

Подписано электронной подписью:
Вержицкий Данил Григорьевич
Должность: Директор КГПИ ФГБОУ ВО «КемГУ»
Дата и время: 2024-02-21 00:00:00
471086fad29a3b30e244c728abc3661ab35c9d50210dcf0e75e03a5b6fdf6436

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Кемеровский государственный университет»
Новокузнецкий институт (филиал)
Кафедра естественнонаучных дисциплин

Жукова А.Г., Горохова Л.Г.

БИОХИМИЯ

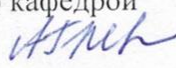
Методические указания по работе на лабораторных занятиях
для обучающихся по направлению подготовки 44.03.05 Педагогическое
образование (с двумя профилями подготовки),
направленность (профиль) подготовки
«Биология и Химия», «География и Биология»

Новокузнецк – 2020

Жукова А.Г., Горохова Л.Г.

Биохимия: методические указания по работе на лабораторных занятиях для студентов обучающихся по направлению подготовки 44.03.05 Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки), направленность (профиль) подготовки «Биология и Химия», «География и Биология/ А.Г. Жукова, Л.Г. Горохова; Новокузнецк; НФИ КемГУ, 2020. – 51 стр.

В работе изложены методические рекомендации для студентов по работе на лабораторных занятиях в рамках изучения дисциплины «Биохимия».

Рекомендовано
на заседании кафедры
естественнонаучных дисциплин
протокол №9 от 15 мая 2020 г.
И.о. заведующего кафедрой
А.Г. Жукова 

Утверждено
методической комиссией факультета физи-
ческой культуры, естествознания и приро-
допользования
« 05 » октября 2020 г.
Председатель комиссии Н. Т. Егорова


© Жукова А.Г., Горохова Л.Г.
© Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Кемеровский государственный университет»
Новокузнецкий институт (филиал), 2020

Текст представлен в авторской редакции

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Вопросы к экзамену	5
Темы рефератов	7
ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ	10
Практическая работа № 1. Химический состав живых организмов. Количественное определение ионов хлора, кальция и магния в биологических жидкостях	10
Семинар № 1. Биохимия живых организмов	15
Практическая работа № 2. Строение белков. Цветные реакции на белки	15
Практическая работа № 3. Методы разделения белков сыворотки крови	17
Практическая работа № 4. Определение активности ферментов сыворотки крови – аланинаминотрансферазы	20
Практическая работа № 5. Количественное определение активности α -амилазы сыворотки крови	23
Семинар № 2. Матричный биосинтез полимеров	24
Практическая работа № 6. Обмен углеводов. Определение глюкозы	25
Семинар № 3. Биосинтез и распад нуклеотидов	27
Практическая работа № 7. Обмен простых белков. Определение креатинина и мочевины	27
Семинар № 4. Роль свободнорадикальных процессов в организме	31
Практическая работа № 8. Обмен сложных белков. Определение концентрации гемоглобина и билирубина	31
Итоговый тест по биологической химии	37

ВВЕДЕНИЕ

Настоящий лабораторный практикум по биологической химии адресован студентам биологических факультетов педагогических вузов и написан в соответствии с Государственным образовательным стандартом высшего профессионального образования.

Биологическая химия является одной из базовых составляющих подготовки будущего учителя биологии. Содержание этого курса направлено на формирование научного мировоззрения и создание единой научной картины окружающего мира; обусловлено кругом задач, которые рассматриваются в дисциплинах естественнонаучного цикла и необходимостью установления межпредметных связей.

Основной целью биохимического образования для будущего учителя биологии является формирование понятий о химическом составе организмов, основных биохимических процессах в клетках и методах их исследования. Поэтому основные задачи дисциплины, следующие:

- 1) сформировать понимание значимости биологической химии в естественнонаучном образовании будущего учителя биологии и географии;
- 2) ознакомить с современными методами исследования биополимеров;
- 3) сформировать представление об основных биохимических путях и циклах;
- 4) ознакомить с примерами применения современных методов биохимии в различных областях биологии, а также медицине, сельском хозяйстве и др.;
- 5) сформировать умения применять полученные знания к различным областям школьного курса биология.

Студент, изучивший дисциплину, должен:

знать – химический состав живых организмов; современные методы биохимических исследований; основные классы химических соединений, входящих в состав живых организмов; основные пути метаболизма в живых организмах; основы биологического окисления;

основы биосинтеза биополимеров; механизмы действия гормонов; уровни регуляции обмена веществ в организме;

уметь:

– оперировать знаниями об основных субклеточных компонентах (структуре и свойствах белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов); о метаболических путях в живых организмах и принципах регуляции метаболизма; о путях синтеза макромолекул (белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов).

– проводить химический эксперимент по определению качественного и количественного состава различных биологических жидкостей, отдельных внутриклеточных компонентов.

– ориентироваться в специальной литературе по профилю подготовки и смежным вопросам; осуществлять научно-исследовательскую и методическую деятельность;

владеть:

– учебно-лабораторным оборудованием, техническими средствами обучения и современной электронно-вычислительной техникой;

– умениями пользоваться предметным и именным указателями при работе с учебно-методической и научной литературой;

– умениями конспектировать текст, готовить рефераты и курсовые работы;

– умениями составлять схемы, таблицы на основе работы с текстом учебника и дополнительными источниками информации.

ВОПРОСЫ К ЭКЗАМЕНУ.

1. Биохимия как базовая составляющая современной физико-химической биологии. Основные этапы в истории развития биохимии. 2. Обмен веществ и энергии в живых системах. Химический состав организмов. Потребность организмов в химических элементах.

3. Основные типы химических связей в живых организмах. Основные неорганические соединения, содержащиеся в живых организмах.

4. Углеводы – состав, структура, функции.
5. Липиды. Основные классы липидов. Биологическая роль липидов.
6. Аминокислоты – мономеры белковых молекул. Строение L-аминокислот. Классификация аминокислот. Редкие аминокислоты, входящие в состав белков. Аминокислоты, не входящие в состав белков.
7. Кислотно-основные свойства аминокислот на примере аланина.
8. Химические реакции аминокислот. Пептидная связь.
9. Структурные уровни белковых молекул. Функции белков.
10. Ферменты. Классификация и номенклатура ферментов.
11. Кофакторы ферментов. Металлы в качестве кофакторов. Коферменты.
12. Химическая кинетика ферментативных реакций. Энергия активации.
13. Зависимость ферментативной активности от температуры и pH.
14. Уравнение Михаэлиса-Ментен.
15. Ингибирование ферментов (обратимое – конкурентное и неконкурентное, необратимое).
16. Витамины, их роль в жизнедеятельности. Классификация витаминов. Авитаминозы.
17. Жирорастворимые витамины, их биомедицинское значение.
18. Водорастворимые витамины, их биомедицинское значение.
19. Обмен белков. Расщепление полипептидов до свободных аминокислот. Катаболизм углеродного скелета аминокислот.
20. Переаминирование, окислительное дезаминирование. Образование аммиака. Цикл мочевины.
21. Синтез заменимых аминокислот. Образование специализированных продуктов из аминокислот.

22. Строение нуклеиновых кислот. Азотистые основания.
23. Структура хроматина. Уровни компактизации ДНК.
24. Репликация ДНК.
25. Транскрипция.
26. Виды РНК, их особенности.
27. Трансляция.
28. Регуляция транскрипции и трансляции у прокариот.
29. Гликолиз. Основные этапы гликолиза. Энергетический баланс гликолиза.
30. Цикл трикарбоновых кислот. Энергетический баланс цикла трикарбоновых кислот.
31. Цепь переноса электронов. Организация дыхательной цепи в митохондриях.
32. Дыхательный контроль. Ингибиторы дыхательной цепи.
33. Гликогенез и гликогенолиз.
34. Глюконеогенез.
35. β -окисление насыщенных и ненасыщенных жирных кислот.
36. Синтез насыщенных жирных кислот. Синтез ненасыщенных жирных кислот.
37. Роль свободнорадикальных процессов в клетке.
38. Антиоксидантная защита клетки.
39. Гормоны. Химическая классификация гормонов. Молекулярные механизмы действия гормонов. Вторичные посредники.
40. Взаимосвязь обмена белков, углеводов и липидов.
41. Уровни регуляции обмена веществ.

ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ

1. Аминокислоты и пептиды в промышленности и медицине.
2. Белки и их функции в организме.
3. Классификация простых, сложных белков и их биологическая роль.

4. Локализация ферментов в клетке. Регуляция метаболизма ферментами.
5. Витамины, классификация, номенклатура, биологическая роль. Коферментная функция витаминов.
6. Важнейшие моносахариды и их производные (альдоновые и уроновые кислоты, сахароспирты, аминосахара, гликозиды и др.). Биологическое значение моносахаров и их производных.
7. Олигосахариды. Номенклатура и классификация. Характеристика биологически важных олигосахаридов.
8. Полисахариды (структурные и резервные). Гомо- и гетерополисахариды и их биологическая роль.
9. Нейрогуморальная регуляция углеводного обмена.
10. Фосфо-, сфинго- и гликолипиды. Биологическая роль.
11. Структура, свойства и функции биомембран. Роль липидов и белков в их строении.
12. Механизмы мембранного транспорта (активный и пассивный трансмембранный перенос).
13. Липопroteины плазмы крови. Состав, структура и биологическая роль.
14. Регуляция липидного обмена.
15. Гормоны (классификация, механизм действия), биологическое значение.
16. Пептидные гормоны. Характеристика важнейших представителей. Механизм действия пептидных гормонов.
17. Современные представления о структуре гена.
18. Полуконсервативный механизм биосинтеза ДНК (современное представление). Ферменты, обеспечивающие этот процесс.
19. Общее представление о биосинтезе РНК. Транскрипция у прокариот. Особенности транскрипции у эукариот.
20. Уровни регуляции жизненных процессов в живой природе.
21. История открытия и изучения нуклеиновых кислот. Роль русских учёных.
22. Нейрогуморальная регуляция углеводного обмена.

23. Циклические нуклеотиды (цАТФ, цГТФ) и их биологическая роль.
24. Значение глобулярных и фибриллярных белков в живой природе.
25. Белки-рецепторы и рецепторная функция плазматической мембраны.

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 1.

ТЕМА: Химический состав живых организмов. Количественное определение ионов хлора, кальция и магния в биологических жидкостях.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Ознакомиться с методами количественного определения ионов хлора, кальция и магния в сыворотке крови.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ: спектрофотометр, реактивы для фотометрического определения ионов хлора, кальция и магния, стандартные растворы ионов хлора, кальция и магния, сыворотка, штатив с пробирками, капельницы и пипетки.

Роль минеральных элементов многообразна. Они участвуют в регуляции осмотического давления в биологических жидкостях и тканях, в поддержании кислотно-щелочного равновесия, участвуют в нервно-мышечном возбуждении. Минеральные вещества используются как пластический материал в образовании костной ткани. Они влияют на проницаемость клеточных мембран и сосудов. Ионы выполняют важные функции в создании устойчивости биологических коллоидных систем, активируют ряд ферментов.

Работа № 1. Определение ионов хлора.

Хлор тесно связан с обменом натрия, калия и кальция. Хлористый натрий – основная часть минеральных веществ крови. Он играет важную роль в создании осмотического давления. Ион хлора легко проникает через полупроницаемые клеточные мембраны и тем самым поддерживает постоянное осмотическое давление внутри клетки. Хлористый натрий играет существенную роль в образовании соляной кислоты в желудочном соке, участвует в процессах обмена, активации амилазы слюны и панкреатического сока.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Хлорид-ионы в кислой среде высвобождают из роданида ртути (II) ионы роданида, которые образуют окрашенный продукт с ионами

железа (III). Интенсивность окраски образовавшегося роданида железа (III) прямо пропорциональна концентрации хлорид-ионов и измеряется фотометрически.

ХОД РАБОТЫ.

1. Во все пробирки внести по 2 мл рабочего реактива.
2. В пробирку №1 добавить 20 мкл дистиллированной воды (контрольная проба).
3. В пробирку № 2 добавить 20 мкл стандарта.
4. В остальные пробирки добавить по 20 мкл исследуемой сыворотки.

Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют 5 минут при температуре 20-25°C. Измеряют оптическую плотность проб против контрольной пробы при длине волны 490 нм.

Расчет: $C \text{ пробы} = A \text{ пробы} / A \text{ стандарта} \cdot C \text{ стандарта} (100 \text{ ммоль/л})$

Нормальные величины: сыворотка/плазма – взрослые 97-108 ммоль/л; дети: 95-112 ммоль/л; моча: 120-240 ммоль/24 часа

Работа №2. Определение концентрации кальция.

Основные функции кальция заключаются в следующем:

- 1) соли кальция образуют минеральный компонент костей;
- 2) ионы Ca^{2+} являются кофакторами многих ферментов и неферментных белков;
- 3) ионы Ca^{2+} при взаимодействии с белками-модуляторами (кальмодулином и рядом других Са-связывающих белков) служат посредником в передаче сигналов, регулирующих многие биохимические процессы и физиологические функции.

В организме взрослого человека содержится около 1,2 кг кальция, который образует два неравных фонда. Один из них – это кальций костей (в состав костей входит 99% всего кальция организма). Другой фонд кальция в организме – это ионы Ca^{2+} , растворенные в

жидкостях или соединенные с белками жидкостей и тканей. Между этими фондами происходит постоянный обмен кальцием.

Концентрация ионов кальция в межклеточной жидкости и крови равна 2,5 ммоль/л, а во внутриклеточной жидкости – в тысячу раз меньше. Благодаря такой разнице небольшие изменения проницаемости клеточной мембраны могут привести к многократным изменениям концентрации Ca^{2+} в клетки. Разность концентраций создается главным образом ферментом Са-АТФазой, который имеется в плазматической мембране и в мембранах эндоплазматического и саркоплазматического ретикулумов. Кроме того, в регуляции внутриклеточной концентрации кальция участвует система ионных каналов: Na^+ , Ca^{2+} обменники, H^+ , Ca^{2+} -обменники, ионные каналы, пропускающие Ca^{2+} по градиенту концентрации.

Для регуляции внутриклеточной концентрации кальция необходима его высокая и стабильная концентрация в крови и межклеточной жидкости, а в последней она регулируется эндокринными гормонами, основные из которых – паратгормон, кальцитонин и кальцитриол.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Ионы кальция в щелочной среде образуют фиолетовый комплекс с о-крезолфталейном комплексом. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации кальция в пробе.

ХОД РАБОТЫ.

1. Во все пробирки внести по 1 мл рабочего реактива № 1 и по 1 мл рабочего реактива № 2.
2. В пробирку № 1 добавить 50 мкл дистиллированной воды (контрольная проба).
3. В пробирку № 2 добавить 50 мкл стандарта.
4. В остальные пробирки добавить по 50 мкл исследуемой сыворотки.

Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют 5 минут при температуре 20-25°C. Измеряют оптическую плотность проб против контрольной пробы при длине волны 570 нм.

Расчет: $C \text{ пробы} = A \text{ пробы} / A \text{ стандарта} \cdot C \text{ стандарта}$ (2,5 ммоль/л)

Нормальные величины: сыворотка/плазма – новорожденные 2,0-3,25 ммоль/л; дети 2,5-3,0 ммоль/л; взрослые 2,25-2,75 ммоль/л

Работа №3. Определение ионов магния с реактивом ксилидил голубой.

Магний в растениях входит в состав хлорофилла. В животном организме магний в виде фосфатов и карбонатов находится в костной ткани. Магний встречается в жидкостях и тканях, как в свободном виде, так и связанный с белками. Ион магния играет существенную роль как кофактор, который определяет активность многих ферментов, катализирующих распад углеводов (для процессов брожения и гликолиза, цикла Кребса), мочевинообразования и необходим для действия фосфатаз. Ионы магния участвуют в биосинтезе белка. Магний является антагонистом кальция. Магний действует угнетающим образом на нервную систему (усиливая процессы торможения в коре головного мозга).

