

В. В. Рогожин

ПРАКТИКУМ
ПО **БИО-**



ХИМИИ

В. В. РОГОЖИН

ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ

ДОПУЩЕНО

*УМО вузов РФ по образованию
в области зоотехнии и ветеринарии
в качестве учебного пособия для студентов вузов,
обучающихся по направлению подготовки
(специальности) 111801 — «Ветеринария» (квалификация
(степень) «специалист») и направлению
подготовки (специальности) 111100 — «Зоотехния»
(квалификация (степень) «бакалавр»)*



Санкт-Петербург • Москва • Краснодар
2013

ББК 24.2я73

Р 59

Рогожин В. В.

Р 59 Практикум по биохимии: Учебное пособие. — СПб.: Издательство «Лань», 2013. — 544 с.: ил. — (Учебники для вузов. Специальная литература).

ISBN 978-5-8114-1586-1

Основной целью практикума является ознакомление студентов с практическими методами биохимических исследований крови, сыворотки или плазмы и биогенных тканей, закрепление теоретических знаний в области биохимии, развитие экспериментальных навыков и привитие научного мировоззрения студентам высших учебных заведений. В практикуме рассматриваются биохимические методы исследования ферментов, энергетических процессов и витаминов, а также основных показателей аминокислотного, белкового, нуклеинового, углеводного, липидного, пигментного и минерального обменов. Предлагаемые аналитические исследования предусмотрены программой обучения при выполнении лабораторных исследований, а также могут быть использованы для учебно-исследовательской работы студентов.

Предназначен для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям Зоотехния (квалификация (степень) «бакалавр») и Ветеринария (квалификация (степень) «специалист»).

ББК 24.2я73

Рецензенты:

В. В. ВЕРХОТУРОВ — доктор биологических наук, профессор Иркутского государственного технического университета;

А. Г. ДРАНАЕВА — кандидат химических наук, доцент, зав. кафедрой агробиохимии Якутской государственной сельскохозяйственной академии.

Обложка

Е. А. ВЛАСОВА

*Охраняется законом РФ об авторском праве.
Воспроизведение всей книги или любой ее части
запрещается без письменного разрешения издателя.*

*Любые попытки нарушения закона
будут преследоваться в судебном порядке.*

© Издательство «Лань», 2013

© В. В. Рогожин, 2013

© Издательство «Лань»,
художественное оформление, 2013

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ААС —	атомно-абсорбционная спектроскопия
АДГ —	алкогольдегидрогеназа
АК —	аскорбиновая кислота
АлТ —	аланинаминотрансфераза
АльдГ —	альдегиддегидрогеназа
АО —	антиоксиданты
АОС —	антиокислительная активность
АсТ —	аспартатаминотрансфераза
АТФ —	аденозинтрифосфорная кислота
БАВ —	биологически активные вещества
БСА —	бычий сывороточный альбумин
б. в. —	бидистиллированная вода
Г6ФДГ —	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
Галь3ФДГ —	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
ДГ —	дигоксин
ДГКВ —	дигидрокверцетин
ДМСО —	диметилсульфоксид
ДНК —	дезоксирибонуклеиновая кислота
2,4-ДНФ —	2,4-динитрофенол
ДФПГ —	дифенилпикрилгидразил
д. в. —	дистиллированная вода
ИК —	инфракрасный
ИНТФ —	йоднитротетразолий фиолетовый
КДК —	кетоглутаратдегидрогеназный комплекс
КРС —	крупный рогатый скот
ЛДГ —	лактатдегидрогеназа
МДА —	малоновый диальдегид
МДГ —	малатдегидрогеназа
НАД —	никотинамидадениндинуклеотид окисленный
НАДН —	никотинамидадениндинуклеотид восстанов- ленный

