термостат.

Реактивы и их приготовление. Все реактивы готовят на бидистиллированной воде.

1. 0,9 %-ный раствор хлорида натрия.
2. 4 %-ный раствор молибдата аммония (х. ч.). В воде в мерной колбе на 100 мл при нагревании растворяют 4 г молибдата аммония. При комнатной температуре раствор устойчив в течение нескольких недель.
3. 0,1 н. раствор перманганата калия. Готовится из фиксанала.
4. 10 %-ный раствор серной кислоты. 5,99 мл 91,6 %-ной кислоты (плотность 1,822 г/мл) разбавляют до 100 мл водой.
5. Реактивы для определения гемоглобина аммиачным методом.
6. 0,034 %-ный раствор перекиси водорода. Готовят из пергидроля. По мере хранения концентрация пергидроля снижается. Точную концентрацию перекиси водорода определяют титрованием перманганатом калия.

Порядок титрования. Зная приблизительно концентрацию пергидроля (25–30 %), готовят 1 %-ный раствор перекиси водорода. Для чего 1 мл исходной перекиси водорода доводят водой до 25 мл. Берут 1 мл разбавленной (1 %) перекиси водорода, добавляют 9 мл воды и 5 мл 10 %-ной серной кислоты. Титруют 0,1 н. раствором перманганата калия до слабо розового окрашивания.

Примерный пересчет. Допустим, на титрование ушло 5,8 мл перманганата калия. Вычисляют, сколько г-экв перманганата калия содержалось в 5,8 мл и участвовало в реакции:

$$1\,000\text{ мл} - 0,1\text{ г-экв}$$

$$5,8\text{ мл} - x\text{ г-экв}$$

$$x = 0,00058.$$

При титровании 1 г-экв вещества взаимодействует с 1 г-экв другого вещества. Значит, в реакции участвовало также 0,00058 г-экв перекиси водорода. Эквивалентная масса H_2O_2 равна 17,01 г. Следовательно, анализируемый раствор содержит: $0,00058 \cdot 17,01 = 0,00987\text{ г H}_2\text{O}_2$.

Учитывая разведение, концентрация перекиси водорода в 1 мл пергидроля будет: $0,00987 \cdot 25 = 0,2468\text{ г}$, а концентрация исходного раствора – 24,68 %.

Ход определения. Перед работой полученный 10 %-ный гемоллизат разбавляют 25 раз (0,1 мл гемоллизата + 2,4 мл воды) и используют в качестве источника фермента.

Инкубационная среда включает 2 мл 0,034 %-ной перекиси водорода и 0,04–0,05 мл 0,1 %-ного гемоллизата (объем гемоллизата выбирают таким образом, чтобы в пробе содержалось от 20 до 40 мкг гемоглобина). Концентрацию последнего определяют аммиачным методом.

В пробирки разливают по 2 мл перекиси водорода и предварительно инкубируют в течение 5 мин при 25°C. Затем в каждую пробирку вносят по 0,05 мл гемоллизата. В контрольную пробу вместо ферментативного препарата вносят такое же количество воды. Пробы инкубируют в течение 2 мин при 25°C. По истечении времени реакцию останавливают добавлением 1 мл 4 %-ного раствора молибдата аммония.

Оптическую плотность проб измеряют при длине волны 410 нм в кювете с длиной оптического пути 5 мм против воды. Об активности каталазы судят по степени уменьшения оптической плотности в опытных пробах (E_o) по сравнению с контрольной (E_k): $\Delta E = E_k - E_o$.

Активность фермента ($A_{кат}$, мкмоль H_2O_2 /мг Нв/мин) рассчитывают по формуле: определение активности каталазы в крови.

$$A_{кат} = \frac{\Delta E \cdot K}{34 \cdot t \cdot C \cdot 0,001}$$

где, 34 – молекулярная масса перекиси водорода; t – время протекания реакции, мин; c – концентрация гемоглобина в пробе,

мг; K – коэффициент перевода значений оптической плотности в мг перекиси водорода (рассчитывают по калибровочному графику).

Построение калибровочной кривой. Предварительно готовят 0,1 %-ный раствор перекиси водорода. Затем разбавляют его водой, как указано ниже (табл. 14).

Таблица 14

Схема приготовления стандартных растворов перекиси водорода

№ пробирки	0,1 %-ный раствор перекиси водорода, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация перекиси водорода в 5 мл раствора, мг
1	0,25	4,75	0,25
2	0,5	4,50	0,5
3	1,0	4,0	1,0
4	1,5	3,5	1,5
5	2,0	3,0	2,0
6	2,5	2,5	2,5

Из каждой пробирки (№ 1–6) отбирают по 2 мл разбавленного раствора перекиси водорода и переносят в сухие пробирки (№ 1–6). При этом содержание перекиси водорода в пробирках будет: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мг. Затем в каждую пробирку вносят 1 мл 4 %-ного раствора молибдата аммония. Пробу инкубируют при 24 °С 10 мин, а затем оптическую плотность измеряют при длине волны 410 нм против воды. По полученным данным строят калибровочную кривую, которую используют в дальнейшем для расчета активности каталазы.

7.4. Определение активности каталазы в мозге

Принцип метода. Смотри методику определения активности каталазы в крови.

Отбор проб и их хранение. Крыс забивают декапитацией. Вскрывают череп, быстро извлекают головной мозг и переносят в ледяной раствор 0,9 %-ного хлорида натрия. Через 1–2 мин мозг обсушивают фильтровальной бумагой, очищают от сосудистой

оболочки и на холоде отделяют кору больших полушарий головного мозга. Из коры больших полушарий в стеклянном гомогенизаторе готовят 10 %-ный (1 г мозга + 9 мл среды) гомогенат на 0,9 %-ном растворе хлорида натрия. Полученный гомогенат центрифугируют при 3000 об./мин (850 g) в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают и заново центрифугируют при 14000 об./мин в течение 20 мин. Супернатант сливают в охлажденные пробирки и используют в качестве источника фермента.

Оборудование. Низкоскоростная центрифуга с охлаждением, центрифуга на 20 000 об./мин с охлаждением, стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком, термостат, колориметр.

Реактивы и их приготовление.

1. 0,9 %-ный раствор хлорида натрия.
2. 4 %-ный водный раствор молибдата аммония.
3. 0,02 %-ный раствор перекиси водорода.
4. Реактивы для определения белка по методу Лоури.

Ход определения. Инкубационная среда для определения активности фермента включает 0,1 мл исследуемого материала и 2 мл 0,02 %-ной перекиси водорода.

В пробирки разливают по 2 мл перекиси водорода, предварительно прогревают их до 25 °С. Затем в каждую пробирку вносят по 0,1 мл супернатанта. В контрольную пробирку вместо ферментативного препарата вносят 0,1 мл бидистиллированной воды. Пробу инкубируют в течение 10 мин при 25 °С. По истечении времени реакцию останавливают добавлением 1 мл 4 %-ного раствора молибдата аммония. Оптическую плотность проб измеряют при длине волны 410 нм в кювете с длиной оптического пути 5 мм против воды.

Об активности каталазы судят по степени уменьшения оптической плотности в опытных пробах (E_o), по сравнению с контрольной (E_k): $\Delta E = E_k - E_o$.

Активность фермента (мкмоль H_2O_2 /мг белка/мин) рассчитывают по формуле

$$A = \frac{\Delta E \cdot K}{M \cdot t \cdot C}$$

где K – коэффициент пересчета единиц оптической плотности в мг перекиси водорода, рассчитывают по калибровочному графику;

M — молекулярная масса перекиси водорода;
 t — время реакции, мин;
 C — содержание белка в пробе, мг.

7.5. Определение активности каталазы в зерновом сырье

Методика проведения анализов

Принцип метода. Метод определения активности каталазы в исследуемом материале основан на измерении количества оставшегося неразложившимся пероксида водорода, оттитрованным 0,1 М раствором перманганата калия. Реакция протекает следующим образом:



Реактивы

1. Водные экстракты фермента из зернового сырья. Для анализа используют сухие (размолотые) и проросшие семена злаковых растений. Навеску исследуемого образца массой 2 г растирают в фарфоровой ступке с 10 см³ дистиллированной воды, без потерь переносят в мерную колбу на 100 см³, ступку и пестик ополаскивают 20 см³ воды, которую переносят в эту же мерную колбу. Колбу хорошо перемешивают, добавляют 2—3 капли толуола, доводят водой до метки и настаивают 2 ч при комнатной температуре. После настаивания жидкость центрифугируют 15 мин при 4000 об/мин и в центрифугате определяют активность каталазы.

2. Свежеприготовленный 1%-й раствор пероксида водорода.

3. 10%-й раствор серной кислоты (на 1 дм³ раствора берут 61 см³ концентрированной серной кислоты удельным весом 1,84).

4. 0,1 М раствор KMnO_4 (3,16 г KMnO_4 довести в мерной колбе на 1 дм³ дистиллированной водой до метки).

5. Дистиллированная вода.

Приборы и оборудование:

- 1) колбы конические термостойкие на 100 см³;
- 2) цилиндры мерные на 25 и 10 см³;
- 3) бюретка;
- 4) электроплитка.

Ход определения. Из центрифугатов, полученных после настаивания навески, отбирают по две пробы по 20 мл — опытную и контрольную. В контрольных колбах учитывают количество пероксида водорода, которое присутствует в инкубационной смеси и не подвергается действию каталазы. Для ингибирования фермента контрольные колбы кипятят 5 мин на электроплитке.

К опытной и прокипяченной контрольной колбам прибавляют по 20 мл дистиллированной воды, по 3 мл 1%-го раствора пероксида водорода и оставляют на 30 мин при комнатной температуре.

Через 30 мин к колбам прибавляют по 5 мл 10%-го раствора серной кислоты для инкубации фермента и оттитровывают оставшийся пероксид водорода 0,1 М раствором перманганата калия.

Об активности каталазы судят по количеству миллиграммов пероксида водорода, которое разрушилось в течение 30 мин ферментом, содержащимся в 1 г исследуемого материала.

Обработка и обсуждение результатов. Активность каталазы определяют по формуле:

$$A = \frac{1,7(a-b)V_1}{V_2 \cdot m}$$

где, A — активность каталазы, мг H_2O_2 на 1 г навески; a — количество 0,1 М раствора KMnO_4 , израсходованное на титрование контрольной колбы, мл; b — количество 0,1 М раствора KMnO_4 , израсходованное на титрование опытной колбы, мл (1 мл 0,1 М раствора KMnO_4 эквивалентен 1,7 мг H_2O_2); V_1 — объем, в котором растворена взятая для анализа навеска, мл; V_2 — объем раствора, взятый для титрования; m — масса исследуемого образца, г.

7.6. Определение общей активности глутатионредуктазы в тканях животных

Глутатионредуктаза (ГР) (КФ 1,6,4,2) — флавопротеин, восстанавливающий GSH из его дисульфидной формы при участии НАДФН, образующегося в пентозофосфатном пути распада глюкозы:



ГР обладает высокой специфичностью к GSH, однако с низкой скоростью может катализировать восстановление ряда других соединений, содержащих дисульфидную связь, и помимо основной, глутатион – восстанавливающей активности, способна проявлять трансгидрогеназную, электрон-трансферазную активности, хотя и в значительно меньшей степени. Этот фермент широко распространен в тканях животных, где локализован в цитозоле и митохондриях.

Принцип метода. Определение активности глутатионредуктазы основано на изменении скорости окисления НАДФН, измеренной на спектрофотометре при длине волны 340 нм.

Оборудование: весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр.

Реактивы:

1. 0,25 М трис – HCl буфер (М.М. 121,14 г/моль), pH 7,4 : 3,94 г. Трис HCl растворяют в 80 см³ дистиллированной воды, доводят pH до 7,4 добавлением 12 М HCl. Раствор переносят мерную колбу объемом 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Хранить в холодильнике при температуре +4 - +8°C.

2. Осажденные белки ткани отделяют центрифугированием в течение 30 мин при 3000 об/мин при охлаждении. Для определения активности глутатион редуктазы используют цитозольную фракцию.

4. В кювету спектрофотометра вносят реактивы (мл) : 0,25 М трис – HCl, pH 7,4 2,4 мл, 8 мМ ЭДТА 0,1 мл, цитозольная реакция 0,1 мл, 5,3 мМ раствор глутатина 0,5 мл.

5. Реакционную смесь инкубруют при 37°C в течение 5 мин.

6. Реакцию запускают добавлением при перемешивании 0,1 мл 5 мМ НАДФМ, 2,8 мМ раствор ЭДТА (м.м. 292,24 г/моль) : 0,161 г ЭДТА растворяют в 50 см³ дистиллированной воды.