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Магний, присутствующий в сыворотке крови и в других биологических жидкостях образует растворимый красный комплекс со щелочным раствором ксилидила голубого. Интенсивность окраски магниевого комплекса пропорциональна концентрации магния и может быть использована для фотометрического определения.

ХОД РАБОТЫ.

1. Во все пробирки внести по 2 мл рабочего реактива.

2. В пробирку №1 добавить 20 мкл дистиллированной воды (контрольная проба).

3. В пробирку № 2 добавить 20 мкл стандарта.

4. В остальные пробирки добавить по 20 мкл исследуемой сыворотки.

Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют 5 минут при температуре 20-25°C. Измеряют оптическую плотность проб против контрольной пробы при длине волны 520 нм.

Расчет: $C \text{ пробы} = A \text{ пробы} / A \text{ стандарта} \cdot C \text{ стандарта}$ (0,82 ммоль/л)

Нормальные величины: сыворотка/плазма 0,8-1,0 ммоль/л; ликвор 1,0-1,5 ммоль/л; моча 0,4-4,1 ммоль/л; моча/24 часа 2,0-6,3 ммоль/л.

Задачи для самостоятельного решения.

№ 1. Какие химические элементы входят в состав клетки? Какие химические элементы, содержащиеся в клетке, являются органогенами; какие – макроэлементами; какие микроэлементами?

№ 2. Какую роль в жизнедеятельности клетки играют соли азота, фосфора, калия, натрия?

№ 3. Какие органические соединения входят в состав клетки и их биологическая роль?

№ 4. Какие типы слабых связей используются в биологических системах, и каковы их энергетические характеристики? Почему для образования этих связей не нужен ферментативный катализ? Каково значение слабых связей?

№ 5. Единичная молекула ДНК в хромосоме *Escherichia coli* содержит около 4,5 млн мононуклеотидных единиц; длина каждой из них составляет приблизительно 0,34 нм. Вычислите общую длину этой молекулы ДНК и сравните ее с длиной клетки *Escherichia coli* (длина клетки *Escherichia coli* равна 2 мкм (или 2000 нм)).

СЕМИНАР № 1.

ТЕМА: Биохимия живых организмов.

ВОПРОСЫ.

1. Биосистемы и второй закон термодинамики.
2. Роль энтропии в биосистемах.
3. Элементный состав живых организмов.
4. Основные типы нековалентных взаимодействий в живых организмах (электростатическое притяжение, водородные связи, вандер-ваальсовы взаимодействия, гидрофобные взаимодействия, стеккинг-взаимодействия).
5. Значение нековалентных связей для функционирования живых организмов.
6. Характеристика основных классов органических соединений (белки, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты), представленных в природе, их биологическая роль.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 2.

ТЕМА: Строение белков. Цветные реакции на белки. Для обнаружения и изучения химического состава белков существует две группы реакций: цветные и реакции осаждения.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Ознакомиться с методами количественного определения общего белка и одной из белковой фракций сыворотки крови – альбумина.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ: спектрофотометр, стандартные растворы альбумина и белка, сыворотки крови, биуретовый реактив, реактив бромкрезоловый зеленый, штатив с пробирками, пипетки.

Работа № 1. Определение общего белка биуретовой реакцией.

При взаимодействии белка с отдельными химическими веществами возникают окрашенные продукты реакции. Образование их обусловлено присутствием в молекуле белка определенной химической группы, либо определенной химической связи. Значение цветных реакций состоит в том, что они дают возможность установить

белковую природу вещества. На основании цветных реакций разработаны методы количественного определения белков.

Биуретовую реакцию способны дать вещества, которые содержат не менее двух пептидных связей ($-\text{CO} - \text{NH}-$). При добавлении сернокислой меди к сильнощелочному раствору белка или полипептида образуются комплексные соединения меди с пептидной группировкой, окрашенные в красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет в зависимости от длины полипептидной цепи. Раствор белка дает сине-фиолетовое окрашивание, а продукты его неполного гидролиза – розовое или красное окрашивание.

Для пептидной связи характерна кето-енольная таутомерия, которая показана на схеме:

ХОД РАБОТЫ.

1. В каждую из трех пробирок отмерить по 2 мл биуретового реактива.
2. В пробирку №1 добавить 40 мкл дистиллированной воды (контрольная проба), в пробирку №2 – 40 мкл стандарта.
3. В остальные пробирки добавить по 40 мкл исследуемой сыворотки.

Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют 5 минут при температуре 20-25°C. Измеряют оптическую плотность проб против контрольной пробы при длине волны 540 нм. Содержимое пробирок приобретает сине-фиолетовый цвет. Интенсивность фиолетовой окраски пропорциональна содержанию белка в исследуемой пробе.

Расчет: $C \text{ пробы} = A \text{ пробы} / A \text{ стандарта} \cdot C \text{ стандарта}$ (80 г/л) **Нормальные значения:** 62-85 г/л.

Работа № 2. Определение альбумина с бромкрезоловым зеленым.

Альбумин – это основная фракция белков плазмы крови. На его долю приходится более 50% всех содержащихся в плазме белков. Поскольку молекулы альбумина принимают активное участие в связывании воды, при падении его уровня ниже 30 г/л (норма 35-55 г/л),

часть его перемещается из сосудистого русла в ткани, вызывая отеки. Альбумин синтезируется в печени. Обладает способностью к связыванию неорганических ионов (кальция, магния, цинка), метаболитов (жирных кислот, билирубина, мочевой кислоты), гормонов (тироксина, трийодтиронина), лекарственных препаратов (салицилатов, барбитуратов, антибиотиков).

ПРИНЦИП МЕТОДА.

При взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым в кислой среде образуется окрашенный комплекс сине-зеленого цвета.

ХОД РАБОТЫ.

1. В каждую из трех пробирок отмерить по 2 мл реактива бромкрезолового зеленого.
2. В пробирку №1 добавить 10 мкл дистиллированной воды (контрольная проба), в пробирку №2 – стандарта 10 мкл.
3. В остальные пробирки добавить по 10 мкл исследуемой сыворотки.

Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют 5 минут при температуре 20-25°C. Измеряют оптическую плотность проб против контрольной пробы при длине волны 628 нм. Содержимое пробирок приобретает сине-зеленый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию альбумина в исследуемой пробе.

Расчет: $C \text{ пробы} = A \text{ пробы} / A \text{ стандарта} \cdot C \text{ стандарта}$ (60 г/л) **Нормальные значения:** 35-50 г/л.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 3.

ТЕМА: Методы разделения белков сыворотки крови.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Ознакомиться с методами разделения белковых фракций сыворотки крови.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ: спектрофотометр, основной раствор фосфатного буфера, разведенные растворы фосфатного буфера (I-V), сыворотка крови, штатив с пробирками, пипетки.

К основным методам фракционирования белков сыворотки крови можно отнести высаливание нейтральными солями, электрофорез, хроматографию, иммунологическое разделение. Наиболее приемлемыми и информативными в настоящее время являются электрофоретические методы разделения белков, тем не менее, часто в лабораториях используются методы, связанные с осаждением белковых фракций с помощью фосфатных солей (турбидиметрический метод).

Работа № 1. Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза.

Под электрофорезом понимают движение заряженных частиц в постоянном электрическом поле. В случае электрофореза белков сыворотки крови последние, обладая определенным зарядом, двигаются в электрическом поле к аноду или катоду.

В практике клинико-диагностических лабораторий наиболее часто используют буферные системы с $pH=8,6$, поэтому белки сыворотки крови будут заряжаться отрицательно и двигаться к аноду. В зависимости от величины заряда и молекулярной массы белки сыворотки крови при использовании в качестве поддерживающей среды пленки из ацетата целлюлозы разделяются на пять основных фракций: альбумины, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины. При дальнейшей обработке красителями белки связываются с ними пропорционально своей концентрации. Определив интенсивность окрашивания, можно вычислить концентрацию белковых фракций.