НАДФ —	никотинамидадениндинуклеотид
НАДФН —	восстановленный никотинамидадениндинуклеотид
НЖК —	ненасыщенные жирные кислоты
ОДН —	о-дианизидин (3,3'-диметоксибензидин)
ПДК —	пируватдегидрогеназный комплекс
ПОЛ —	перекисное окисление липидов
ПХ —	пероксидаза корней хрена
РНК —	рибонуклеиновая кислота
СДГ —	сукцинатдегидрогеназа
ТБК —	тиобарбитуровая кислота
ФЭК —	фотоэлектроколориметр
ЭДПК —	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодии- мид
ЭФП —	эмиссионная фотометрия пламени
K_d —	константа диссоциации
K_a —	константа активирования
K_i —	константа ингибирования
K_m —	константа Михаэлиса
V_m —	максимальная скорость ферментативной ре- акции
k_{cat} —	каталитическая константа
v_0 —	начальная скорость ферментативной реакции
RZ —	показатель чистоты пероксидазы, равен от- ношению величин поглощения (D_{403}/D_{280})

ВВЕДЕНИЕ

Биохимия относится к наукам, изучающим химический состав, структуру и свойства биогенных молекул растительных и животных тканей. Предметом исследования биохимии являются метаболические процессы в клетках растений и животных, а также регуляторные механизмы, обеспечивающие функционирование целостного организма.

Биохимия в настоящее время является динамично развивающейся наукой, поэтому для освоения новых методов исследования требуются высококвалифицированные лаборанты, способные не только освоить современное оборудование и высокоточные приборы, но и проанализировать полученные данные биохимических исследований. Биохимия занимает достойное место среди фундаментальных наук, изучающих жизнедеятельность растений и животных. Поэтому предлагаемый практикум может быть полезен специалистам, занимающимся аналитическими исследованиями в современных биохимических лабораториях.

В настоящее время постоянно совершенствуются методы биохимических исследований, создаются высокоточные приборы, позволяющие получать в большом объеме новую информацию о структуре и свойствах биогенных молекул, обеспечивающих участие и синхронность протекания метаболических процессов в живых организмах. Поэтому назрела необходимость в практикуме, отражающем современные методы исследований в биологической химии.

Современному аналитику требуются знания основ физико-химических методов исследования, умение работать на современных высокоточных приборах и владеть средствами обработки результатов эксперимента. Для проведения исследований необходимо на основании анализа

литературы по исследуемой проблеме выдвинуть *гипотезу* и предложить путь и способы ее решения.

В данном практикуме представлены работы, позволяющие изучить химический состав тканей растений и животных. В практикум включены работы, знакомящие студентов с современными методами исследования и проблемами биохимии, такими как спектрофотометрия, ионообменная хроматография, гельфильтрация и др. Приводятся работы по изучению физико-химических свойств ферментов и механизмов их действия, определению каталитических свойств ферментов, титрованию активных центров и др. Студентам предлагается освоить методы определения активности антиоксидантной системы и перекисного окисления липидов живых организмов.

Кроме того, на основании полученных данных студент должен грамотно объяснять процессы, происходящие в организме, с биохимической точки зрения. Приобрести навыки по подготовке и проведению биохимического эксперимента, а также по изучению свойств и идентификации важнейших природных объектов. Научиться работать на современных биохимических приборах и лабораторном оборудовании при проведении исследований, а также осуществлять подбор биохимических методов и проводить исследования азотсодержащих веществ, липидов, углеводов и их метаболитов, минеральных веществ, витаминов, кофакторов и ферментов. Грамотно проводить обработку результатов эксперимента и оценивать их в сравнении с литературными данными и научиться интерпретировать результаты биохимических исследований для оценки состояния обмена веществ и комплексной диагностики заболеваний животных. Освоить приемы и методы исследования веществ к анализу кормов растительного и животного происхождения, продукции животноводства, а также использовать теоретические знания и практические навыки, полученные при изучении дисциплины «Биохимия», для решения соответствующих профессиональных задач в области ветеринарии и зоотехнии.