5,3 мМ раствор окисленного глутатиона (м.м. 707,2 г/моль) : 32,3 мг окисленного глутатиона растворяют в 10 см³ буферного раствора.

5 мМ раствор хранят на ледяной бане, используют в течение суток.

Ход работы.

1. Готовят гомогенат 1:10. Для этого навеску ткани 200 мг гомогенизируют в 1,8 см³ холодного 0,25 М трис – HCl буфера (pH 7,4).

2. Гомогенат переливают в центрифужные пробирки и оставляют во льду на 15 мин для полной экстракции и регистрируют изменение оптической плотности (ΔD) в течение 2 мин против воды.

7. Активность ГР рассчитывают, исходя из величины маярного коэффициента экстинкции НАДФН, равного при 340 нм 6220 М⁻¹ x см⁻¹ и выражают в лек моль/мин/г белка или (г ткани).

$$A = \frac{\Delta D \times V}{\Sigma \cdot t \cdot m_{\text{ткани}}} \times 1000 \left(\frac{\text{мкмоль}}{\text{г ткани}} \right)$$

$$A = \frac{\Delta D \times V}{\Sigma \cdot t \cdot m_{\text{ткани}} \cdot C_{\text{белка}}} \times 1000 \left(\frac{\text{мкмоль}}{\text{г белка}} \right)$$

Где, ΔD – изменение оптической плотности пробы в ходе реакции;

V – конечный объем среды;

Σ – коэффициент молярной экстинкции 6220 М⁻¹ x см⁻¹;

t – время инкубации пробы, мин; l – длина кюветы см;

$m_{\text{ткани}}$ – масса ткани в реакционной смеси, г;

$C_{\text{белка}}$ – концентрация, мг/г ткани;

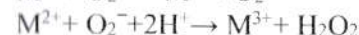
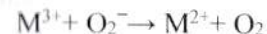
1000 – коэффициент для пересчета на 1 г белка или 1 г ткани

7.7. Определение активности супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутаза (СОД, К.Ф. 1.15.1.1.) относится к группе антиоксидантных ферментов. В месте с каталазой и другими антиоксидантными ферментами она защищает организм человека от постоянно образующихся высокотоксичных кислородных радикалов. Супероксиддисмутаза катализирует дисмутацию супероксид в кислород и пероксид водорода.



Таким образом она играет важнейшую роль в антиоксидантной защите практически всех клеток, так или иначе находящихся в контакте с кислородом.



Существует несколько форм супероксиддисмутаза в зависимости от типа переходного металла кофактора активного центра фермента: Cu, Zn – СОД, Mn – СОД, а также менее распространенные Fe – СОД и Ni – СОД. Изменения концентрации СОД является причиной развития патологических процессов: в первом – вследствие недостаточной защиты от АФК, во второй – в результате усиления цитотоксического действия H_2O_2 , образующейся при дисмутации O_2^- .

Принцип метода. Метод определения общей активности СОД основан на определении степени торможения ферментами реакции аутоокисления кверцетина (3,5,7,3: 4' - пентагидрооксифлавонол). Интенсивное окисление кверцетина происходит в щелочной среде и сопровождается разрушением хромофора с максимальном поглощения при 406 нм и увеличением поглощения при 355 нм. При этом между количеством окисленного кверцетина, определяемым по величине оптической плотности при 406 нм, и длительностью реакции в течение первых 20 мин сохраняется линейная зависимость.

Оборудование: весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр.

Реактивы:

1) 0,25 М трио - HCl буфер: 0,493 г Трис - HCl растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

2) 0,0005 М раствор ЭДТА (М.М. ЭДТА 292,24 г/моль) : 0,0015 г ЭДТА растворяют в 10 мл дистиллированной воды.

3) 5×10^{-5} М раствор кверцетина (м.м. кверцетина 302,24 г/моль): 0,0015 г кверцетина растворяют в 10 мл диметилсульфоксида (ДМСО).

4) 0,02 М калий-натрий фосфатный буфер (КНФБ) pH 8,0 : 0,272 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4) и 0,074 гидроксида натрия переносят в колбу емкостью 100 мл растворяют в дистиллированной воде и доводят объём до метки.

5) ЭДТА+ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин) : к 10 мг раствора ЭДТА добавляют 70 мл ТЕМЕДа.

Ход работы.

1) Навеску ткани гомогенизируют в холодном 0,025 М трис – HCl буфера (pH 7,4) на льду с разведением 1:150 (0,05 г ткани и 7,45 см³ 0,025 М трис - HCl);

2) Гомогенат центрифугируют 30 мин 3000 об/мин при 4°C. Супернатант используют для определения активности СОД.

3) В химические пробирки добавляют реактивы след. в объемах:

а) Контрольная проба:

1. раствор 1:ЭДТА+ТЕМЕД 0,5 мл;

2. КНФБ, pH 7,8 2,5 мл;

3. вода дистиллированная 0,1 мл;

4. раствор кверцетина 0,1 мл.

б) Опытная проба:

1. раствор ЭДТА+ТЕМЕД 0,5 мл;

2. КНФБ, pH 7,8;

3. супернатант 0,1 мл;

4. раствор кверцетина 0,1 мл.

4) Измеряют оптическую плотность при 406 нм против воды.

5) Пробу инкубируют 20 мин при комнатной температуре.

6) Повторно измеряют оптическую плотность при 406 нм против воды.

7) Расчет активности СОД проводят по следующим формулам:

$$\Delta D_k = D_{ko} - D_{k20}$$

$$\Delta D_o = D_{oo} - D_{o20}$$

$$A = \frac{\Delta D_k - \Delta D_o}{\Delta D_k} \times 100$$

Где, D_{ko} – значение оптической плотности после внесения кверцетина в контрольной пробе;

D_{k20} – значение оптической плотности после инкубации в 20 мин в контрольной пробе;

D_{oo} – значение оптической плотности после внесения кверцетина в опытной пробе;

D_{o20} – значение оптической плотности после инкубации в 20 мин в опытной пробе;

A – активность СОД в процентах.

ГЛАВА 8. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКА ФЕРМЕНТОВ

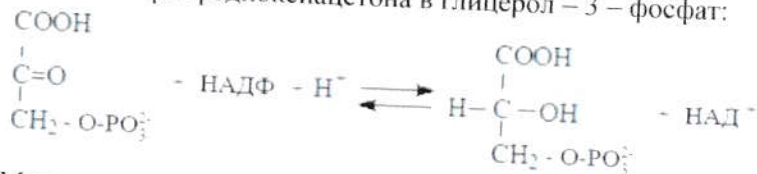
8.1. Получение ферментных препаратов

Для выделения ферментов источником являются различные животные и растительные ткани, а также микроорганизмы.

Ферменты являются белками и легко подвергаются денатурации, все манипуляции при их выделении и очистке следует вести в мягких условиях при температуре не выше $+4^{\circ}\text{C}$, в холодной комнате, ферменты легко инактивируются при значениях pH ниже 5 и выше 9, в процессе их выделения и особенно очистки необходимо тщательно контролировать величину водородного показателя. При получении ферментных препаратов вытяжки из тщательного гомогенизированного биологического материала, содержащего в своем составе соответствующий фермент, обезвреживают тем или иным способом. Одним из наиболее распространенных приемов обезвреживания препаратов с одновременным освобождением их от липидов является получение ацетоновых порошков, для чего вытяжку фермента или тканевой гомогенат обрабатывают охлажденным ($80-20^{\circ}\text{C}$) ацетоном, взятым в большом избытке. Ацетоновые порошки, могут храниться в эксикаторе при 0°C без потери активности в течение длительного времени. Для получения чистых препаратов ферментов широкого используют эффективные методы, на электрофорез, гelfiltrацию через сефадексы, ионнообменную хроматографию и др.

8.2. Выделение глицерол-3-фосфатгидрогеназа из скелетных мышц животных

Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (α -глицерол-3-фосфат: НАД⁺-оксидоредуктаза, КФ 1.1.18) катализирует реакцию восстановления фосфодиоксиацетона в глицерол-3-фосфат:



Молекулярная масса фермента из мышц кролика составляет 78000 Да. Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа угнетает SH-

реагентами, а также ионами тяжелых металлов. Константы Михаэлиса для НАДН-11,9 мкМ, глицерол-3-фосфата-0,18 мМ, НАД⁺-0,012 мМ, фосфодиокси-ацетата-0,2 мМ. АМФ, АДФ, АДФ-рибоза являются коэнзим-конкурентными ингибиторами.

Активность фермента определяют спектрофотометрически, измеряя подавление или нарастание НАДН в ходе реакции.

Реактивы:

1. Трис-НСl буфер-0,1 М раствор, pH 7,8, содержащий 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол.
2. Пирофосфатный-0,05 М раствор, pH 9,0 содержащий 1 мМ ЭДТА и мМ дитиотреитол.
3. Гидрозин 0,6 М раствор.
4. Фосфодиоксиацетон-18 мМ раствор.
5. НАДН-3,6 мМ раствор.
6. НАД⁺-3,6 мМ раствор.

А. Реакция восстановления фосфодиоксиацетона.

В спектрофотометрическую кювету 0,1 М трис-НСl буфер, pH-7,8 (2,5 мл), фосфодиоксиацетон (конечная концентрация-3 мМ) и НАДН (конечная концентрация-0,12 мМ). Объем пробы доводят до 3 мл. Реакцию начинают добавлением 30-50 мл раствора фермента. Измеряют уменьшением поглощения при 340 нм.

Реакция окисления глицерол-3-фосфата

В спектрофотометрическую кювету помещают 0,05 М пирофосфатный буфер pH 9,0 (2,5 мл), гидрозин (конечная концентрация-20 мМ), глицерол-3-фосфат (конечная концентрация-1,8 мМ), НАД⁺ (конечная концентрация-1,2 мМ). Объем пробы доводят до 3 мл. Реакцию начинают добавлением 30-50 мкМ раствора фермента. Измеряют нарастание поглощения при 340 нм. Определение белка проводят спектрофотометрически.

Выделение фермента из скелетных мышц животных

Реактивы:

1. Сульфат аммония, перекристализованный в присутствия ЭДТА (1,5 г/л);
2. Сульфат аммония-1,4 М раствор, pH 5,7.
3. Сульфат аммония-1,9 М раствор, pH 5,7.

Всю работу проводят в холодной комнате. Растворы готовят на бидистиллированной воде, содержащей 5 мМ ЭДТА и 0,2 мМ дитиотреитол, pH 7,0.

Экстракция. Измельченную мышечную массу заливают двойным объемом воды с ЭДТА и экстрагируют в течение 30 мин. Экстракт отделяют центрифугированием (30 мин, 10000g). Экстракцию повторяют, залив мышечную массу половинным объемом воды.

Фракционирование сульфатом аммония. Измеряют объем соединенных экстрактов и начинают медленное добавление мелко измельченного сульфата аммония из расчета 275г/л. При этом достигается концентрация 1,7М. для доведения pH до 5,8 используют разбавленные растворы аммиака с H_2SO_4 . Через 2ч осадок определяют центрифугированием (10 мин, 10000g) и отбрасывают. К супернатанту вновь осторожно добавляют сульфат аммония до конечной концентрации 2,4М (примерно 106г/л). Аморфный осадок белков (фракцию 1,7М-2,4М сульфата аммония) отделяют центрифугированием (15 мин, 10000g). Эта фракция содержит альфолазу, глицерол-3-фосфатдегидрогеназу, пируваткиназу и лактатдегидрогеназу. Влажный осадок растворяют в полуторакратном по объему количестве воды с ЭДТА, что снижает концентрацию сульфата аммония приблизительно до 0,8М. к раствору белка (65мг/мл) медленно добавляют сухой сульфат аммония до достижения последнего 1,4 pH доводят до 6,1.

При стоянии в течение ночи образуются кристаллы, которые отделяют центрифугированием (20 мин, 10000g). К супернатанту, содержащему сульфат аммония в концентрации 1,4М медленно добавляют сульфат аммония до 1,75М концентрации (доводят аммиаком до pH 6,1). Кристаллизация альдолазы происходит в течение 24-36ч.

Кристаллы отделяют центрифугированием, когда в супернатанте остается меньше 25% альдолазной активности. Чем полнее отделена альдолаза, тем лучше удается выделение глицерол-3-фосфатдегидрогеназы. Если глицерол-3-фосфатдегидрогеназа начинает кристаллизоваться на этом этапе, нужно быстро и на малой скорости от центрифугировать осадок альдолазы так, чтобы более легкие кристаллы дегидрогеназы остались в супернатанте. Контроль за формой кристаллов осуществляют с помощью микроскопа.

Кристаллизация. К раствору, содержащему глицерол-3-фосфатдегидрогеназу (фракция 1,82М сульфат аммония, pH 6,1-6,2) добавляют медленно, в течение трех дней, сухой сульфат аммония до повышения его молярности до 2,0М.