Процентное соотношение белковых фракций в норме составляет: альбумины – 56,5-66,8%; α_1 -глобулины – 3,0-5,6%; α_2 -глобулины – 6,9-10,5%; β -глобулины – 7,3-12,5%; γ -глобулины – 12,8-19,0%.

Проведение электрофореза в полиакриламидном геле позволяет получить до 20 и более белковых фракций.

Работа № 2. Определение белковых фракций сыворотки крови турбидиметрическим методом.

Принцип метода основан на способности фосфатных растворов определенной концентрации, осаждать с образованием очень мелкой взвеси различные белковые фракции сыворотки крови. По степени мутности растворов, устанавливаемой с помощью спектрофотометра, судят о концентрации белка в исследуемом материале.

ХОД РАБОТЫ.

1. В пробирку № 0 вносят 3,75 мл основного фосфатного буфера, 0,75 мл дистиллированной воды и 0,5 мл сыворотки.
2. В пробирки №№ 1, 2, 3, 4, 5 вносят по 2,5 мл растворов I, II, III, IV и V.
3. В пробирки №№1, 2, 3, 4 и 5 добавляют по 0,5 мл раствора из пробирки №0.

Содержимое пробирок становится мутным. Интенсивность мутности пропорциональна содержанию белковых фракций в исследуемой пробе.

Задачи для самостоятельного решения.

№ 1. Изобразите структуру аминокислоты, у которой боковая цепь:

- а) атом водорода;
- б) алифатическая гидрофобная;
- в) ароматическая гидрофобная;
- г) кислая;
- д) основная.

№ 2. От каких аминокислотных остатков зависит суммарный заряд белковой молекулы, содержащей все 20 аминокислот?

№ 3. Какую функциональную роль в структуре белка играют α -спирали и β -слои?

№ 4. Объясните, что такое денатурация белка.

№ 5. Какие функции белков Вам известны, кратко опишите их.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 4.

ТЕМА: Определение активности ферментов сыворотки крови – аланинаминотрансферазы.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Ознакомиться с методами количественного определения активности ферментов.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ: биохимический анализатор, наборы реактивов для определения активности АЛАТ, сыворотка, секундомер, пипетки.

Ферменты – самый крупный и наиболее высокоспециализированный класс белковых молекул. Именно они катализируют тысячи химических реакций, из которых, в конечном счете, складывается клеточный метаболизм. Действуя в строго определенной последовательности, ферменты катализируют расщепление молекул питательных веществ, обеспечивают запасание и преобразование химической энергии, а из простых молекул-предшественников строят макромолекулы, входящие в состав клетки. Практически все физиологические процессы в организме обеспечиваются каталитическим действием определенных ферментов. Значение последних образно определил И.П. Павлов, назвав их «возбудителями жизни».

Ферменты в отличие от органических или неорганических веществ присутствуют в клетках в чрезвычайно малых количествах, и определение их содержания в тканевых экстрактах или жидкостях представляет особую проблему. Чтобы оценить количество фермента в пробе тканевого экстракта или биологической жидкости, измеряют скорость реакции, катализируемой содержащимся в этой пробе ферментом. При определенных условиях измеряемая скорость пропорциональна количеству присутствующего фермента.

Работа № 1. Определение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови унифицированным методом Райтмана-Френкеля.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Аланинаминотрансфераза (АлАТ) катализирует обратимое трансаминирование L-аланина в L-глутамат с образованием пировиноградной кислоты. Пировиноградная кислота взаимодействует с 2,4динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) в щелочной среде с образованием динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты красного цвета. Интенсивность окраски пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты. По количеству образованной пировиноградной кислоты судят об активности АлАТ.

АлАТ L-Аланин + α-кетоглутарат ↔ L-глутамат + пируват

АлАТ в высоких концентрациях присутствует в клетках печени и в меньшей степени в скелетных мышцах, почках и сердце.

ХОД РАБОТЫ.

1. Построить калибровочный график.

Схема разведения стандартного раствора пирувата (1,0 ммоль/л).

N	Стандартный раствор пирувата	H ₂ O	Раствор 2,4-ДНФГ	Содержание пирувата в пробе	Активность АлАТ (С)	
	мл	мл	мл	нмоль	мкмоль/(с*л)*	ммоль/(ч*л)
1.	0,05	0,55	0,5	50	0,278	1,0
2.	0,10	0,50	0,5	100	0,556	2,0
3.	0,15	0,45	0,5	150	0,834	3,0
4.	0,20	0,40	0,5	200	1,112	4,0
5.	0,25	0,35	0,5	250	1,390	5,0
6.	0,30	0,30	0,5	300	1,668	6,0
контроль	-	0,60	0,5	-	-	-

2. Через 20 минут (20-25°C) в пробирки внести по 5 мл 0,4 моль/л раствора NaOH и через 5-10 минут измерить оптическую плотность против дистиллированной воды при длине волны 530 нм.

3. Схема опыта.

Поместить в пробирки	Опытная проба, мл	Холостая проба, мл
Субстратно-буферный раствор	0,5	0,5
Сыворотка крови	0,1	-
Инкубировать в термостате при 37 °C 30 мин		
Раствор 2,4-ДНФГ	0,5	0,5
Сыворотка	-	0,1

4. Через 20 минут (20-25°C) в пробирки внести по 5 мл 0,4 моль/л раствора NaOH и через 5-10 минут измерить оптическую плотность против холостой пробы при длине волны 530 нм.

5. Расчет активности фермента в сыворотке крови производят по калибровочному графику, показывающему зависимость оптической плотности от содержания пировиноградной кислоты.

а) Рассчитать по калибровочному графику коэффициент k :

$k = C/E$, $E = (E_{np} - E_k)$, где: E_{np} – экстинкция калибровочной пробы, E_k – экстинкция контроля, C – активность АЛАТ в мкмоль/(с*л) или ммоль/(ч*л) в калибровочной пробе.

б) Активность АЛАТ рассчитывается в мкмоль/(с*л) или ммоль/(ч*л) по формуле: $C_{АЛАТ} = E_{np} * k$, где: k – коэффициент, рассчитанный по калибровочному графику, E_{np} – экстинкция опытной пробы, измеренной против холостой пробы.

Нормальные величины в сыворотке/плазме: 0,1 – 0,68 ммоль/(ч*л) или 0,028 – 0,19 мкмоль/(с*л) при 37 °C.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 5.

ТЕМА: Количественное определение активности α -амилазы сыворотки крови.

О количестве фермента судят по производимому им действию. За единицу активности (Е) любого фермента принимают то его количество, которое обеспечивает превращение 1 мкмоль субстрата (уменьшение его количества) или образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при заданных условиях.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Ознакомиться с методом количественного определения активности α -амилазы сыворотки крови (метод Каравея).

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ: биохимический анализатор, 0,1% раствор крахмала, фосфатный буфер pH 7,3, 3% раствор NaCl, рабочий раствор люголя, 1 н. соляная кислота, сыворотка.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

α -Амилаза – фермент, относящийся к группе гидролаз и осуществляющий расщепление гликогена и крахмала до моно- и дисахаридов (мальтозы, глюкозы). Наиболее богаты им поджелудочная и слюнные железы. Высокую амилолитическую активность проявляют также фаллопиевы трубы, кишечник, печень, почки, легкие, жировая ткань. В физиологических условиях α -амилаза сыворотки представлена на 40% панкреатической амилазой и на 60% амилазой слюнных желез.

Крахмал в присутствии ионов йода окрашивается в синефиолетовый цвет. α -Амилаза осуществляет гидролиз крахмала с образованием продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Об активности фермента судят по уменьшению концентрации крахмала.

ХОД РАБОТЫ.

1. В опытную и контрольную пробирки вносят по 0,5 мл субстратно-буферного раствора. Прогреть при 37°C 5 мин.
2. В опытную пробирку добавить 0,01 мл сыворотки. Перемешать и инкубировать 37°C 5 мин.