При выполнении лабораторных работ студенту потребуются знания и навыки работы на приборах: спектрофото-

метре, фотоэлектроколориметре, рефрактометре, люминометре, центрифуге и др.

В целом аналитические работы, представленные в практикуме, предназначены для исследования различных биологических объектов и качественно-количественной оценки содержания исследуемых биогенных соединений. Анализ полученных данных позволит студенту прогнозировать ход биохимических процессов в соответствии с принципами биохимической энергетики, а также применять знания о химическом составе и биохимических процессах, протекающих в живых организмах в норме и при патологии. В практикум включен словарь терминов, что позволит студентам ознакомиться с основными терминами и понятиями биохимии.

Практикум предназначен для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлениям подготовки (специальности) «Зоотехния» и «Ветеринария». Освоение практических знаний и навыков по биохимии позволит студенту использовать их при изучении других предметов на старших курсах. Перед выполнением лабораторной работы приводится краткий теоретический курс по исследуемой теме. В каждой работе дано описание принципа метода исследования, приводятся подробные методики приготовления рабочих растворов и проведение лабораторной работы, а также методы расчета экспериментальных данных. По завершении выполнения работы студентам предлагается написать основные выводы по проведенному исследованию и ответить на некоторые теоретические вопросы.

Практикум может быть интересен и работникам, занимающимся научными исследованиями, так как в него включены работы повышенной сложности, связанные с изучением активности ферментов, определением содержания антиоксидантов, перекисного окисления липидов и др.

ПРАВИЛА И МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Современные биохимические исследования проводятся на основе тщательного анализа всех этапов лабораторного процесса — от пробоподготовки до обработки результатов исследований. При выполнении биохимических работ используют современные аналитические приборы и оборудование, пригодные для работы практически с любыми видами биологического материала. Для автоматизации биохимических исследований разработаны биохимические анализаторы, которые предназначены для проведения всех основных биохимических исследований, в том числе определения электролитов, субстратов, ферментов, специфических белков, фитогормонов, вторичных метаболитов и других веществ. Биохимические анализаторы используют меню тестов, обновляемое программное обеспечение, и в перспективе планируется создание полностью автоматизированных лабораторий. Биохимические анализаторы способны выполнять в автоматическом режиме как специальные, так и традиционные биохимические исследования. Биохимические анализаторы могут быть укомплектованы роботами-манипуляторами, высокопроизводительными лабораторными центрифугами, системами обработки информации и другими вспомогательными устройствами, позволяющими полностью автоматизировать процессы пробоподготовки, получения, сбора, выдачи и хранения информации. Освоение этих сложных лабораторных приборов требует от специалистов как теоретических, так и практических знаний в области биохимии. Поэтому начинающему аналитику необходимо освоить основы лабораторных

исследований по подготовке образцов, овладеть навыками построения калибровочных графиков, понять принципы методов исследования качественного и количественного состава биогенных молекул в различных растительных и животных тканях. Уметь рассчитать концентрацию раствора, точно взвесить навеску вещества, освоив методы работы с высокоточными аналитическими весами, правильно пользоваться автоматической пипеткой. Выполнение биохимических исследований требует от студента знаний по приготовлению гомогената и супернатанта биогенных тканей, а это значит, что студент должен уметь работать с гомогенизаторами и центрифугами, приготавливать растворы с заданным значением pH. Измерять светопоглощение анализируемых образцов и изучать активность ферментов на спектрофотометре и люминометре. Определять содержание элементов с помощью пламенного фотометра и атомно-абсорбционного спектрометра. Использовать для разделения веществ методы высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализировать состав веществ на газовом хроматографе. Изучать состав аминокислот на аминокислотном анализаторе, а белков с помощью системы проведения и анализа результатов электрофореза. Овладеть методами концентрирования низкомолекулярных веществ на роторном испарителе, а белков способом лиофилизации. Изучать состав неорганических и органических веществ на рентгенофлуоресцентном анализаторе, ИК-Фурье спектрофотометре и масс-спектрометре. Исследования нуклеиновых кислот необходимо проводить, используя секвенатор ДНК, а для изучения полимеразной цепной реакции необходимо освоить работу на амплификаторе. В настоящее время разрабатываются высокоавтоматизированные роботизированные комплексы, которые в будущем должны избавить исследователя от рутинной работы по подготовке биогенного материала к исследованию, способные провести качественный и количественный анализ соединений в исследуемом образце. Однако для работы на этих приборах необходимо овладеть элементарными навыками лабораторных исследований и научиться методам работы на высокоточных отечественных приборах и аналитическом оборудовании.