Появляются кристаллы с шелковистым блеском. Их отделяют центрифугированием и суспендируют в 1,9М сульфате аммония (фракция 1). К супернатантному медленно (в течение 2-3 суток) добавляют сульфат аммония до достижения концентрации 2,1М (pH 6,2). При этом кристаллизуется основная масса глицерол-3-фосфатдегидрогеназы. Осадок отделяют центрифугированием и суспендируют в 1,9М сульфате аммония (фракция 2). В супернатанте медленным (в течение нескольких дней) добавлением сульфата аммония молярность повышают до 2,3. Осадок отделяют центрифугированием и также суспендируют в 1,9М растворе сульфата аммония (фракция 3).

Фракция 1 и 3 соединяют, суспендируют в 1,75М сульфате аммония и нагревают в течение 4ч до 25-30°C. Это приводит к растворению кристаллов альдолазы, загрязняющих препарат. Центрифугируют, осадок промывают 1,85М раствором сульфата аммония и соединяют с фракцией 2. Дальнейшая очистка заключается в промывание осадка 1,85М раствором сульфата аммония, при этом концентрация белка в растворе не должна быть ниже 20мг/мл. Для перекристаллизации препарат растворяют в холодном растворе ЭДТА (концентрация белка 20-30 мг/мл), денатурировавшей белка отделяют центрифугированием и к супернатанту добавляют сухой сульфат аммония до слабого помутнения. Кристаллизация завершается при достижении концентрации сульфата аммония, равной 1,85М.

В ходе выделения фермента необходимо постоянно контролировать молярность сульфат аммония. Это осуществляют путем колориметрического определения концентрации иона NH_4^+ с реактивом Несслера.

Определение аммиака с реактивом Несслера.

Определение основано на том, что реактив Несслера с аммиаком образует красно-коричневый осадок. При очень небольших количествах аммиака осадок не образуется, а раствор приобретает желтый и коричневый цвет; интенсивность окраски зависит от количества аммиака. В пробирку 0,2(0,3)мл раствора. Приливают в пробирку 9,5(9,4)мл 0,002N. H_2SO_4 и 0,3мл реактива Несслера. Содержимое пробирки тщательно перемешивают, оставляют на 5мин при комнатной температуре и колориметрируют при 540nm. Для построения калибровочного графика используют 0,01N

раствора сернокислого аммония. На основании полученных результатов рассчитывают количество белка в опытной пробе.

8.3. Получение препарата амилазы из плесневых грибов (по Фениксовой)

Оборудование. Термостат; баня водяная; воронка; цилиндр.

Реактивы: плесневый порошок; 1%-крахмал; 0,3%-йод в йодиде калия (3%-ном).

Культивирование плесневых грибов. Плесневые грибы развиваются на синтетических питательных средах: сахароза -3г, NaNO_3 -0,2г, KH_2PO_4 -0,1г, MgSO_4 -0,05г, KCl -0,05г, FeSO_4 -0,001г, вода до 100мл -рН-7. Для получения грибной массы вносят кусочек плесени непосредственно с заплеснувшего предмета (или пользуются чистой культурой гриба *Aspergillus niger*) в питательную среду. Колбу помещают в термостат при температуре 25-28°C. Через 5-6 дней на поверхности жидкости вырастает пленка гриба, которые можно выделить амилазы.

Выделения препарата грибных амилаз. Грибную массу отделяют от среды фильтрованием и высушивают при температуре 37°C. Затем тщательно растирают в фарфоровой ступке в трехкратном количестве кварцевого песка. Полученный порошок используют для проведения опытов с амилазой.

Определения действия грибных амилаз. 2г порошок плесневых грибов смешивают с 50мл воды, нагретой до 37°C, встряхивают в течение 5 мин, а затем настаивают 2ч при той же температуре после этого отфильтровывают. В фильтрате содержится комплекс грибных амилаз. В пробирку наливают 5мл фильтрата, прибавляют 10мл 1%-ного раствора крахмала, перемешивают и добавляют 1-2 капли раствора йода. Проба окрашивается синий цвет. Пробирку помещают водяную баню, нагретую до 40%. Через каждые 2 мин повторяют взятие проб. По мере ферментативные расщепления крахмала пробы с йодом окрашиваются в различные цвета — синий, фиолетовый, красный и желтый, вследствие образования декстринов разной степени. В препарате грибных амилаз содержится в основном α -амилаза. О степени гидролиза его крахмала можно судить по изменению окраски крахмала и декстринов с йодом, амилаза с йодом дает синее окрашивание; амилодекстрины —сине —фиолетовое; мальтодекстрины не окрашиваются йодом.

8.4. Получение препарата уреазы из соевой муки

Оборудование: Мельница кофейная; воронка Бюхнера; ступка фарфоровая; колба коническая 500 мл.

Реактивы бобы соя; петрогейный (или серный) эфир; мочевины (1%-ный); фенолфталеин (1%-ный спиртовой); гидроксид натрия (10%-ный); реактив Несслера.

100г сухих бобов сои дважды размачивают на кофейной мельнице и тщательно растирают в ступке. Муку всыпают в колбу и встряхивают в течении 10-15 мин с 200 мл петролейного (или диэтилового) эфира для обезжиривания. Осадок отделяют на воронке Бюхнера, Экстракцию эфиром повторяют 5-6 раз, далее муку высушивают.

Высушенную, обезжиренную муку хранят в банке с притертой пробкой и хранить в сухом месте. Она служит для получения активных вытяжек уреазы.

30-40г обезжиренной соевой муки настаивают с пятикратным количеством дистиллированной воды в течении 15-20г при температуре не выше 5°C, затем центрифугируется при 3000 оборот в минуту в течении 10 минут. Надосадочную жидкость упаривают в вакууме досуха при температуре 35-40°C. Полученный порошок хорошо растворяет в воде.

Для определения активности уреазы готовят 0,01%-ный раствор препарата. Для этого в пробирку наливают 5 мл 1%-ного раствора мочевины, 2-3 капли раствора фенолфталеина и 1-2 мл 0,01%-ного раствора уреазы и инкубируется при 38°C на 30 мин. Параллельно проводится такой же опыт с прокипяченным раствором уреазы. В первой пробирке становится малиново — красный цвет за счет образования аммиака.

8.5. Получение препарата сахаразы

Оборудование и реактивы: Центрифуга; ступка фарфоровая, пекарские дрожжи, кварцевый песок, ацетон, тимол, 10% раствор гидроксида натрия, 1% раствор сульфата меди.

Ход работы:

1. 100г пекарских дрожжей тщательно растворяют в ступке с кварцевым песком. Растертую массу наносят тонким слоем на стекло и высушивают в токе сухого воздуха.

2. Высушенные дрожжи растирают в порошок. Для извлечения сахарозы к полученному порошку приливают небольшими порциями 200 мл воды при постоянном перемешивании. Затем массу вновь растирают в фарфоровой ступке и центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр.

3. Прозрачный фильтрат упаривают в вакууме при 35°C до небольшого объема и выливают в пятикратный объем охлажденного до 20°C ацетона, перемешивают и через несколько минут центрифугируют при 3000 об/мин. Образовавшийся осадок высушивают при температуре 38°C и растирают в ступке в порошок.

4. Полученный препарат сахарозы длительно сохраняется. В качестве антисептика к порошку добавляют кристаллик тимола, завернутый и фильтровальную бумагу.

5. Для проверки активности сахарозы в 2 пробирки наливают по 0,5 мл 0,01% водного раствора препарата. Содержимое одной из них кипятят в течение 3 мин для разрушения фермента, после чего пробирку охлаждают. Затем в обе пробирки добавляют по 3 мл 5% раствора сахарозы и ставят в термостат при 40°C на 15 мин. В обеих пробках проводят реакцию Троммера.

В контрольной пробирке осадка оксида меди (I) не появляется. В пробирке с активным ферментом образуется красный осадок оксида меди (I), что указывает на присутствие восстанавливающих ионы меди глюкозы и фруктозы, образующихся при гидролизе не восстанавливающего ее дисахарида сахарозы.

8.6. Методы очистки пероксидазы из корней хрена

Принцип метода. Очистку фермента начинают с экстракции его из разрушенных клеток растительных тканей и выделения фермента в раствор. В этом процессе используется механическая мельница. Все процессы рекомендуются проводить при 0°C. Полученный гомогенат центрифугируется для удаления неразрушенных клеток и ядер.

В супернатанте содержится фермент. Фермент осаждают с 80% аммония сульфатом. Перед осаждением белков сульфатом аммония необходимо добавить ЭДТА. После осаждения избыток соли удаляют диализом, и затем фермент наносят на колонку с ионообменником. При проведении ионообменной хроматографии

используют буфер, минимальная концентрация которого составляет 5мМ при значении pH, отличающегося не более чем на 0,3 единицы от величины его pKa. Концентрация адсорбирующего белка не должна превышать 5 мг/мл. Для клетки белков используют в основном два типа ионообменников: карбоксиметилцеллюлоза (катионообменник) и диэтиламино-этилцеллюлоза (анионообменник). Хроматографирование кислых белков с $pK < 5,0$, обычно проводят на анионитах, а щелочных ($pK > 8,0$) - на катионитах. При этом используется

ДЭАЭ-целлюлоза при $pH < 9,0$, а КМ-целлюлоза - при $pH > 3,5$. При работе с ДЭАЭ-целлюлозой ($pH 7,0-8,0$) рекомендуется использовать трис- HCl буфер, а для КМ-целлюлозы ($pH 5,0-6,5$) - ацетатный или фосфатный буфер.

Оборудование: центрифуга; спектрофотометр с проточной кюветой; хроматографические колонки (2x30 см); лиофильная сушка; прибор для ультрафильтрации белков; колонки хроматографические (2x30 см) - 2 шт; колбы на 500 мл-6шт; стаканы на 500 мл-2шт.

Материалы и реактивы: корни хрена, диализный мешочек; сульфат аммония; 0,005М трис-HCl буфер, pH 7,5; 0,005Н и 1,5М Na-ацетатный буфер, pH 5,0; ДЭАЭ-целлюлоза и КМ-целлюлоза.

Приготовление растворов: Раствор трис-HCl буфер готовят, смешивая 0,005М растворы трис и HCl на pH-метре до pH 7,5; раствор Na-ацетатного буфера готовят, смешивая 0,005М растворы CH_3COONa на pH-метре до pH 5,0.

Ход работы: 100г корней хрена промывают водой и после измельчения гомогенизируют, проводя экстракцию фермента, добавляя 100 мл д.в. Гомогенат центрифугируют 15 мин при 7000 оборот в минуту. Супернатант концентрируют ультрафильтрацией до 1/4 начального объема, а затем осаждают белок сульфатом аммония (70% насыщения). Сульфат аммония добавляют к супернатанту при постоянном перемешивании в течении 30 мин до полного растворения. Раствор оставляют при +4°C на 2ч.

Выпавший осадок отделяют центрифугированием (15 мин при 7000 оборот в минуту). Осадок растворяют в минимальном количестве воды и диализуют против нее. Определяют концентрацию белка и активность пероксидазы. Образец наносят на колонку (2x30см) с ДЭАЭ целлюлозой, уравновешенную 0,005 трис-HCl буфером, pH 7,5. После прохождения самотеком

коричневого кольца (цвет пероксидазы) его наносят на колонку того же объема с КМ-целлюлозой уравновешенную 0,005М Na – ацетатного буфера, рН 5,0. Пероксидазу элюируют в линейном градента, создаваемым Na-ацетатным буфером 0,005-1,5М, рН 5,0. Объем сместителя 200 мл, скорость элюции 50 мл/ч. После выхода фермента из колонки с КМ-целлюлозой его диализуют против воды. Элюируемых растворов измеряют при 280 с помощью спектрофотометра при 403 нм, фракции с наибольшей активностью пероксидазы и RZ лиофилизируют ($RZ=D/D_{280}$). Концентрацию белка определяют по Лоури.

Метод расчета. Полученный результат исследований заполните таблицу 15 по образцу.

Таблица 15

Результаты очистки полученных препаратов пероксидазы зерновок пшеницы

Стадии очистки	Общий белок, мг	Активность пероксидазы		Выход, %		Степень очистки
		Общая, %, мк моль /мин	Удельная /мг	По белку	По активности	
Гомогенат						
Супернатант						
После осаждения сульфатом аммония						
Хроматография на колонке с ДЭАЭ целлюлозной						
Хроматография на колонке с КМ целлюлозой						

Заполнение таблицы проводят по следующим формулам:
общий белок (мг) = $C_{\text{белка}} (\text{мг/мл}) \cdot V (\text{мл})$;

$$\text{общая активность } \Sigma (\text{мк моль/мин}) = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_2}{30 \cdot l \cdot V_3 \cdot dt}$$

$$\text{удельная активность } (\Sigma/\text{мг}) = \frac{\Sigma}{\text{общий белок}}$$

где, $C_{\text{белка}}$ – концентрация белка в элюате (мг/мл);

V – объем пробы (мл);

dD – светопоглощение (усл.ед.);

30 – коэффициент микромолярного поглощения;

l – ширина кюветы, см;

V_1 – объем элюата, мл;

V_2 – конечный объем пробы в пробирке, мл;

V_3 – объем экстракта, вносимого в пробирку, мл;

dt – время реакции, мин.