3. В каждую пробирку добавить 4 мл 1 н. соляной кислоты.
4. В каждую пробирку добавить 0,30 мл рабочего раствора йода.
5. В контрольную пробирку добавить 0,01 мл сыворотки.

После добавления всех реагентов опытные и контрольные пробы перемешивают и измеряют экстинцию на фотоэлектроколориметре против воды при длине волны 630-690 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см. Окраска стабильна 10 минут.

$$\text{Расчет: } A = E_{\text{контр.}} - E_{\text{опыта}} / E_{\text{контр.}} \cdot 66,6 \text{ (мг/(с}\cdot\text{л))}$$

Задачи для самостоятельного решения.

- № 1.** Каковы отличия ферментов от других белков?
- № 2.** Как ферменты катализируют химическую реакцию?
- № 3.** Каковы два главных способа обратимого изменения активности ферментов?
- № 4.** Как регулируется активность ферментов?
- № 5.** Выберите правильный ответ. Все ферменты обладают: а) абсолютной специфичностью; б) относительной специфичностью; в) высокой специфичностью, в основе которой лежит строгое соответствие структуры субстрата и активного центра фермента.

СЕМИНАР № 2.

ТЕМА: Матричный биосинтез биополимеров.

ВОПРОСЫ.

1. Общая характеристика матричного биосинтеза биополимеров. Основные компоненты матричного биосинтеза – фермент, матрица и набор мономеров. Основные стадии матричного биосинтеза.
2. Структура хроматина. Уровни компактизации ДНК.
3. Биосинтез ДНК. Ферменты, принимающие участие в репликации.
4. Репликация РНК-содержащих вирусов.
5. Общая характеристика транскрипции.

6. Основные стадии транскрипции РНК – инициация, элонгация, терминация.
7. Регуляция транскрипции у прокариот. Схема Жакоба и Моно.
8. Строение рибосом.
9. Структура тРНК.
10. Биосинтез (трансляция) белка.
11. Посттрансляционная достройка белков.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 6.

ТЕМА: Обмен углеводов. Определение глюкозы.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Ознакомиться с методом количественного определения глюкозы в биологических жидкостях.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ: спектрофотометр, ферментный реактив, стандарт глюкозы 5 мМ/л, сыворотка.

В крови находится ряд углеводов, из которых самым важным является глюкоза. Ее концентрация в крови здорового взрослого человека составляет 3,5-6,1 мМ/л. Из других углеводов, содержащихся в крови, следует отметить гликоген – 16,2-31,7 мг/л, фруктозу – 5,55 – 27,75 мкмоль/л, пентозы 0,12 – 0,22 ммоль/л, другие полисахариды – около 1,8 г/л, следы галактозы, маннозы, лактозы, мальтозы и сахарозы. Под «сахаром крови» в узком смысле слова подразумевают только глюкозу. Концентрация глюкозы в крови является результатом соотношения скоростей образования глюкозы из гликогена или других источников, всасывания ее из желудочно-кишечного тракта и утилизации тканями. Окисляясь, она дает организму энергию и необходимые для жизнедеятельности метаболиты. До 70% глюкозы, образующейся в печени и поступающей в циркуляцию, потребляется головным мозгом, а активация гликолиза в нем, например, при гипоксии или стрессе сопровождается увеличением поглощения глюкозы почти в 2 раза.

Глюкоза обладает способностью неферментативно связываться с белками, что приводит к изменению их физико-химических свойств

и функциональной активности. В норме лишь небольшая часть белков подвергается гликозилированию.

Глюкоза, являясь одним из важнейших компонентов крови, почти поровну распределяется между плазмой и форменными элементами с некоторым превышением ее концентрации в плазме. Глюкоза относится к альдогексозам. Альдегидная группа легко окисляется, что широко используется при определении глюкозы.

Работа № 1. Определение глюкозы в крови глюкозооксидазным методом.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Глюкозооксидаза специфически катализирует перенос двух водородных атомов с первого углеродного атома глюкозы на кислород воздуха. При этом в ходе реакции образуется в эквимольных количествах перекись водорода, которая разлагается вторым ферментом – пероксидазой, а выделяющийся в процессе реакции атомарный кислород окисляет добавленный в реакционную смесь орто-толидин, который окрашивается в голубовато-синий цвет. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию глюкозы.

ХОД РАБОТЫ.

1. В пробирку внести 1 мл ферментного реактива.
2. В пробирку № 1 добавить 0,01 мл стандарта глюкозы, в остальные пробирки по 0,01 мл исследуемой сыворотки.
3. Через 15 минут измерить оптическую плотность стандарта и проб при длине волны 540 нм.

Расчет: $C_{пробы} = A_{пробы} / A_{стандарта} \cdot C_{стандарта}$ (5,55 мМ/л)

Нормальные величины концентрации глюкозы: в крови – 3,3-5,6 ммоль/л; в плазме и сыворотке – 4,1-6,4 ммоль/л.

Задачи для самостоятельного решения.

№ 1. Какие функции выполняют углеводы в клетке и в организме? **№ 2.** В результате какого процесса органические вещества образуются из неорганических? Опишите основные реакции этого процесса.

№ 3. Что представляют собой три этапа окисления глюкозы и где они протекают?

№ 4. Какие ткани способны выделять в кровь глюкозу, образующуюся при расщеплении гликогена, и почему?

№ 5. Какую реакцию катализируют ферменты глюкокиназа и гексокиназа? Почему печень содержит глюкокиназу, а мозг и другие ткани – гексокиназу?

СЕМИНАР № 3.

ТЕМА: Обмен нуклеиновых кислот и нуклеотидов.

ВОПРОСЫ.

1. Деструкция нуклеиновых кислот.
2. Распад нуклеотидов в тканях.
3. Катаболизм пуринов.
4. Катаболизм пиримидинов.
5. Биосинтез нуклеотидов.
6. Синтез пуриновых рибонуклеотидов.
7. Синтез пиримидиновых рибонуклеотидов.
8. Синтез АМФ и ГМФ.
9. Биосинтез дезоксирибонуклеотидов.
10. Регуляция биосинтеза пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 7.

ТЕМА: Обмен простых белков. Определение креатинина и мочевины.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Ознакомиться с методом количественного определения креатинина и мочевины в биологических жидкостях.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ: спектрофотометр, раствор пикриновой кислоты, раствор гидроксида натрия, раствор трихлоруксусной кислоты, стандарт креатинина 177 мкМ/л, раствор уреазы, салицилат натрия, гипохлорит натрия, стандарт мочевины 8,325 мМ/л, сыворотка крови.

Работа № 1. Определение креатинина.

В синтезе эндогенного креатинина принимают участие аминокислоты – аргинин, глицин, метионин. Креатин при фосфорилировании превращается в креатинфосфат, из которого образуется креатинин

(ангидрид креатина). Этот процесс в живом организме необратимый.

Креатин и креатинфосфат являются важными азотистыми веществами мышц, участвующими в химических процессах, связанных с мышечными сокращениями. В сыворотке крови содержится в основном креатинин. Суточное выделение креатинина для каждого человека – величина относительно постоянная, которая зависит главным образом от массы мышечной ткани и мало зависит в отличие от мочевины от питания. Содержание креатинина в сыворотке крови уменьшается с возрастом.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Большинство методов определения креатинина основаны на реакции Яффе, описанной в 1886 г., в основе которой лежит реакция ароматических нитровеществ с веществами, содержащими активную метиленовую ($=CH_2$) или метиновую ($-CH$) группы. Креатинин реагирует с пикриновой кислотой в щелочной среде с образованием окрашенных соединений.

ХОД РАБОТЫ.

1. К 0,5 мл сыворотки добавить 1,0 мл воды и 0,5 мл трихлоруксусной кислоты (реагент №4). Тщательно перемешать и через 10

мин центрифугировать при 900 об./мин 15 мин. Для дальнейшего анализа использовать прозрачный супернатант.

2. В пробирку №1 внести 1 мл раствора стандарта креатинина, в остальные пробирки по 1 мл супернатанта.