1.1. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

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

1.1.1. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ОГНЕОПАСНЫМИ И ЛЕГКО- ВОСПЛАМЕНЯЮЩИМИ ЖИДКОСТЯМИ

Легковоспламеняющиеся вещества должны храниться в специально приспособленном для этого хранилище и использоваться только по мере надобности для работы. Запрещается хранить в 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 хранить в специально предназначенных для этой цели 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 открытых плитках;
- держать горючие вещества в вытяжном шкафу во время работы с открытыми плитками или включенными приборами;
- хранить горючие жидкости в тонкостенных колбах емкостью более 200 мл, а также легковоспламеняющие 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;
- при работе с эфиром применять переносные электрические лампы.

В случае если разобьется емкость с легковоспламеняющимся веществом, следует немедленно выключить все нагревательные приборы с открытой спиралью, включить вытяжную вентиляцию. Все дальнейшие действия должны выполняться только с использованием средств индивидуальной защиты (резиновые перчатки, респиратор или противогаз). Необходимо засыпать песком разлитую жидкость и затем собрать песок и осколки посуды веником или деревянной лопатой. Применять металлический совок для сбора песка и осколков посуды с каменного, плиточного или цементного пола строго запрещается, так как при этом может образоваться искра и произойти взрыв.

1.1.2. 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 осторожно за 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.

Особую осторожность следует соблюдать при работе с плавиковой кислотой (фтористоводородной). Попадание кислоты на кожу, особенно под ногти, вызывает сильную боль и труднозаживающие раны. Вдыхание ее паров

приводит к воспалению верхних дыхательных путей и порче зубов. Поэтому при работе с плавиковой кислотой лаборант (студент) должен обязательно предварительно одеть респиратор.

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

Разлив концентрированных кислот производится в защитных очках и резиновых перчатках.

Раскалывание крупных кусков щелочей выполняют, предварительно обернув их тканью или бумагой, в средствах индивидуальной защиты (очки и перчатки).

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.

Категорически запрещается:

- применять резиновые и полимерные шланги в качестве сифонов для переливания концентрированных кислот;
- набирать концентрированные щелочи и кислоты ртом;
- применять серную кислоту в вакуум-эксикаторах в качестве водопоглощающего средства;
- выполнять работы с кислотами и щелочами без предохранительных очков.

1.1.3. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЭЛЕКТРООБОРУДОВАНИЕМ И ЭЛЕКТРОПРИБОРАМИ

Лабораторные работы проводятся при наличии исправного электрооборудования. При обнаружении дефектов в изоляции проводов, неисправности пускателей,

рубильников, штепселей, розеток, вилок, а также заземления следует немедленно сообщить преподавателю.

Категорически запрещается:

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

1.1.4. ПЕРВАЯ МЕДИЦИНСКАЯ ПОМОЩЬ

Для оказания первой помощи в 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), коллодий или БФ-6.

При ранениях стеклом нужно удалить из раны его осколки, убедившись, что их там больше нет, 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 необходимо немедленно отправить пострадавшего к врачу.

При ожогах кислотами и щелочами пораженный участок кожи быстро промывают большим количеством воды.

Затем на обожженное место накладывают примочку: при ожогах кислотой — из 2%-ного раствора питьевой соды, при ожогах щелочью — из слабого (0,5%-ного) раствора уксусной кислоты.