Выход по белку, активности рассчитывают по показателям общего белка и общей активности, принимая их за 100% у исходных образцов, а степень очистки – по величинам удельной активности, принимая показания исходных образцов за единицу.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Общие понятия о ферментах.
2. Отличие биологических катализаторов от неорганических.
3. Строение ферментов.
4. Одно- и двухкомпонентные ферменты.
5. Что такое активный центр ферментов?
6. Коферменты их функция.
7. Охарактеризуйте активный центр фермента. Что такое аллостерический центр фермента?
8. Понятие о классификации ферментов и коферментов.
9. Какие соединения являются активаторами ингибиторами ферментов?
10. Классификация ингибиторов.
11. Конкурентные ингибиторы, механизм действия, изменение кинетики ферментативного катализа, примеры.
12. Неконкурентные ингибиторы, механизм действия, изменение кинетики ферментативного катализа.
13. Активаторы ферментов.
14. Регуляция активности ферментов.
15. Единица активности ферментов.
16. Стадии ферментативного катализа. Механизм действия ферментов.
17. Изоферменты.
18. Расскажите зависимость активности ферментов от температуры, pH и концентрации ферментов.
19. Расскажите зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.
20. Механизм ингибирования ферментов.
21. Роль белковой и небелковой части сложных ферментов.
22. Расскажите физический смысл константы Михаэлиса.
23. Действие температуры на активность ферментов.
24. Как действует pH среда на ферменты?
25. Приведите примеры на специфичность действия ферментов.
26. Приведите график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.
27. Специфичность ферментов, виды, характеристика, примеры.

28. В чем отличие энергии активации ферментативной реакции?
29. Классификация ферментов.
30. Расскажите общую характеристику ферментов класса оксидоредуктаз.
31. Дайте общую характеристику ферментов класса трансфераз.
32. Расскажите общую характеристику ферментов класса гидролаз.
33. Расскажите общую характеристику ферментов класса лиаз.
34. Расскажите общую характеристику ферментов класса изомераз.
35. Расскажите общую характеристику ферментов класса лигаз.
36. Расскажите функцию константного и каталитического участков активного центра фермента.
37. Применение ферментов с лечебной целью.
38. Значение определения активности ферментов для диагностики и лечения заболеваний.

Вопросы для подготовки ИК

1. Предмет и задачи энзимологии.
2. Строение и свойства ферментов.
3. Активный центр ферментов, связывание субстратов и кофакторов.
4. Активный и аллостерический центры. Каталитические участки активного центра.
5. Апоферменты и простетические группы сложных ферментов.
6. Коферменты и их роль в каталитическом процессе.
7. Методы исследования структуры ферментов и строение активного центра.
8. Краткие исторические сведения о развитии энзимологии.
9. Химическая природа ферментов. Молекулярная масса ферментных белков. Одно и двухкомпонентные ферменты.
10. Химическая иммобилизация ферментов.
11. Различные уровни структурой организации ферментов и значение их для ферментативной активности.

12. Значение третичной структуры в формировании активного центра.
13. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.
14. Общие представления о механизме действия ферментов. Общие понятия о катализе. Снижение энергии активности при ферментативном катализе.
15. Влияние температуры на скорость ферментативных реакций.
16. Обратимые конкурентные ингибиторы.
17. Специфичность действия ферментов.
18. Ингибирование ферментативной реакции субстратом и продуктами.
19. Понятия «ингибитор». Классификация ингибиторов.
20. Общие представления о механизме действия ферментов.
21. Значение исследования pH на скорость ферментативных реакций.
22. Методы очистки ферментов.
23. Методы изучения ферментативной активности.
24. Основные стадии катализа ферментами, структурная организация ферментов.
25. Молекулярная структура ферментов.
26. Синтез ферментов и его регуляция. Посттрансляционная модификация ферментов.
27. Локализация ферментов в клетках и тканях живых организмов.
28. Температурный оптимум ферментативной реакции.
29. Термостабильные и термолабильные ферменты.
30. Активность нативных ферментов. Роль третичной и четвертичной структур молекулы фермента.
31. Образование фермент-субстратных комплексов.
32. Теория Михаэлиса – Ментен. Кинетика ферментативных реакций.
33. Обратимые и необратимые ингибиторы.
34. Активность ферментов при низких температурах.
35. Регуляция количества молекул фермента в клетке.
36. Регуляция каталитической активности ферментов.
37. Регуляция скорости ферментативной реакции доступностью молекул субстрата и коферментов.

38. Ферменты митохондрий, физиологическая роль.
39. Действия ингибиторов и активаторов на активность фермента.
40. Пищеварительные ферменты.
41. Оксидоредуктазы – ферменты окислительно-восстановительных реакций. Примеры.
42. Трансферазы. Аминотрансферазы. И их роль в обмене аминокислот.
43. Гидролазы. Пептид-гидролазы.
44. Лиазы. Декарбоксилазы. Их роль в синтезе физиологически активных аминов.
45. Изомеразы.
46. Лигазы. Аминоацил – t-РНК – синтетазы.
47. Применение ферментов в медицине «Молекулярные болезни».
48. Имобилизованные ферменты.
49. Роль гормонов в регуляции активности ферментов.
50. Общая характеристика нуклеаз. Реакции, катализируемые рибонуклеазами.

ТЕСТЫ

1. Что называется коферментами?

- A. активный центр двухкомпонентных ферментов;
- B. белковая часть двухкомпонентных ферментов;
- C. фермент – субстрактный комплекс;
- D. функциональные группы некоторых аминокислот.

2. Чем отличаются ферменты от неорганических катализаторов?

- A. Имеют белковую природу, определенный pH действия, температурный оптимум, специфичность;
- B. являются мультимерами;
- C. являются биологической макромолекулой;
- D. являются витамином.

3. От каких факторов зависит активность ферментов?

- A. внешней среды;
- B. pH среды, температуры, активаторов, ингибиторов;
- C. первичной структуры;
- D. четвертичной структуры.

4. На какой основе ферменты разделены на классы?

- A. Типа катализируемых реакций;
- B. строения ферментов;
- C. массы молекулы;
- D. pH среды реакции.

5. К какому классу ферментов относятся дегидрогеназы?

- A. Оксидоредуктазы;
- B. трансферазы;
- C. изомеразы;
- D. лигазы.

6. Какими ферментами осуществляются реакции трансаминирования?

- A. Аминотрансферазами;
- B. гидролазами;
- C. изомеразами;
- D. лигазами.

7. Какой фермент гидролизует пептидные связи?

- A. Пепсин;
- B. декарбоксилаза;
- C. аминотрансфераза;
- D. амилаза.

8. Какие ферменты катализируют окислительно-восстановительные процессы?

- A. Оксидоредуктазы;
- B. гидролазы;
- C. изомеразы;
- D. лигазы.

9. Какой фермент расщепляет крахмал?

- A. Амилаза;
- B. каталаза;
- C. сахараза;
- D. мальтаза.

10. Какие ферменты катализируют образование сложных соединений?

- A. Лигаза;
- B. трансферазы;
- C. лиазы
- D. изомеразы.

11. Химическая природа энзимов была доказана

- A. Бухнером
- B. Фишером
- C. Пастером
- D. Либихом

12. В кристаллическом виде фермент впервые получен

- A. Нейбергом
- B. Самнером
- C. Кюне
- D. Бернаром

13. Биологические катализаторы являются

- A. Пентозанами
- B. Стеринами
- C. Белками
- D. Эйкозанами

14. Не все ферменты имеют структуру

- A. Первичную
- B. Вторичную
- C. Третичную
- D. Четвертичную

15. Активный центр фермента

- A. Находится в центре молекулы
- B. Называется коферментом
- C. Является апоферментом
- D. Состоит из остатков аминокислот и простетических групп

16. Кофермент – это

- A. Белковая часть фермента
- B. Низкомолекулярный компонент активного центра
- C. Регуляторный участок фермента
- D. Неактивная форма фермента

17. Во взаимодействии металлоферментов с субстратом участвуют связи

- A. Дисульфидные
- B. Гликозидные
- C. Координационные
- D. Сложные эфирные

18. Относительно специфичные ферменты

- A. Катализируют только одну из возможных реакций превращения субстратов
- B. Ускоряют разные химические реакции
- C. Катализируют реакции только с одним субстратом
- D. В разных условиях катализируют разные типы химических реакций

19. Катализатор это-

- A. Повышает энергию активации
- B. Снижает энергию активации
- C. Повышает тепловой эффект
- D. Снижает тепловой эффект

20. Скорость ферментативной реакции не зависит от

- A. Концентрации субстрата
- B. pH
- C. Температуры
- D. Молекулярной массы кофермента

21. Переходное состояние фермент-субстратного комплекса соответствует

- A. Более высокой энергии активации
- B. Более низкой энергии активации
- C. Более высокой ΔH
- D. Более высокому энергетическому барьеру

22. Уравнение Михаэлиса-Ментен

- A. Выражает зависимость действия фермента от концентрации субстрата
- B. Учитывает все стадии реакции
- C. Описывает вторую стадию реакции – образование E и P
- D. Не учитывает стадию образования комплекса ES

23. Константа Михаэлиса численно равна

- A. Скорости реакции
- B. Отношению констант прямой и обратной реакции
- C. Молекулярной активности фермента
- D. Концентрации субстрата при $v = V_{max}/2$

24. Реакция, катализируемая алкогольдегидрогеназой, $CH_3CH_2OH + NAD^+ \leftrightarrow CH_3CHO + NADH + H^+$, является ...

- A. Мономолекулярной
- B. Бимолекулярной
- C. Надмолекулярной
- D. Не зависящей от концентрации витамина B5

25. Концентрация фермента

- A. Не влияет на скорость реакции
- B. Оказывает существенное влияние на скорость реакции
- C. Не связана с начальной скоростью реакции
- D. Определяет величину K_m

26. pH влияет на ..

- A. Степень ионизации функциональных групп в активном центре
- B. Тепловой эффект реакции
- C. Энергию активации
- D. Энергетический барьер

27. pH – это

- A. Отрицательный логарифм концентрации водородных ионов
- B. Количество протонов
- C. Концентрация гидроксильных ионов
- D. Степень ионизации

28. Оптимум pH пепсина соответствует значениям

- A. 1,5-2,5
- B. 3-7
- C. 8-10
- D. 11-14

29. Оптимум pH амилазы равен

- A. 1-4
- B. 4,1-7,1
- C. 7,2-7,4
- D. 7,5-12

30. Температура не влияет на

- A. Скорость расщепления комплекса ES
- B. Сродство фермента к субстрату
- C. Процессы ионизации компонентов реакции
- D. Первичную структуру апофермента

31. Активаторами называются

- A. Вещества, повышающие активность фермента
- B. Факторы, инактивирующие субстрат

- C. Вещества, без которых реакция не протекает
- D. Коферменты

32. Активаторы

- A. Необратимо связаны с ферментом
- B. Входят в состав активного центра
- C. Действуют только аллостерически
- D. Могут действовать по активному и аллостерическому центрам

33. К числу активаторов ферментов не относится

- A. Глутатион
- B. Рибофлавин
- C. Ca^{2+}
- D. Cl^-

34. Активаторы действуют путем

- A. Участия в формировании активного центра
- B. Связывания субстрата
- C. Ковалентной модификации фермента
- D. Инактивации кофермента

35. Активатором α -амилазы является

- A. Na^+
- B. Глутатион
- C. Cl^-
- D. Cu^{2+}

36. Необратимым может быть ингибирование

- A. Конкурентное
- B. Бесконкурентное
- C. Неконкурентное
- D. Ковалентное

37. Неконкурентный ингибитор может связываться с

- A. Активным центром
- B. Фермент-субстратным комплексом
- C. SH-группами остатков цистеина
- D. Коферментом

38. Конкурентные ингибиторы

- A. Вытесняются из активного центра субстратами
- B. Не используются в качестве лекарственных средств
- C. Необратимо связывают активный центр
- D. Обратимо связывают кофермент

39. Одно из следующих положений не соответствует классификации ферментов

- A. Ферменты делят на 6 классов
- B. Название фермента включает в себя название субстрата, тип катализируемой реакции и окончание «аза»
- C. Каждому ферменту присвоен 4-х значный шифр
- D. Все тривиальные названия ферментов упразднены