3. В каждую пробирку добавить по 0,5 мл раствора пикриновой кислоты.

4. В каждую пробирку добавить по 0,5 мл раствора едкого натра.

5. Через 20 минут измерить оптическую плотность стандарта и проб при длине волны 490-510 нм.

Расчет: $C \text{ пробы} = A \text{ пробы} / A \text{ стандарта} \cdot C \text{ стандарта}$ (177 мкМ/л)

Нормальные величины креатинина в сыворотке крови – 53-106 мкмоль/л.

Работа № 2. Определение мочевины уреазной реакцией.

Низкомолекулярные азотистые вещества или небелковые компоненты крови состоят главным образом из конечных продуктов обмена белков и нуклеиновых кислот. Эти вещества остаются в сыворотке крови после осаждения белка.

Мочевина (диамид угольной кислоты) – основной конечный продукт распада белка в организме. Существует прямая связь между концентрацией мочевины крови и потреблением белка и обратная между скоростью выведения мочевины с мочой и уровнем ее в крови.

Синтез мочевины происходит в печени главным образом из аммиака, который образуется при дезаминировании аминокислот, распаде пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Мочевина под действием уреазы разлагается с образованием аммиака и углекислого газа. Для уреазы мочевина является единственным физиологическим субстратом, поэтому уреазные методы высокоспецифичны. Оптимум действия уреазы pH 6,0 – 8,0. Выде-

лившийся аммиак образует с гипохлоритом натрия и салицилатом натрия окрашенный продукт.

ХОД РАБОТЫ.

1. В пробирки налить по 1 мл раствора уреазы.
2. Добавить по 0,01 мл стандарта или пробы в соответствующие пробирки.
3. Инкубировать 5-10 минут при температуре 37°C.
4. Добавить в каждую пробирку по 1 мл гипохлорита натрия.
5. Через 10 минут измерить экстинкцию на спектрофотометре при длине волны 500-650 нм.

Расчет: $C \text{ пробы} = A \text{ пробы} / A \text{ стандарта} \cdot C \text{ стандарта}$ (8,325 мМ/л)

Нормальные величины мочевины в сыворотке крови 1,7-8,3 ммоль/л.

Задачи для самостоятельного решения.

- № 1. Опишите реакции, входящие в цикл мочевины.
- № 2. Почему содержание ферментов цикла мочевины возрастает как при обильном питании, так и при голодании?
- № 3. Как аммиак и аминный азот попадают из периферических тканей в печень для образования мочевины?
- № 4. Перечислите азотсодержащие вещества крови.
- № 5. В синтезе мочевины одна молекула аммиака связывается в виде карбамоилфосфата, а другая – в виде аспарагиновой кислоты. Назовите процессы, в результате которых молекула аммиака обнаруживается в аспарагиновой кислоте.

СЕМИНАР № 4.

ТЕМА: Роль свободнорадикальных процессов в организме.

ВОПРОСЫ.

1. Активные формы кислорода – супероксидный анион-радикал, перекись водорода, гидроксильный радикал, липидные радикалы.
2. Источники активных форм кислорода в организме.
3. Основные ферменты антиоксидантной защиты – супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион-зависимые пероксидазы и трансферазы.
4. Основные неферментные антиоксиданты – аскорбиновая кислота, α -токоферол, мочевиная кислота, глутатион.
5. Роль свободнорадикального окисления в клетке.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 8.

ТЕМА: Обмен сложных белков. Определение концентрации гемоглобина и билирубина.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Ознакомиться с методом количественного определения гемоглобина и билирубина в биологических жидкостях.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ: спектрофотометр, реагенты для определения концентрации гемоглобина в крови и билирубина в сыворотке, стандартный раствор билирубина – 171 мкмоль/л, кровь, сыворотка.

Работа № 1. Определение концентрации гемоглобина.

Гемоглобин – это белок глобин, простетической группой которого является гем – циклический тетрапиррол. Гемоглобин выполняет две важные биологические функции: 1) переносит кислород из лёгких к периферическим тканям; 2) переносит CO_2 и протоны от периферических тканей к дыхательным органам для последующего выведения из организма.

Гемоглобин представляет собой тетрамерный белок, молекула которого образована четырьмя белковыми субъединицами – две идентичных α - и две идентичных β -субъединицы и содержит гем, способный связывать кислород. Гем представляет собой комплекс двухвалентного железа с протопорфирином. Последний образован четырьмя пиррольными кольцами: четыре замещённых пиррола связаны метиленовыми ($=CH-$) мостиками, так что создаётся система сопряженных двойных связей (то есть при движении по кругу одинарные и двойные связи в молекуле чередуются). Это придает порфиру и гему тёмно-красный цвет. В геме четыре пиррольных атома азота связаны с Fe^{2+} , оставляя две из шести связей Fe^{2+} свободными и доступными для других лигандов.

Молекула гемоглобина связывает четыре молекулы кислорода, по одной на каждую субъединицу. Несмотря на то, что молекулы гема в гемоглобине достаточно удалены друг от друга, первоначальное связывание кислорода с одной субъединицей ускоряет связывание молекул кислорода с остальными субъединицами. Это явление известно как *гомотропный положительный кооперативный эффект*.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Гемоглобин при взаимодействии с железосинеродистым калием (красная кровяная соль) окисляется в метгемоглобин, образующий с ацетоангидрином окрашенный гемиглобинцианид, поглощающий при длине волны 540 (520-560 нм). Концентрация образовавшегося гемоглобинцианида пропорциональна концентрации гемоглобина.

ХОД РАБОТЫ.

1. В пробирки налить по 2,5 мл трансформирующего реактива.
2. Внести в пробирки, содержащие трансформирующий реагент по 0,01 мл крови и тщательно перемешать. Инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин.

3. Через 10 мин измерить экстинкцию проб против трансформирующего реактива при длине волны 540 нм (520-560 нм).

4. Измерить оптическую плотность гемиглобинцианида калибровочного раствора против трансформирующего реактива при длине волны 540 нм (520-560 нм).

Расчет: концентрацию гемоглобина в крови рассчитывают по формуле: $C_{пробы} = E_{пробы}/E_k \cdot C_k \cdot 251$, где $C_{пробы}$ – концентрация гемоглобина в г/л;

$E_{пробы}$ – экстинкция пробы;

E_k – экстинкция калибровочного раствора гемиглобинцианида;

C_k – концентрация гемиглобинцианида в калибровочном растворе (0,557-0,638 г/л);

251 – коэффициент разведения пробы крови.

Нормальные величины: мужчины: 130-160 г/л; женщины: 120-145 г/л; дети: 115-145 г/л; новорожденные: 150-240 г/л.

Работа № 2. Определение концентрации общего и прямого билирубина в сыворотке крови.

При физиологических условиях в организме человека разрушается $1-2 \cdot 10^8$ эритроцитов в час. Таким образом, в течение суток у человека массой 70 кг обновляется приблизительно 6 г гемоглобина.

При разрушении гемоглобина его белковая часть (глобин) гидролизуется до аминокислот, которые могут быть использованы; железо гема включается в общий пул железа и также снова используется. Так, железо захватывается трансферрином и кровью доставляется в печень, где освобождается от белка-переносчика и откладывается в виде ферритина (соединение железа с особым белком). Этот комплекс по мере надобности распадается, а освобождающееся железо вновь адсорбируется на трансферрине и поступает в клетки, где участвует в различных процессах (синтез гемоглобина, цитохромов и т.д.). Вместе с тем свободная от железа порфириновая часть гема обязательно де-

градирует, что происходит в ретикулоэндотелиальных клетках печени, селезёнки и костного мозга.

Катаболизм гема, освобождённого из любых гемовых белков, осуществляется в микросомальной фракции ретикулоэндотелиальных клеток сложной ферментной системой – гем-оксигеназой.