1.2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

1.2.1. ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА

Фотометрический метод анализа предназначен для измерения в отдельных участках диапазона длин волн 200–700 нм, выделяемых светофильтрами, коэффициентов пропускания (T , %) и поглощения (D , усл. ед.) жидкостных растворов. Светофильтры — это стекла, способные пропускать только свет определенной длины волны, при этом весь остальной свет ими поглощается. При выборе светофильтров удобно пользоваться таблицей 1.1.

Таблица 1.1

Длины волн спектра и соответствующие им окраски

Интервалы длин волн поглощаемого света, нм	Цвет поглощаемого излучения	Цвет исследуемого раствора
400–435	Фиолетовый	Желто-зеленый
435–480	Синий	Желтый
480–490	Зеленовато-синий	Оранжевый
490–500	Сине-зеленый	Красный
500–560	Зеленый	Пурпурный
560–580	Желто-зеленый	Фиолетовый
580–595	Желтый	Синий
595–605	Оранжевый	Зеленовато-синий
605–730	Красный	Сине-зеленый
730–760	Пурпурный	Зеленый

Для измерений на спектрофотометрах и фотоэлектрокolorиметрах используются спектрофотометрические кюветы, которые представляют собой сосуды прямоугольной формы. Кюветы бывают стеклянные, для исследований растворов в видимой области спектра (350–700 нм),

и кварцевые — для диапазона ультрафиолетового и видимого спектров (200–700 нм).

Пределы измерения на фотоэлектроколориметре коэффициентов пропускания (T , %) от 100 до 5%, а поглощения (D , усл. ед.) от 0,01 до 1,3. Абсолютная погрешность фотоэлектроколориметра при измерении коэффициентов пропускания $\pm 1\%$. Нормальными условиями работы фотоэлектроколориметра являются: температура окружающей среды ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), относительная влажность воздуха 45–80%, напряжение питания сети ($220 \pm 4,4$) В, 50 Гц.

Оптическая система ФЭКа устроена таким образом, что свет от лампы накаливания проходит через светофильтры, формируя общий световой поток (I_o), который падает на кювету с исследуемым раствором (рис. 1.1). Часть этого потока отражается от стенок кюветы и поверхности раствора, а часть (I_a) поглощается молекулами растворенного вещества, расходуясь на изменение электронной, вращательной и колебательной энергии этих молекул, непоглощенная часть энергии (I_t) проходит через кювету на ФЭУ.

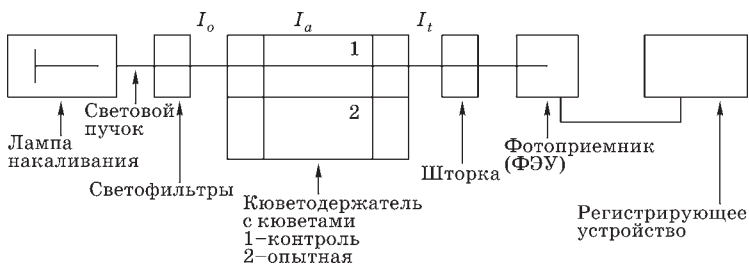


Рис. 1.1

Схема устройства оптической системы фотоэлектроколориметра

На основании закона сохранения энергии можно записать уравнение: $I_o = I_a + I_t$. Значение I_a находится только по разности I_o и I_t .

П. Бугером и И. Ламбертом выведена формула, устанавливающая закономерности изменения поглощения светового потока раствором постоянной концентрации при изменении толщины поглощаемого света и изменения

поглощения светового потока слоем постоянной толщины при изменении концентрации раствора, которая записывается в следующем виде:

$$I_t = I_o \cdot 10^{-\varepsilon Cl},$$

где C — концентрация вещества в растворе, моль/л; l — толщина слоя жидкости, см; ε — коэффициент молярного светопоглощения, $M^{-1}cm^{-1}$.