40. Согласно действующей Международной классификации систематическое название фермента не содержит

- A. Название субстрата
- B. Тип реакции
- C. Название продукта реакции
- D. Окончание «аза»

41. Шифр фермента не включает

- A. Класс
- B. Подподкласс
- C. Порядковый номер
- D. Номер изофермента

42. Вторая цифра шифра означает, как правило,

- A. Природу донора
- B. Строение акцептора
- C. Тип катализируемой реакции
- D. Вид кофермента

43. Первый класс ферментов называется

- A. Изомеразы
- B. Дегидрогеназы
- C. Оксидоредуктазы
- D. Амилазы

44. Второй класс ферментов носит название

- A. Пептидазы
- B. Лиазы
- C. Фосфатазы
- D. Трансферазы

45. Третий класс объединяет все ферменты, катализирующие реакции

- A. Гидролиза
- B. Синтеза
- C. Окисления
- D. Восстановления

46. В четвертый класс входят ферменты, которые ускоряют реакции

- A. Расщепления с образованием двойных связей или присоединения по двойным связям
- B. Переноса тех или иных групп
- C. Карбоксилирования
- D. Фосфорилирования

47. Ферменты пятого класса не катализируют

- A. Соединение отдельных мономеров в полимерные молекулы
- B. Внутримолекулярный перенос химических группировок
- C. Изменение геометрической конфигурации молекул
- D. Образование цис-транс изомеров

48. Ферменты шестого класса катализируют реакции

- A. Тканевого дыхания
- B. Дезаминирования
- C. Образования изомерных форм органических соединений
- D. Синтеза, сопряженные с гидролизом макроэргических связей

49. Оксидазы катализируют реакции, в которых акцептором служит

- A. Водород
- B. Кислород
- C. Аммиак
- D. Оксикислота

50. Реакции: $RR_1 + HOH \rightarrow ROH + R_1H$ катализируют

- A. Оксидоредуктазы
- B. Трансферазы
- C. Гидролазы
- D. Лиазы

51. Фермент, шифр которого КФ 5.1.1.1.1, катализирует реакцию

- A. Аланин + 2-оксоглутарат $\rightarrow$ пируват + глутамат
- B. Изоцитрат $\rightarrow$ сукцинат + глиоксилат
- C. L-аланин $\leftrightarrow$ D-аланин
- D. Этанол + NAD^+ $\rightarrow$ ацетальдегид + $NADH$

52. Реакцию: $\text{сахароза} + H_2O \rightarrow \alpha, D\text{-глюкопираноза} + \beta, D\text{-фруктофураноза}$ не катализирует фермент

- A. β -Фруктофуранозидаза
- B. Инвертаза
- C. Сахараза
- D. Глюкозооксидаза

53.1 катал – это

- A. Концентрация катализатора, 1 моль/л
- B. Скорость реакции без фермента
- C. Активность фермента, превращающего 1 моль субстрата в секунду
- D. Активность одной молекулы фермента

54. Международная (стандартная) единица активности фермента – это

- A. Количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкм субстрата за 1 мин
- B. Активность, отнесенная к 1 мг белка
- C. Число молекул субстрата, превращаемых одной молекулой катализатора за единицу времени
- D. Активность катализатора в расчете на его молекулярную массу

55. Ферментами называют:

- A. вещества белковой природы, которые замедляют реакции
- B. вещества небелковой природы, которые ускоряют реакции

- C. вещества белковой природы, которые ускоряют реакции
- D. вещества небелковой природы, которые замедляют реакции

56. Каждый фермент ускоряет:

- A. несколько разнотипных реакций
- B. несколько групп разнотипных реакций
- C. только одну реакцию или группу однотипных реакций
- D. однотипные и разнотипные реакции

57. Ферменты увеличивают скорость реакции в:

- A. 10 – 50 раз
- B. 100 – 1000 раз
- C. 10³ – 10⁵ раз
- D. 10⁸ – 10¹² раз

58. В соответствии с общим типом катализируемых реакций все ферменты поделены на:

- A. 2 группы
- B. группы
- C. 6 групп
- D. 8 групп

59. Ферменты группы – оксидоредуктазы катализируют реакции:

- A. внутримолекулярной перестройки
- B. гидролиза
- C. окисления – восстановления
- D. замещения

60. В настоящее время известно:

- A. более 2000 ферментов
- B. около 100 ферментов
- C. 50 ферментов
- D. 10 ферментов

61. Под действием соответствующего фермента в клетке происходит:

- гидролиз жиров до:
- A. глицерина и жирных кислот
- B. моносахаридов
- C. аминокислот

D. CO₂, H₂O, N₂

62. Фермент желудочного сока пепсин наиболее активен при pH:

- A. 1,5 - 2
- B. 6 - 7
- C. 9 - 10
- D. 11 - 12

63. Ферменты группы – гидролазы катализируют реакции:

- A. внутримолекулярной перестройки
- B. гидролиза
- C. 3) окисления – восстановления
- D. 4) замещения

64. Пептиды превращаются в аминокислоты под действием ферментов:

- A. липазы
- B. пептидазы
- C. редуктазы
- D. каталазы

65. По своей химической природе ферменты являются:

- A. углеводами
- B. нуклеиновыми кислотами
- C. белками
- D. сложными эфирами

66. Под действием соответствующего фермента в клетке происходит гидролиз белков до:

- A. глицерина и жирных кислот
- B. моносахаридов
- C. аминокислот
- D. CO₂, H₂O, N₂

67. Оптимальной для работы ферментов является температура:

- A. 26 °C
- B. 36 °C
- C. 46 °C

D. 56 °C

68. Активный центр фермента и молекула вещества катализируемой реакции подходят друг к другу как:

- A. «голова к хвосту»
- B. «ключ к замку»
- C. «вилка к ножу»
- D. «шапка к голове»

69. Пищеварительный процесс в организме человека начинается под действием фермента слюны:

- A. пепсина
- B. амилазы
- C. трипсина
- D. каталазы

70. Под действием соответствующего фермента в клетке происходит гидролиз углеводов до:

- A. глицерина и жирных кислот
- B. моносахаридов
- C. аминокислот
- D. CO₂, H₂O, N₂

71. Фермент слюны и тонкого кишечника – амилаза – наиболее активен при pH:

- A. 1,5 - 2
- B. 6 - 7
- C. 9 - 10
- D. 11 - 12

72. Ферменты группы – изомеразы катализируют реакции:

- A. внутримолекулярной перестройки
- B. гидролиза
- C. окисления – восстановления
- D. замещения

73. Жиры (липиды) расщепляются до глицерина и жирных кислот под действием ферментов:

- A. липазы

- B. пептидазы
- C. редуктазы
- D. каталазы

74. К какому классу относятся ферменты, катализирующие внутримолекулярный перенос группы:

- A. Оксидоредуктазы
- B. Лиазы
- C. Изомеразы
- D. Трансферазы

ГЛОССАРИЙ

ACTIVATOR - АКТИВАТОР — вещество, действие которого проявляется в возрастании скорости ферментативной реакции; различают неконкурентную ($\alpha = 1, P > 1$), синергистическую ($\alpha < 1, p = 1$) и смешанные ($\alpha \neq 1, p \neq 1$) типы активирования

ACTIVE CENTER - АКТИВНЫЙ ЦЕНТР — участок, расположенный на поверхности белковой глобулы, образованный из разных аминокислотных остатков, собранных из различных участков полипептидной цепи, где происходит связывание и превращение субстрата; аминокислотные остатки имеют определенное пространственное расположение в активном центре, что обеспечивает специфичность (избирательность) механизма действия фермента

AEROBEE - АЭРОБЫ — организмы, использующие в качестве акцептора электронов молекулярный кислород; к аэробам относятся все животные и растения, а также многие микроорганизмы

AEROBIC CONDITIONS - АЭРОБНЫЕ УСЛОВИЯ — условия жизнедеятельности организмов и протекания биохимических реакций в присутствии кислорода, использующие его в качестве акцептора электронов

ANABOLISM (ANABOLIC PATHWAYS) - АНАБОЛИЗМ (АНАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ) — процессы ферментативного синтеза сложных биологических молекул (углеводов, нуклеиновых кислот, белков, жиров) из простых предшественников, с потреблением свободной энергии, которая поставляется в форме фосфатных связей АТФ

ANTIBODIES - АНТИТЕЛА — вещества гликопротеидной природы, образующиеся в ответ на введение в организм антигена и обладающие способностью к специфической реакции с антигеном

ANTIGENS - АНТИГЕНЫ — вещества, несущие признаки генетической чужеродности и индуцирующие синтез антител

ANTIOXIDANT ACTIVITY - АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ — активность, проявляемая действием антиоксидантов в живых организмах, подавляющих протекание процессов свободнорадикального окисления; эффект действия антиоксидантов часто используется в производстве пищевых

продуктов; так, например, антиоксиданты (дигидрокверцетин, кверцетин, аскорбиновая кислота и др.) используются в качестве пищевых добавок или входят в состав уже готовых пищевых продуктов; молока, масла, сливок, сметаны, сыров и др.

ANTIOXIDANT SYSTEM - АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА — это комплекс соединений, способных подавлять протекание свободнорадикальных реакций в биогенных системах; к этой группе относятся биогенные молекулы, которые по механизму действия можно условно разделить на две группы: 1) высокомолекулярные соединения — ферменты антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза и др.), а также белки, способные связывать ионы железа и меди, являющиеся катализаторами свободнорадикальных процессов (альбумин, трансферрин, ферритин и т. д.); 2) низкомолекулярные соединения, к которым относятся стероиды, убихиноны, фосфолипиды, некоторые аминокислоты, полиамины, мочевины, мочевая кислота, глутатион, аскорбат, билирубин, токоферолы и др.

ANTIOXIDANTS - АНТИОКСИДАНТЫ — это соединения, действие которых связано с обрывом цепной радикальной реакции, в результате чего образуются гидропероксид субстрата и обладающий низкой реакционной способностью свободный радикал ингибитора; антиоксиданты регулируют процессы свободнорадикального окисления в биогенных системах, создают оптимальные условия для нормального метаболизма и функционирования клеток и тканей, их основной функцией в растительных и животных клетках является торможение процессов свободнорадикального окисления; эффективность действия антиоксиданта обусловлена предотвращением окисления SH-групп белков, сохранением состава биомембран, биологически активных веществ, информативных молекул и т. д., повреждение которых возникает в результате активации процесса перекисного окисления липидов; возможно проявление совместного действия а.; так, например, антиоксидантный эффект α -токоферола в мембранах усиливается аскорбатом; в присутствии аскорбата α -токоферол может восстанавливать перекись липида до его исходной формы; таким образом, уровень ПОЛ в клетке находится под контролем высокоактивной системы антиоксидантной защиты.

ANTIRADICAL ACTIVITY - АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ — проявление реакционной способности

соединений подавлять активность свободных радикалов и, в частности, активных форм кислорода

APOFERMENTAM - АПОФЕРМЕНТ — белковая часть холофермента

ASSIMILATION (PLASTIC RESPONSE EXCHANGE) - АССИМИЛЯЦИЯ (РЕАКЦИИ ПЛАСТИЧЕСКОГО ОБМЕНА)

— процессы направленного синтеза биогенных молекул в живых организмах, протекающие с затратой энергии (АТФ и другие высоко энергетические молекулы); к процессам а. можно отнести биосинтез белка, гликонеогенез — синтез гликогена, липогенез — синтез жирных кислот и т. д.