Гемоглобин в клетках вначале окисляется гем-оксигеназой с образованием вердоглобина (вещество зеленого цвета). После отделения белковой части (глобина) красный гем расщепляется гем-оксигеназой с помощью кислорода и NADPH на ионы Fe^{2+} , CO (оксид углерода!) и биливердин (пигмент зеленого цвета). Затем биливердин восстанавливается биливердинредуктазой до оранжевого цвета билирубина. Это изменение цвета можно наблюдать *in vivo*: в синяках (гематомах) обусловленный гемом пурпурный цвет медленно переходит в желтый цвет билирубина.

По расчету из 1 г гемоглобина образуется 35 мг билирубина. Суточное образование билирубина у взрослого человека составляет приблизительно 250-350 мг.

Дальнейший метаболизм билирубина в основном происходит в печени. Так как он плохо растворим в плазме, транспорт билирубина в печень осуществляется в комплексе с альбумином. Метаболизм билирубина складывается из трех процессов: 1) поглощение билирубина клетками печени; 2) конъюгация (процесс повышения растворимости билирубина) билирубина в гладком эндоплазматическом ретикулуме и 3) секреция билирубина из эндоплазматического ретикулума в желчь.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

При взаимодействии сульфаниловой кислоты с нитритом натрия образуется диазофенилсульфоновая кислота (дiazосмесь), которая дает со связанным (прямым) билирубином сыворотки розовофиолетовое окрашивание. По его интенсивности судят о концентрации связанного билирубина, дающего прямую реакцию. При добавлении к сыворотке крови кофеинового реактива билирубин (свободный, непрямой) пере-

ходит в растворимое диссоциированное состояние и также дает розово-фиолетовое окрашивание с диазосмесью. По интенсивности окраски, образующейся после добавления кофеинового реактива, определяют концентрацию общего билирубина. По разнице между общим и связанным (прямым) билирубином находят содержание несвязанного (непрямого билирубина).

ХОД РАБОТЫ.

1. В 3 пробирки (для общего билирубина, связанного и для контроля) вводят реактивы в порядке, указанном в таблице.

Реактивы, мл	Билирубин		Контроль
	Общий	Связанный (прямой)	
Сыворотка	0,20	0,20	0,20
Кофеиновый реактив	1,4	-	1,4
0,9% раствор NaCl	-	1,4	0,20
Диазосмесь	0,20	0,20	-

2. Для определения связанного билирубина в пробе измерение на спектрофотометре проводят через 5-10 мин после добавления диазосмеси.

3. При определении общего билирубина пробу оставляют стоять 20 мин.

Измерение экстинкции производят на спектрофотометре при длине волны 535 нм (500-560 нм). Расчет производят по калибровочному графику.

4. Построение калибровочного графика.

Проба, №	Стандарт билирубина (171 мкмоль/л)	0,9% раствор NaCl	Концентрация билирубина (мкмоль/л)
1.	0,01	0,39	8,55
2.	0,02	0,38	17,1

3.	0,04	0,36	34,2
4.	0,06	0,34	51,3
5.	0,08	0,32	68,4
6.	0,1	0,30	85,5

К полученным разведениям добавить 1,4 мл кофеинового реактива и 0,20 мл диазосмеси. Время инкубации 20 мин. Измерение экстинкции стандартных проб проводят против воды при длине 535 нм (500-560 нм).

5. Для определения несвязанного билирубина из общего вычитают связанный билирубин.

Нормальные величины: 8,5-20,5 мкмоль/л.

Задачи для самостоятельного решения.

№ 1. Выберите правильные определения для понятий. А. Гаптоглобин. Б. Транскортин. В. Трансферрин. Г. Церулоплазмин. Представляет собой: а) белок, переносящий по крови кортикостероиды; б) белок, транспортирующий железо в депо (печень, селезенку); в) белок, связывающий внеэритроцитарный гемоглобин и транспортирующий его к клеткам ретикулоэндотелиальной системы; г) белок, являющийся депо и переносчиком меди.

№ 2. Опишите первые две стадии биосинтеза гема у животных.

№ 3. Перечислите вещества, необходимые для синтеза гемоглобина. **№ 4.** Выберите правильные ответы. А. При распаде гемоглобина в тканях образуются: а) вердоглобин; б) биливердин; в) мезобилиноген;

г) билирубин; д) уробилин. Б. Билирубин: а) растворим в воде; б) является токсичным; в) представляет собой пигмент желто-красного цвета; г) обезвреживается в печени.

№ 5. В какой форме железо откладывается в печени?

ИТОГОВЫЙ ТЕСТ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Вариант № 1

24 вопроса на 30 минут

Указания: Все задания имеют несколько вариантов ответа, из которых правильный только один.

1. **Белки состоят из:**

- А- аминокислот
- Б- жирных кислот
- В- нуклеотидов
- Г- азотистых оснований

2. **К серосодержащим аминокислотам относится:**

- А- аланин
- Б- цистеин
- В- серин
- Г- гистидин

3. **Первичная структура белка не характеризуется тем, что:**

- А – в ее формировании участвуют слабые связи
- Б – закодирована генетически
- В – образована ковалентными связями
- Г – определяет последующие уровни структурной организации белка

4. **В формировании третичной структуры белка не участвует связь:**

- А – водородная
- Б – пептидная
- В – дисульфидная
- Г – гидрофобное взаимодействие

5. **В современной номенклатуре выделяют следующее количество классов ферментов:**

- А- три
- Б- четыре

В- шесть

Г- девять

6. **Лактатдегидрогеназа относится к классу:**

А- гидролаз

Б- изомераз

В- оксидоредуктаз

Г- трансфераз

7. **Скорость ферментативной реакции зависит от:**

А- концентрации фермента

Б- молекулярной массы фермента

В- молекулярной массы субстрата

Г- молекулярной гетерогенности фермента

8. **Сахароза является:**

А- моносахаридом

Б- дисахаридом

В- трисахаридом

Г- полисахаридом

9. **Углеводы не входят в состав:**

А- гликопротеинов

Б- фосфолипидов

В- гликолипопротеинов

Г- нуклеопротеинов

10. **К линейным полисахаридам относится:**

А- гликоген

Б- амилоза

В- амилопектин

11. К жирорастворимым витаминам относится витамин:

- А- витамин А
- Б- витамин В1
- В- витамин С
- Г- витамин РР

12. Для нормального световосприятия необходим:

- А- ретинол
- Б- токоферол
- В- рибофлавин
- Г- пиридоксаль

13. Жирные кислоты не входят в состав:

- А- триацилглицеролов
- Б- фосфолипидов
- В- гликолипидов
- Г- холестерина

14. К насыщенным жирным кислотам относится:

- А- стеариновая
- Б- линолевая
- В- линоленовая
- Г- арахидоновая

15. Фермент ДНК-полимераза участвует в процессе:

- А- трансляции
- Б- транскрипции
- В- репликации
- Г- гликолизе

16. Основной формой ДНК в клетке является:

- А- А-форма
- Б- В-форма

В- С-форма

Г- Z-форма

17. Механизм расхождения цепей ДНК по дочерним клеткам:

А- консервативный

Б- полуконсервативный

В- дисперсный

Г- дисперсный половинный

18. В дыхательную цепь митохондрий не входит:

А- цитохром b

Б- цитохром c

В- цитохром c1

Г- цитохром P450

19. В цикле лимонной кислоты не образуется:

А- цитрат

Б- сукцинат

В- 3-фосфоглицерат

Г- фумарат

20. Основной путь катаболизма высших жирных кислот:

А- восстановление

Б- α -окисление

В- β -окисление

Г- γ -окисление

21. Синтез АТФ в клетках эукариот протекает на:

А- мембранах ЭПР

Б- плазматической мембране

В- внутренней мембране митохондрий

Г- наружной мембране митохондрий

22. К «вторичным посредникам» не относят:

- А- циклический АМФ
- Б- ионы Ca^{2+}
- В- ионы Mg^{2+}
- Г- фосфатидилинозитол

23. К гормонам, производным ароматических аминокислот относится:

- А – эстрадиол
- Б – тироксин
- В – секретин
- Г – кортизол

24. Минералокортикоиды регулируют обмен:

- А – углеводный
- Б – липидный
- В – водно-солевой

Вариант № 2

24 вопроса на 30 минут

Указания: Все задания имеют несколько вариантов ответа, из которых правильный только один.