BILE ACIDS - ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ — конечные продукты обмена холестерина; относятся к производным холановой кислоты, в составе которых холевая (3,7,12-триоксихолановая), дезоксихолевая (3,12-диоксихолановая) и хено дезоксихолевая (3,7-диоксихолановая) кислоты; желчные кислоты могут присутствовать в конъюгированной форме с глицином (гликохолевая, гликодезоксихолевая, гликохенодезоксихолевая кислоты) и таурином (таурохолевая, тауродезоксихолевая, таурохенодезоксихолевая кислоты); основным местом синтеза желчных кислот является печень; при этом только комплекс желчных кислот с ненасыщенными жирными кислотами и моноацилглицеридами может создать смесь для эмульгирования жиров

CARBOHYDRATE - ОЛИГОСАХАРИДЫ — производные углеводов, содержащие от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных О-гликозидной связью; основными о. являются лактоза, сахароза, мальтоза, целлобиоза, трегалоза

CATABOLISM (KATABOLICHECKIE WAY) - КАТАБОЛИЗМ (КАТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ) — процессы ферментативного расщепления биологических молекул (углеводов, жиров и белков), сопровождающиеся выделением свободной энергии и накоплением ее в форме энергии фосфатных связей АТФ

CELL MEMBRANE (plasmalemma) - КЛЕТОЧНАЯ МЕМБРАНА (ПЛАЗМАЛЕММА) — структурное образование, изолирующее внутреннее содержание клетки от окружающей среды; к. м. состоит из упорядоченно расположенных молекул белков, липидов и углеводов; наружный и внутренний слой

элементарной мембраны образованы белковыми молекулами, а между ними находятся два липидных слоя; белки располагаются как на поверхности к. м., так и пронизывают ее насквозь, формируя проводные каналы транспортных систем метаболитов клетки; поверхность к. м., обращенная наружу, отличается по химическому составу от внутренней; к. м. обладает избирательной проницаемостью, регулируя, таким образом движение веществ в клетку и из клетки

CLASSIFICATION OF ENZYME - КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ — в настоящее время, в соответствии с типом катализируемой реакции, ферменты сгруппированы в 6 классов: 1 класс — оксидоредуктазы; 2 класс — трансферазы; 3 класс — гидролазы; 4 класс — лиазы; 5 класс — изомеразы; 6 класс — лигазы (синтетазы)

COFACTOR (COENZYME) - КОФАКТОР (КОФЕРМЕНТ) — низкомолекулярное соединение небелковой природы, связанное с апобелком нековалентными связями в активном центре и участвующее в каталитическом процессе; в отсутствие кофермента фермент неактивен и каталитическая реакция не протекает; к коферментам относятся: НАД, НАДФ, ФАД, ТПФ и др.; предшественниками некоторых к. являются витамины (B_1 (тиамин) → ТПФ (тиаминпирофосфат), B_2 (рибофлавин) → ФАД (флавинадениндинуклеотид), B_3 (пантотеновая кислота) → SHCoA, B_5 (никотиновая кислота) → ФП (фосфопиридоксин), B_{12} (цианкобаламин) → МК (метилкобаламин), B_c (фолиевая кислота) → ТГФК (тетрагидрофолиевая кислота), Н (биотин) КВ (карбоксибиотин))

COMPETITIVE INHIBITION - КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ — тип ингибирования, когда субстрат и ингибитор конкурируют за участок связывания в активном центре фермента, причем связывание ингибитора препятствует последующему связыванию субстрата и его превращению

COMPETITIVE INHIBITOR - КОНКУРЕНТНЫЙ ИНГИБИТОР — соединение, структура которого сходна со структурой субстрата; к. и. способен связываться в активном центре фермента, занимая место субстрата, препятствуя его связыванию, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции

CORE - ЯДРО — органоид, обеспечивающий хранение и передачу генетической (наследственной) информации; основными элементами я.

COVALENT BONDS - КОВАЛЕНТНАЯ СВЯЗЬ — связь, образованная между атомами за счет обобществления их электронов, в электронных оболочках, в общую электронную пару; разная электроотрицательность атомов, участвующих в образовании к. с., приводит к возникновению поляризации этой связи; прочность ковалентной полярной связи меньше, чем неполярной

DENATURATION OF PROTEINS - ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ — изменение пространственной структуры белков под действием высокой температуры ($50-60^\circ\text{C}$) и кислотности среды ($4,0 > \text{pH} > 10,0$), что приводит к нарушению их нативной (природной) конформации; разворачивание глобулы белка делает доступными для воды гидрофобные остатки аминокислот, которые в нативном состоянии формировали преимущественно ядро белка, взаимодействие их радикалов может приводить к образованию крупных ассоциатов денатурированных белков, о чем свидетельствует степень помутнения раствора или образование осадков. При проведении центрифугирования или длительном отстаивании растворов денатурированных белков, в особенности при низких температурах ($0+4^\circ\text{C}$), агрегированные полипептидные цепочки белков оседают на дно сосуда

DENATURATION - ДЕНАТУРАЦИЯ — внутримолекулярное изменение пространственного расположения по отношению друг к другу отдельных пептидных фрагментов в белковой макромолекуле или полинуклеотидных цепочек в ДНК без разрыва ковалентных связей, в результате действия химических или физических факторов (ионы тяжелых металлов, органические растворители, кислоты, щелочи, температура, ионизирующее излучение и др.), приводящих к изменению их физико-химических свойств и к утрате функциональной активности

DENATURE THE ENZYME - ДЕНАТУРАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ — Ферменты выполняют роль биологических катализаторов; в каталитическом действии фермента принимают участие аминокислотные остатки, содержащие $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ и другие группы, входящие в состав активного центра, протонирование и депротонирование, которых может влиять на его

каталитические свойства; поэтому активность ферментов зависит от pH среды, изменение которой может приводить к нарушению нативной структуры апобелка и конформации активного центра, что проявляется в утрате специфических каталитических свойств; аналогично белкам, ферменты при повышении температуры изменяют свою конформацию, теряя способность катализировать превращения различных соединений

DEZOKSIRIBONUKLEINOV AN-acid (DNA)
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА (ДНК) —

высокомолекулярное соединение, образованное за счет последовательного связывания нуклеотидов в полинуклеотидную цепь, в упорядоченном расположении которых заложена индивидуальная информация о живом организме. ДНК является полинуклеотидом (биополимер), в составе которого азотистые основания (аденин, гуанин, цитозин и тимин), моносахариды (дезоксирибоза) и остатки фосфорной кислоты; в полинуклеотидной цепи нуклеотиды последовательно связаны между собой за счет фосфодиэфирной связи

DISSIMILATION - ДИССИМИЛЯЦИЯ — (реакции энергетического обмена) процессы направленного распада веществ в клетках живых организмов; при этом накопившаяся в результате распада веществ энергия генерируется в связях высокоэнергетических молекул (АТФ, ГТФ, ЦТФ, УДФ и др.), используемых в дальнейшем для синтеза пластических веществ; к процессам д. можно отнести гликолиз — распад глюкозы, липогенез — окисление жирных кислот, гликогенез — расщепление гликогена и др

ELECTRIC POINT - ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ТОЧКА — состояние заряженности белка при определенном pH, при котором устанавливается равенство положительных и отрицательных зарядов в молекуле белка; в растворе с определенным pH, которое совпадает с величиной и.э. т. белок в электрическом поле неподвижен

ENZYMES -ФЕРМЕНТЫ —(от англ. enzyme) энзимы, белки, обладающие каталитической активностью, способные ускорять протекание химических реакций в живых организмах; от обычных функциональных белков их отличает то, что на поверхности белковой глобулы у них располагается активный центр; это участок, образованный из различных аминокислотных остатков,

собранных из различных областей полипептидной цепи, где происходит связывание и превращение субстрата; кроме активного центра, у некоторых ферментов имеется еще и регуляторный участок; в этом участке связываются молекулы, оказывающие влияние на связывание и превращение субстрата в ферментативном процессе; при этом сами регуляторы не претерпевают изменений; все биокатализаторы являются белками еще и потому, что через упорядоченный синтез белков, информация о которых заложена в геноме клетки, может осуществляться управление химическими реакциями, протекающими в клетке; активность ферментов зависит от параметров среды (температура, pH, ионная сила, природа растворителя, присутствия мицелл), природы и концентрации (фермента-субстрата, фермент субстратного комплекса), эффекторов (активаторов и ингибиторов), коферментов (для сложных ферментов), природы и расположения функциональных групп в области активного центра

EUKARYOTES - ЭУКАРИОТЫ — (от греч. ей — хорошо и karyon — ядро) организмы, клетки которых имеют клеточное ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной оболочкой; отличительной особенностью э. от прокариот является наличие у них в органоидах (митохондриях и хлоропластах) небольших по размеру молекул ДНК, а также то, что все э. размножаются делением ядра с образованием настоящих хромосом; для большинства э. характерен половой процесс, при котором образуются ядра с уменьшенным вдвое (гомологичный набор) числом хромосом (см. мейоз); в надцарство э. входят разнообразные простейшие (жгутиковые, инфузории, споровики), грибы, животные и растения

FLAVINADENIN DINUCLEOTIDE (FAD) -
ФЛАВИНАДЕНИН-ДИНУКЛЕОТИД (ФАД) — сложное биологическое соединение, предшественником которого является витамин В₂ (рибофлавин); ФАД выполняет роль донора и акцептора электронов и протонов в окислительно восстановительных реакциях, катализируемых специфичными дегидрогеназами; восстановленной формой ФАД является ФАДН, которая, в основном, генерируется в цикле трикарбоновых кислот (цикле Кребса) и в процессе липогенеза; при окислении в митохондриях одной молекулы ФАДН синтезируется две молекулы АТФ

FURAN - ФУРАН — углеводородный цикл из пяти членов, в состав которого входит атом кислорода

GANGLIOSIDE - ГАНГЛИОЗИДЫ — гликолипиды, в состав которых входит сиаловая кислота

GLUTATHIONE (R-SH) - ГЛУТАТИОН (R-SH) — трипептид, в состав которого входят три последовательно соединенных аминокислоты (глутаминовая кислота, цистеин, глицин); г. служит донором водорода в окислительно-восстановительных процессах; в организме животных г. является субстратом глутатиопероксидазы, окисление которого сопровождается образованием окисленной формы (γ-S-S-γ); количество восстановленного глутатиона может служить критерием жизнеспособности живых организмов

GLYCOPROTEIN PROTEINS- ГЛИКОПРОТЕИНЫ — сложные белки, в состав которых входят углеводы; выполняют г. функции рецепторов мембран, участвующих в процессах биологического распознавания соединений и клеток (гормонов, бактерий и вирусов); ряд гликопротеинов, циркулирующих в кровяном русле человека и животных, являются транспортными белками; каталитическая функция выполняется такими белками, как пероксидаза, холинэстераза, глюкооксидаза, энтерокиназа и др., содержащие углеводы в своем составе; входя в состав межклеточного вещества соединительной ткани, г. выполняют структурно-механическую функцию

GOLGI-LATTICE CELL - АППАРАТ ГОЛЬДЖИ — структурный компонент клетки, представляющие собой стопку плоских мешочков — цистерн диаметром около 1 мкм и толщиной 0,02-0,025 мкм, ограниченных мембраной и расположенных параллельно друг другу; число цистерн в диктиосоме 5-7; диктиосома состоит из формирующего полюса, где возникают новые цистерны, и секретирующего полюса, где цистерна распадается и образуются секретирующие пузырьки — лизосомы, содержащие набор гидролитических ферментов, расщепляющих полисахариды, белки и сложные липиды; новые цистерны образуются на формирующем полюсе из элементов эндоплазматической сети; в животных тканях а. г. выполняет секреторную функцию, а в растительных клетках служит центром синтеза, накопления и секреции полисахаридов, которые затем соединяются с белками, формируя гликопротеиды

эндоплазматической сети; в целом функция а. г. заключается во временном хранении и активной переработке продуктов жизнедеятельности клетки

HELICASE - ХЕЛИКАЗЫ — ферменты, расплетающие двойную спираль ДНК и удерживающие ее одиночные цепи от воссоединения

HISTONES-ГИСТОНЫ — небольшие щелочные белки (12-30 кДа), преимущественно расположенные в ядре животных и растений и играющие важную роль в структуре хроматина

HOLOENZYME-ХОЛОФЕРМЕНТ — активная форма фермента, состоящая из кофермента и белка (белковой части фермента)

HORMONES - ГОРМОНЫ — группа биологически активных веществ, синтез которых осуществляется в специализированных эндокринных железах или в тканях. По строению г. можно разделить на пять групп: производные аминокислот и ненасыщенных жирных кислот, пептиды, белки, стероиды; механизм действия г. проявляется через мембранные, внутриклеточные и внутриядерные рецепторные системы; при совместном действии гормонов возможен синергизм (когда действие одного г. усиливается другим гормоном), антагонизм (действие двух гормонов противоположно) или многоступенчатость (действие гормона провоцирует последовательное проявление действия нескольких систем); высокие концентрации г. способны регулировать нормальную деятельность организма, привести к возникновению заболевания

HYDROGEN BOND - ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ — связь, образованная атомом водорода, находящегося между двумя атомами электроотрицательных элементов; в образовании водородной связи участвуют такие электроотрицательные атомы, как кислород, азот, фтор, хлор; энергия водородной связи сравнительно мала (около 40 кДж/моль)

HYDROLASES - ГИДРОЛАЗЫ — класс ферментов, катализирующих расщепление связей с участием молекулы воды в качестве нуклеофила

HYDROPHILIC -ГИДРОФИЛЬНОСТЬ — (гр. гидро — вода, фило — люблю, букв. любящий воду) свойства веществ, материалов интенсивно взаимодействовать с водой, хорошо растворяться в воде

HYDROPHOBIC INTERACTIONS - ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ — тип связей, устанавливаемый при взаимодействии между неполярными группами; г. в. относятся к слабым связям; в белках г. в. формируются между неполярными группами аминокислотных остатков, которые чаще всего локализованы внутри белковой глобулы, избегая контакта с молекулами воды

HYDROPHOBICITY - ГИДРОФОБНОСТЬ — (гр. гидро — вода, фобос — страх, боязнь, букв. боящийся воды) свойства веществ, материалов слабо взаимодействовать с водой, плохо растворяться в воде

ILE - ЖЕЛЧЬ — жидкость, компонентами которой являются желчные кислоты, жирные кислоты, триацилглицериды, фосфолипиды (фосфатидилхолин), билирубин и холестерин; кроме этого, в ж. определяется активность некоторых ферментов (щелочная фосфатаза, амилаза, каталаза, протеазы и оксидазы); в ж. содержатся белки, аминокислоты, углеводы и микроэлементы (железо, магний, медь, цинк, марганец); желчь способна выполнять следующие основные функции: 1) участие в эмульгировании липидов; 2) транспорт липидов по желудочно-кишечному тракту; 3) участие в механизмах всасывания липидов в ЖКТ; 4) нейтрализация соляной кислоты и повышение величины pH в тонком отделе кишечника; 5) активизация липаз, катализирующих гидролиз триацилглицеридов, фосфолипидов и стероидов

IMMUNITY - ИММУНИТЕТ — (от лат. immunitas — освобождение, избавление от чего либо) защитная реакция организма, выражающаяся в невосприимчивости организма к инфекционным агентам и чужеродным веществам; различают естественный или врожденный и. — наследуемый организмом от родителей и искусственный или приобретенный и. — вырабатываемый у человека после перенесенного инфекционного заболевания

INHIBITION - ИНГИБИРОВАНИЕ — процесс, при котором ферментативная реакция в присутствии ингибитора замедляется или полностью останавливается, в зависимости от природы ингибитора и обусловленного им типа ингибирования

INHIBITOR - ИНГИБИТОР — вещество, замедляющее или полностью останавливающее скорость ферментативной реакции, по той или иной причине частично или полностью препятствующее

образованию продуктивного фермент-субстратного комплекса; ингибиторами могут быть лекарственные препараты, яды и другие вещества

ISOENZYMES (ISOZYMES) - ИЗОФЕРМЕНТЫ (ИЗОЭНЗИМЫ) — группа ферментов, выполняющих идентичную каталитическую функцию у одного биологического вида, но отличающихся между собой по структуре и ряду физико-химических свойств (электрофоретическая подвижность, растворимость, каталитические константы) вследствие генетически обусловленных небольших различий в первичной структуре, которые проявляются при формировании нативной структуры ферментов

IZOMERAZY-ИЗОМЕРАЗЫ — класс ферментов, катализирующих внутримолекулярные превращения (рацемизация или эпимеризация); в названии фермента присутствует термин «рацемаза» (аланинрацемаза, метионинрацемаза, гидроксипролинрацемаза, лактатрацемаза и др.), «эпиме-раза» (альдоза-1-эпимераза, рибулозофосфат -4-эпимераза, UDP-глюкуронат -4-эпимераза и др.), «изомераза» (рибозофосфат-изомераза, ксилозофосфат-изомераза, глюкозаминфосфат-изомераза и др.), «таутомераза» (фенилпируваттаутомераза, оксалоацетаттаутомераза), «мутаза*» (фосфоглицератмутаза, метиласпартатмутаза и др.); и. подразделяются на 5 подклассов

LIGASE (SYNTHETASE) - ЛИГАЗЫ (СИНТЕТАЗЫ) — класс ферментов, катализирующих реакции соединения двух и более молекул, используя АТФ; в названии фермента присутствует термин «синтетаза» (тирозил-тРНК-синтетаза, треонин-тРНК-синтетаза, ацетил-КоА-синтетаза, аспарагинсинтетаза, карбамоилфосфат-синтетаза, аргениносукцинатсинтетаза и др.), «карбоксилаза» (пируват- карбоксилаза, ацетил-КоА-карбоксилаза, пропионил-КоА-карбоксилаза и др.); л. подразделяются на 5 подклассов

LIPID PEROXIDATION - ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ — процесс окисления ненасыщенных жирных кислот продуктами свободнорадикального окисления; активно протекает в микросомальных системах печени и других тканях; генерация супероксидного радикала может происходить в результате активности НАДФН-цитохром b5-редуктазы, митохондриальной НАДН-дегидрогеназы, ксантиноксидазы и пероксидазы, а также

фотодинамического действия света на хлорофилл, приводящего к образованию синглетного кислорода или супероксид радикала; процесс начинается стадией инициирования, причем в роли инициаторов в основном выступают супероксидный или гидроксильный радикалы; это наиболее реакционноспособные промежуточные соединения кислорода, обладающие большим сродством к электрону, способные модифицировать молекулы белков, нуклеиновых кислот, разрушать липидные компоненты мембран клеток и т. д.; образовавшиеся радикалы ненасыщенных жирных кислот далее взаимодействуют с кислородом, образуя перекисные радикалы, а те в свою очередь вступают в реакцию с новой молекулой жирной кислоты с образованием свободного радикала и накоплением гидроперекисей липидов (ROOH)

LIPOPROTEINS - ЛИПОПРОТЕИНЫ — сложные липопротеидные комплексы, в составе которых белки (альбумин) и липиды (нейтральные липиды, фосфолипиды, холестерин и его эфиры и др.); различают несколько классов л.: л. высокой плотности (ЛПВП), л. низкой плотности (ЛПНП), л. очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикроны (ХМ)

LIZOSOMY - ЛИЗОСОМЫ — (от греч. lysis — растворение, разложение и soma — тело) органоиды, выполняющие лизирующую, т. е. разрушающую, функцию; размеры л. колеблются от 0,2 до 0,5 мкм; в л. содержится набор гидролитических ферментов, гидролизующих белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, липиды и др. органические соединения при внутриклеточном пищеварении; л. обеспечивают постоянство состава веществ в клетке; участвуют в защите организма против вирусов, бактерий, инородных тел, а также удаляют отжившие клетки и их части; таким образом, л. выполняют в клетке пищеварительную, защитную и выделительную функции

LYASE - ЛИАЗЫ — это класс ферментов, катализирующих реакции разрыва C-C, C-O, C-N и других связей в субстрате без присоединения молекулы воды или окисления; л. отличаются от других ферментов тем, что в катализируемых реакциях в одном направлении участвуют два субстрата, а в обратной реакции только один; в названии фермента присутствуют термины «декарбоксилаза» или «альдолаза» или «лиаза» (пируватдекарбоксилаза, оксалацетатдекарбоксилаза, оксалоацетатдекарбоксилаза, треонинальдолаза,

фенилсеринальдолаза, изоцитратлиаза, аланинлиаза, АТФ-цитратлиаза и др.), а для ферментов, катализирующих реакции отщепления воды от субстрата — «дегидротазы» (карбонатдегидротазы, цитрат-дегидротазы, сериндегидротазы и др.); в тех случаях, когда обнаружена только обратная реакция, или это направление в реакции более существенно, в названии ферментов присутствует термин «синтаза» (малатсинтаза, 2-изопропилмалатсинтаза, цитрат синтаза гидроксиметилглутарил CoA-синтаза и др.); л. подразделяются на 6 подклассов

METABOLIC PROCESS- МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС — совокупность ферментативных реакций, катализирующих последовательное превращение биогенного соединения; регулируемые конечными продуктами по типу обратной связи; к основным м. п. относятся следующие: гликолиз, гликогенолиз, гликонеогенез, гликогенез, пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК), цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), окислительное фосфорилирование, пентозофосфатный путь превращения углеводов (ПФП), липолиз, липогенез, синтез холестерина, синтез и распад триацилглицеридов и фосфолипидов, синтез и распад пуринов и пиримидинов, орнитинный цикл, перекисное окисление липидов, фолдинг, протеолиз, апоптоз, биосинтез ДНК, РНК и белка и др

METABOLISM (METABOLISM) - МЕТАБОЛИЗМ (ОБМЕН ВЕЩЕСТВ) — совокупность биохимических процессов, протекающих в организме и обеспечивающих его жизнеспособность

METABOLITES - МЕТАБОЛИТЫ — промежуточные продукты ферментативных реакций, протекающих в клетке

MICHAELIS CONSTANT (KM) - КОНСТАНТА МИХАЭЛИСА (Km) — константа, по величине которой можно определить сродство субстрата к ферменту, а также возможность образования фермент-субстратного комплекса при протекании каталитического процесса в условиях стационара; кроме этого, к. м. определяется как величина численно равная концентрации субстрата при скорости ферментативной реакции, составляющей половину максимальной (при $V_m/\% K_t$ «Кя»)

MITOCHONDRIA - МИТОХОНДРИИ — (от греч. mitos — нить, chon- drion — зерно, гранула) органеллы, выполняющие энергетические функции в клетке; диаметр м. около 0,1-0,5 мкм,

длина — от 1 до 10 мкм; м. состоят из двух мембран (наружной и внутренней) и внутреннего пространства (матрикса); наружная мембрана м. регулирует поступление и выделение веществ; внутренняя мембрана м. образует к центру складки — кристы (ткани животных) и извилистые трубки в клетках растений, увеличивающих рабочую поверхность, на которой расположены ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции; в матриксе м. находятся ферменты цикла трикарбоновых кислот и ферменты, окисляющие липиды (жирные кислоты); основной функцией м. является синтез АТФ; в матриксе м. находятся рибосомы и молекулы митохондриальной ДНК

MITOCHONDRIA

НЕЗАМЕНИМЫЕ

АМИНОКИСЛОТЫ — кислоты, синтезирующиеся только в растениях и микроорганизмах и не образующиеся в организме животных и человека; к н. а. относятся лизин, аргинин, гистидин, валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, фенилаланин, триптофан

NONCOMPETITIVE

ACTIVATION

НЕКОНКУРЕНТНАЯ АКТИВАЦИЯ — проявляется в случае, если субстрат и активатор связываются независимо в различных участках активного центра фермента; при этом образуется тройной комплекс, фермент субстрат-активатор; связывание активатора ускоряет протекание каталитического процесса

NONCOMPETITIVE INHIBITION - НЕКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ — этот тип ингибирования проявляется в том случае, когда ингибитор и субстрат связываются в разных участках активного центра фермента; однако при связывании ингибитора образуется фермент субстратный комплекс, превращение в котором субстрата становится невозможным

NUCLEIC ACIDS (RNA and DNA) - НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА (РНК И ДНК) — биополимер, в состав которого входят пуриновые и пиримидиновые азотистые основания (аденин, гуанин, цитозин, урацил, тимин), а также моносахариды пентоз (рибоза или дезоксирибоза), связанные между собой остатками фосфорной кислоты

OXIDOREDUCTASE - ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ — класс ферментов, катализирующих реакции окисления и восстановления; оксидоредуктазы подразделяются на 17 подклассов; субстраты оксидоредуктаз являются донорами атомов водорода и электронов

и поэтому ферменты этого класса называются дегидрогеназами или редуктазами (алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, глиоксилатредуктаза, гидроксипируватредуктаза и др.); коферментами оксидоредуктаз могут быть НАД, НАДФ, ФАД, ФМН; к классу оксидоредуктаз принадлежат и оксидазы, в реакциях которых участвует кислород (альдегидоксидаза, ксантинооксидаза, пируватоксидаза, оксалатоксидаза, оксидаза L-аминокислот, аминоксидазы и др.); представителями оксидоредуктаз в молоке являются ферменты пероксидаза, каталаза

OXYHEMOGLOBIN - ОКСИГЕМОГЛОБИН — гемоглобин, в котором атомы железа каждого из гемов обратимо связаны с молекулой кислорода (HbO_2)

PEPTIDE BOND - ПЕПТИДНАЯ СВЯЗЬ — ковалентная полярная связь, образованная между углеродом одной аминокислоты и азотом другой, при соединении двух аминокислот между собой; пептидная связь относится к ковалентной полярной связи, обеспечивает стабильность первичной структуры белков ($-\text{NH}-\text{CO}-$)

PEROXIDASE (EC 1.11.1.7) - ПЕРОКСИДАЗА (КФ 1.11.1.7) — самый распространенный фермент растительных и животных тканей; п. относится к группе двухкомпонентных ферментов (железогликопротеин), в составе которых гемин (протопорфирин IX в комплексе с трехвалентным железом), и полипептидная цепь; п. катализирует реакции оксидазного, оксигеназного и пероксидазного окисления субстратов; в реакциях пероксидазного окисления субстратами фермента могут быть функционально активные вещества (НАДН, гидрохинон, аскорбиновая кислота, о-дианизидин, аминокислоты, флавоноиды, фенолтиазины и др.); оксидазными субстратами п. являются (ИУК, диоксифумаровая кислота, аскорбиновая кислота и др.); основными функциями углеводов, входящих в состав пероксидазы, являются: а) защищать фермент от инактивирующего действия свободных радикалов, образующихся при протекании оксидазных и пероксидазных реакций; б) обеспечивать растворимость фермента в полярных растворителях; в) обуславливать взаимодействие фермента с мембранами и за счет этого встраивать фермент в определенные участки мембран органелл и клетки; г) защищать фермент от инактивирующего действия высоких температур и растворителей