1. Мономерами нуклеиновых кислот являются:

- А- аминокислоты
- Б- нуклеозиды
- В- нуклеотиды
- Г- азотистые основания

2. К оксиаминокислотам относится:

- А- глицин
- Б- орнитин
- В- серин
- Г- аргинин

- 3. В белках участвует следующее количество аминокислот:**
- А- десять
 - Б- двадцать
 - В- тридцать шесть
 - Г- восемьдесят
- 4. К белкам плазмы относят:**
- А- кератины
 - Б- глобулины
 - В- склеропроотеины
 - Г- коллагены
- 5. При денатурации белка не происходит:**
- А- нарушения третичной структуры
 - Б- нарушения вторичной структуры
 - В- гидролиза пептидных связей
 - Г- диссоциации субъединиц
- 6. Амилаза относится к классу:**
- А- гидролаз
 - Б- изомераз
 - В- оксидоредуктаз
 - Г- трансфераз
- 7. Конкурентными ингибиторами ферментов являются:**
- А- металлы
 - Б- аминокислоты
 - В- вещества, по структуре подобные субстрату
 - Г- вещества, по структуре подобные активному центру фермента
- 8. Галактоза является:**
- А- моносахаридом
 - Б- дисахаридом

- В- трисахаридом
- Г- полисахаридом

9. К структурным полисахаридам не относится:

- А- кератосульфат
- Б- гиалуроновая кислота
- В- гликоген
- Г- целлюлоза

10. Остаток фруктозы входит в состав:

- А- гликогена
- Б- крахмала инулина
- В - целлюлозы

11. К водорастворимым витаминам относится:

- А- витамин А
- Б- витамин С
- В- витамин Д
- Г- витамин Е

12. Антигеморрагическим действием обладает витамин:

- А- эргокальциферол
- Б- ретинол
- В- филлохинон
- Г- аскорбиновая кислота

13. К стероидам не относится:

- А- холестерол
- Б- тестостерон
- В- церамид
- Г- эстроген

14. К насыщенным жирным кислотам относится:

- А- пальмитиновая
- Б- линолевая
- В- арахидоновая
- Г- олеиновая

15. Регуляторную функцию выполняют:

- А- фосфолипиды
- Б- сфинголипиды
- В- простагландины
- Г- терпены

16. Фермент ДНК-гираза участвует в процессе:

- А- трансляции
- Б- транскрипции
- В- репликации
- Г- гликолизе

17. В состав нуклеосомного *core* не входит гистон:

- А- H1
- Б- H2a
- Н2b
- Н3

18. Ведущую роль в стабилизации двойной спирали ДНК играют:

- А- водородные связи
- Б- вандерваальсовы взаимодействия
- В- стекинг-взаимодействия
- Г- ионные связи

19. В гликолизе не образуется:

- А- глицеральдегид-3-фосфат
- Б- сукцинат

- В- 3-фосфоглицерат
- Г- фосфоенолпируват

20. Коэнзим А выполняет функцию переносчика:

- А- метильной группы
- Б- ацильных групп
- В- фосфатных групп
- Г- аминогруппы

21. Окисление жирных кислот локализовано:

- А- в цитозоле
- Б- в межмембранном пространстве митохондрий
- В- в матриксе митохондрий
- Г- в эндоплазматическом ретикулуме

22. Инсулин представляет собой:

- А- производное ненасыщенных жирных кислот
- Б- производное аминокислоты тирозина
- В- низкомолекулярный белок
- Г- гликопептид

23. В поджелудочной железе синтезируется:

- А- тироксин
- Б- глюкагон
- В- окситоцин
- Г- адреналин

24. Содержание кальция и фосфора в крови регулирует:

- А – паратгормон
- Б – адренокортикотропин
- В - эстрадиол
- Г - глюкагон

Вариант № 3
24 вопроса на 30 минут

Указания: Все задания имеют несколько вариантов ответа, из которых правильный только один.

1. Сера входит в состав:

- А- белков
- Б- нуклеиновых кислот
- В- гликогена
- Г- триацилглицеролов

2. Иминокислотой является:

- А- глицин
- Б- цистеин
- В- аргинин
- Г- пролин

3. Период идентичности α -спирали составляет:

- А- два витка
- Б- три витка
- В- четыре витка
- Г- пять витков

4. Белки характеризуются:

- А- отсутствием способности кристаллизоваться
- Б- сохранением нативной структуры молекулы при нагревании до 100°C
- В- амфотерными свойствами
- Г- отсутствием специфической конформации молекулы

5. Пептидная связь в белках имеет преимущественно:

- А- *цис*-конфигурацию
- Б- *транс*-конфигурацию

6. **Аланиновая и аспарагиновая трансаминазы относятся к классу:**

А- гидролаз

Б- изомераз

В- оксидоредуктаз

Г- трансфераз

7. **Простые ферменты состоят из:**

А- аминокислот

Б- аминокислот и углеводов

В- углеводов

Г- аминокислот и небелковых компонентов

8. **Класс ферментов указывает на:**

А- конформацию фермента

Б- тип кофермента

В- тип химической реакции, катализируемой данным ферментом

Г- строение активного центра фермента

9. **Лактоза является:**

А- моносахаридом

Б- дисахаридом

В- трисахаридом

Г- полисахаридом

10. **Функцией углеводов не является:**

А- резервная

Б- структурная

В- энергетическая

Г- каталитическая

11. **К гетерополисахаридам относится:**

А- гепарин

Б- арабиноза

В- сахароза

Г- гликоген

12.К водорастворимым витаминам относится витамин:

А- витамин А

Б- витамин В1

В- витамин К

Г- витамин Е

13.Одним из наиболее эффективных природных антиоксидантов является:

А- филлохинон

Б- викасол

В- холекальциферол

Г- токоферол

14.К стероидам относятся:

А- триацилглицеролы

Б- фосфолипиды

В- гликолипиды

Г- холестерол

15. Ацилглицеролы относятся к группе:

А- нейтральных липидов

Б- гликолипидов

В- восков

Г- терпенов

16. Фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза участвует в процессе:

А- трансляции

Б- транскрипции

В- репликации

Г- гликолизе

17. На один виток в В-форме ДНК приходится:

- А- девять п.н.
- Б- десять п.н.
- В- одиннадцать п.н.
- Г- двенадцать п.н.

18. Процессу репликации ДНК не свойственна:

- А- комплементарность
- Б- антипараллельность
- В- беззатравочность
- Г- униполярность

19. В гликолизе не образуется:

- А- глицеральдегид-3-фосфат
- Б- 3-фосфоглицерат
- В – фумарат
- Г- фосфоенолпируват

20. Мультиферментный комплекс синтетаза высших жирных кислот локализован:

- А- в матриксе митохондрий
- Б- в цитозоле
- В- в эндоплазматическом ретикулуме
- Г- во внутренней мембране митохондрий

21. В молекуле АТФ макроэргической является связь:

- А- гликозидная
- Б- фосфоэфирная
- В- фосфоангидридная

22. Основной функцией гормонов является:

- А- защитная
- Б- регуляторная

В- каталитическая

Г- транспортная

23. Йод входит в состав:

А- глюкагона

Б- паратгормона

В- кальцитонина

Г- тироксина

24. Инсулин – гормон поджелудочной железы является:

А- стероидным гормоном

Б- производным аминокислот

В- гормоном белково-пептидной природы

Ключи ответов

Вариант №1

Задание 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ответ А Б А Б В В А Б Б Б

Задание 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

ответ А А Г А В Б Б Г В В В В Б В

Вариант №2

Задание 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ответ В В Б Б В А В А В В

Задание 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

ответ Б В В А В В А В Б Б В В Б А

Вариант №3

Задание 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

ответ А Г Г В Б Г А В Б Г А

Задание 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

ответ Б Г Г А Б Б В В Б В Б Г В