POLYSACCHARIDES - ПОЛИСАХАРИДЫ

высокомолекулярные полимерные производные углеводов, образованные из последовательносоединенных моносахаридов, связанных между собой α -гликозидной связью; основными представителями п. являются крахмал, гликоген, целлюлоза, клетчатка, хитин, агар-агар

PROSTHETIC GROUPS - ПРОСТЕТИЧЕСКАЯ ГРУППА

—низкомолекулярное соединение небелковой природы, прочно связанное с апобелком, выполняющее активную роль в ферментативном катализе, при отсутствии которой фермент неактивен; к п. г. относятся: гем в пероксидазе и каталазе, изоаллоксазиновое кольцо в флавиновых ферментах, а также липоевая кислота и биотин в составе активных центров дигидролипоилацетилтрансферазы и ацетил КоА- карбоксилазы соответственно и др

PROTEIN - БЕЛОК — высокомолекулярное соединение, образованное за счет последовательного соединения α -L-аминокислот в полипептидную цепь, связанных между собой пептидной связью ($-\text{CO}-\text{NH}-$) согласно генетической информации, хранящейся в гене, и обладающий функционально активной третичной или четвертичной структурой; информация о природе аминокислот, последовательности их связывания в полипептидной цепи и количестве передается по следующей цепи: ДНК $\rightarrow$ преРНК $\rightarrow$ мРНК $\rightarrow$ белок

SUBSTRATE - СУБСТРАТ — вещество, которое претерпевает химические изменения в процессе химической реакции, катализируемой ферментом; например, глюкоза является субстратом фермента гексокиназы, пируват — пируват декарбоксилазы, молочная кислота—лактатдегидрогеназы и т. д

TELOMERASE - ТЕЛОМЕРАЗА —(РНК-зависимая ДНК-полимераза или обратная транскриптаза) фермент, синтезирующий tandemно повторяющиеся сегменты ДНК, из которых состоит G-цепь теломерной ДНК

The primary structure of the protein molecule - ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ —последовательное соединение α -L- аминокислот в полипептидную цепь, связанных между собой за счет пептидной связи, согласно генетической информации, заложенной в ДНК

THE TERTIARY STRUCTURE OF PROTEINS - ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА

— определенное расположение полипептидной цепи в пространстве, стабилизированное, в основном, за счет слабых (гидрофобных, гидрофильных и ионных), а также несколькими ковалентными дисульфидными ($-\text{S}-\text{S}-$) связями

TRANSFERASE - ТРАНСФЕРАЗЫ - класс ферментов, катализирующих реакции переноса различных групп (метильные, гидроксиметильные, формильные, карбоксильные, карбамоильные, альдегидные, ацильные, алкильные, аминные и др.) от одного субстрата (донор) к другому (акцептор); в реакциях, катализируемых трансферазами, принимают участие пиридоксальфосфат, биотин, тиаминпирофосфат, 2-аминоаденозин, SH-КоА; название фермента формируется по принципу: акцептор группа трансфераза или донор-группа трансфераза (метионин-метилтрансфераза, тиолметил-трансфераза, серингидрокси- метил-трансфераза, глутамат-формил-трансфераза, холинацил- трансфераза, транскетолаза, трансальдолаза и др.); к этому классу принадлежат ферменты, переносящие гликозильные группы (фосфорилаза, амилосахараза, декстрансахараза и др.); трансферазы представлены 8 подклассами

TRIACYLGLYCEROLS - ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНЫ — (нейтральные липиды) сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот

VITAMINS - ВИТАМИНЫ —группа биологически активных веществ, синтез которых преимущественно происходит в бактериях и растениях, являющихся предшественниками кофакторов или простетических групп; недостаток витаминов вызывает у животных и человека развитие симптомов гипо- и авитаминозов, а их избыток — гипervитаминозы; в. условно можно разделить на растворимые в полярных (водорастворимые: В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₇, В₈, В₁₂, В₁₃, В₁₅, В₁₆, С, Р, РР, Н, U, N, Q) и неполярных (жирорастворимые: А, D, E, К, F) растворителях; в составе ко- ферментов НАД, НАДФ присутствуют остатки витаминов В₅ (никотинамид) и РР (никотиновая кислота); ФМН и ФАД — В₂ (рибофлавин), HSKoA — В₃ (пантотеновая кислота), тиаминпирофосфата — В (тиамин), пиридоксальфосфата — В₆ (пиридоксин); в составе активных центров ферментов содержатся в качестве простетических групп витамины: липоевая кислота у липоатацетилтрансферазы, витамин

Н (биотин) у пируват ацетил КоА-карбоксилаз, витамин К (филлохинон) у филлохинонредуктазы и менадионредуктазы, фолиевая кислота у трансаминаз, В₁₂ (кобаламин) у метилтрансфераз; кроме этого в составе белка родопсина присутствует витамин А (ретинол), участвующий в процессе фоторецепции; антиоксидантные свойства проявляют витамины: Е (токоферолы), Р (биофлавоноиды) и С (аскорбиновая кислота); в переносе ионов кальция участвует витамин D

В п. п. о. у. АТФ не синтезируется и не расходуется

СТРУКТУРА БЕЛКА —упорядоченное пространственное расположение отдельных участков полипептидной цепи, закрученных в форму α -спирали или образующих складчатые слои (β -структура), стабилизированных за счет водородных связей являются ДНК, РНК и белки, комплексы которых обеспечивают протекание в ядре основных трансинформационных процессов; в я. протекают процессы, обеспечивающие удвоение ДНК — репликация и процессы передачи генетической информации с ДНК → преРНК → и-РНК — транскрипция и процессинг

Используемая литература

1. Альбертс Б., Брей Д., Хопкин К., Джонсон А., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уолтер П. Основы молекулярной биологии клетки. — М.: Лабораторные знания. 2018. - 768 с.
2. Берёзов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 1998. 704 с.
3. Биологическая химия с упражнениями и задачами : учебник / под ред. С. Е. Северина, А. И. Глухова. - 3-е изд., стереотипное. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2023. - 624 с.
4. Биохимия: учебник / под ред. Е. С. Северина. - 5-е изд., испр. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 759 с.; ил. - ISBN 978-5-9704-3762-9.
5. Биссвангер Х. Практическая энзимология / Биссвангер, Ханс; пер. с англ. Т.П. Мосоловой. М.: БИНОМ. Лаб.знаний, 2013. — 328 с.
6. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. Учебник. М.: Изд., «Academia», 2005. — 480 с.
7. Гамаюрова В.С. Ферменты (электронный ресурс): лабораторный практикум. Учебное пособие /В.С. Гамаюрова, М.Е. Зиновьева — Электрон.: тестовые данные. — СПб: Проспект Науки, 2017. — 256 с, - Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/35818.html>.
8. Диксон М. Уэбб Э. «Ферменты» в 3-х томах. М.: Мир, 1982.
9. Захаров А.Н. Техника безопасности химических лабораториях. Л.: Химия. 1991. 336 с.
10. Кольман Я. Рём К. —Г. Наглядная биохимия / Пер. с англ. Т. П. Мосоловой. - 6-е изд. - М. : Лаборатория знаний, 2019. - 509 с. : ил. - ISBN 978-5-00101-217-7.
11. Комов В.П., Шведов В.Н. Биохимия. М.: Дрофа, 2008. - 638 с.
12. Коничев А.С. Себастьянова Г.А. Молекулярная биология. М.: Академия, 2003.
13. Коровкин, Б. Ф. Ферменты в жизни человека / Б.Ф. Коровкин. - М.: Медицина, 2016. - 770 с.
14. Кротович В.Л. Введение в энзимологию. М.: Наука, 1988. - 350 с.
15. Ленинджер А. «Основы биохимии» в 3-х томах. М.: Мир, 2015.

16. Лукашева Е.В. Биологические эффекты и молекулярные механизмы действия оксидаз L-аминокислот: Монография / Е. В. Лукашева, В. С. Покровский, Е. М. Трещалина. - Москва : Российский ун-т дружбы народов, 2016. - 199 с.

17. Мирхамидова П., Бабаханова Д.Б., Умарова Г.Б., Кадырова Д.А. Биологическая химия. Т.: Изд. «Навруз». 2018. - 366 с.

18. Мирхамидова П., Шахмурова Г.А., Туйчиева Д.Х., Махмудова К.Х. Молекулярная биология (лабораторный практикум). Т.: «BOOKMANY PRJNT». 2023. -278 с.

19. Мухамедов Г.И., Мирхамидова П., Отажоннова Д. Практикум по биологической химии. Т.: Изд. «Malik PRJNTCO». 2022. - 250 с.

20. Наumenко О. А. Основы строения и кинетики ферментов в биологических системах: учебное пособие [Электронный ресурс] / Оренбург:ОГУ, 2017. -183 с. - 978-5-7410- 1666-4. <http://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=469374>

21. Наumenко, О.А. Инженерная энзимология: методические указания / О.А. Наumenко; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург: ОГУ, 2018. - 33 с.

22. Плакунов В.К. Основы энзимологии [Электронный ресурс] / В.К. Плакунов. — Электрон. текстовые данные. — М. : Логос, 2011. — 127 с. — 5-94010-027-9. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/70702.html>

23. Плакунов В.К. Основы энзимологии. Изд. «Логос» - 2001. - 129 с.

24. Плакунов В.К. Основы энзимологии: учебное пособие. Москва: Логос, 2002. 127 с. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=84687>

25. Покровский В.С. Биохимия человека. Обмен липидов. Учебное пособие. Е-noto. Москва. 2023. -495 с.

26. Покровский В.С. Биохимия человека. Обмен углеводов. Учебное пособие. Е-noto. Москва. 2023. -357 с.

27. Рогожин В.В. Практикум по биохимии. Учебное пособие. – СПб.: Издательство "Лань", 2021.- 544с.

28. Уильсон К., Дж.Уолкер. Принципы и методы биохимии и методы молекулярной биологии. Изд.-во. «Бином. Лаборатория знаний». Москва. 2013. - 848 с.

29. Ферментативная регуляция метаболизма: учебное пособие / Т. Н. Попова [и др.] - Воронеж : Изд. дом ВГУ, 2014. - 143 с. : ISBN 978-5-9273-2111-7

30. Фершт, Э. Структура и механизм действия ферментов / Э. Фершт. - Москва: СПб. [и др.] : Питер, 2014. - 432 с.

31. Филиппович Ю.Б. Биохимические основы жизнедеятельности человека / Ю.Б. Филиппович, А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова, Н.М. Кутузова – М.: Владос, 2005. -407 с.

32. Цыперович, А. С. Ферменты / А.С. Цыперович. - М.: Техника, 2016. - 360 с.

33. Частная биохимия. Учебное пособие. Под редакцией В.С.Покровского. Е-noto. Москва. 2020. -367 с.

34. Чернов Н.Н., Березов Т.Т., Лукашева Е.В., Смирнова И.П., Сяткин С.П., Калинина Е.В., Кузнецова О.М., Рыскина Е.А., Лобаева Т.А. Биохимия : практикум для студентов специальностей "Лечебное Дело" и "Фармация" // Учебник/учебное пособие. Ростов-на-Дону. Феникс. 2016. 205 с.

35. Шлейкина А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Прикладная энзимология. Учебное пособие. Университет ИТМО. Санкт-Петербург. 2019. -161 с.

36. Palmer, Tr. Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry / Tr. Palmer, Ph. L. Bonner – Woodhead Publishing, 2007. – 432 p. 71.

37. Yon-Kahn, J. Molecular and Cellular Enzymology / J. Yon-Kahn, G. Hervé. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. – 822 p.

Мирхамидова П., Шахмурова Г.А., Покровский В.С.

ЭНЗИМОЛОГИЯ

Учебное пособие

Издательство “Bookmany print”

Лицензия № 022246. 28.02.2022 г.

Подписано к печати 09.08.2024 г.

Гарнитура “Times New Roman”. Формат 60x84¹/₁₆.

учет-изд. л. 11,9, услов. печ. л. 12,7.

Печать офсетная. Тираж 100 экз.

г.Ташкент, Учтепинский р., 22-квартал, дом 17-б.

Отпечатано в типографии ООО “BOOKMANY PRINT”.

г.Ташкент, Учтепинский р., 22-квартал, дом 17-б.