Коэффициент молярного светопоглощения является относительно постоянной величиной, не зависящей от концентрации вещества, но изменяющейся от длины волны падающего света, природы растворенного вещества, условий среды и температуры раствора.

Отношение интенсивности светового потока, прошедшего через раствор (I_t) с шириной кюветы в 1 см, к интенсивности падающего светового потока I_o в процентах называется коэффициентом пропускания, обозначается (T) и выражается в процентах (%):

$$T = \frac{I_t}{I_o} \cdot 100.$$

Логарифм отношения I_o/I_t называется светопоглощением (D) и выражается в условных единицах (усл. ед.):

$$\lg \frac{I_o}{I_t} = D = \varepsilon Cl.$$

Из уравнения видно, что величина светопоглощения (D) прямо пропорциональна концентрации вещества в растворе. Эту зависимость можно выразить графически в координатах (D, C). Следует помнить, что линейная зависимость светопоглощения от концентрации раствора обычно сохраняется в пределах $D = 1-1,5$, при более высоких значениях D наблюдается отклонение от линейности.

РАБОТА НА ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРЕ

Фотоэлектроколориметр включают в сеть за 15 мин до начала измерений. Необходимо следить за рабочими

поверхностями спектрофотометрических кювет, которые перед каждым измерением следует тщательно протирать спиртово-эфирной смесью. По завершении измерений кюветы нужно промыть хромовой смесью (хромпиком).

При выполнении измерений необходимо помнить, что при установке кювет в кюветодержатель нельзя касаться пальцами их рабочих поверхностей, через которые будет проходить луч света.

Наличие загрязнений или капель раствора на рабочих поверхностях кюветы необходимо удалять фильтровальной бумагой или мягкой ветошью, так как они могут привести к получению неверных результатов измерений.

Наливать жидкость в кювету необходимо не ниже метки, нанесенной на боковую стенку кюветы. Не наклоняйте кювету с жидкостью при установке в кюветодержатель, так как это может привести к разлитию опытного образца и загрязнению кюветного отделения.

ПОРЯДОК ИЗМЕРЕНИЯ НА ФЭКе

Для проведения измерений на фотоэлектроколориметре необходимо подготовить две пробирки, в одну из которых наливают контрольный раствор или растворитель, в другую — опытный образец. Действия выполняют в следующем порядке:

- 1) в отсек кюветодержателя фотоэлектроколориметра напротив светового пучка помещают кювету с контрольным раствором или растворителем, в противоположный отсек кюветодержателя помещают кювету с опытным раствором;
- 2) закрывают крышку кюветного отделения;
- 3) вначале измеряют поглощение контроля, а затем заменяют ее на кювету с опытным образцом;
- 4) регистрируют отсчет по шкале пропускания (T , %) или поглощения (D , усл. ед.).

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ НА ФЭКе

1. Работа на фотоэлектроколориметре должна проводиться в чистом помещении, свободном от пыли, паров кислот и щелочей.

2. Вблизи фотоэлектроколориметра не должны располагаться громоздкие изделия, создающие неудобства в работе студента (лаборанта).

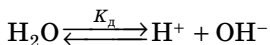
3. Студентам разрешается работать на фотоэлектроколориметре только в присутствии преподавателя.

4. Все регулировочные работы, связанные с проникновением за постоянные ограждения к токоведущим частям фотоэлектроколориметра: смена ламп, замена неисправных деталей, должны производиться после отключения фотоэлектроколориметра от сети.

5. При эксплуатации фотоэлектроколориметр должен быть надежно заземлен.

1.2.2. БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ И pH-МЕТРИЯ

Буферными называют растворы, величина pH которых практически не изменяется от прибавления к ним небольших количеств сильной кислоты или щелочи, а также при их разведении. При этом определяемая величина pH — это отрицательный логарифм концентрации ионов водорода, измеряемый в диапазоне 0–14 усл. ед. В основе шкалы положен показатель константы электролитической диссоциации воды. Вода является слабым электролитом.



$$K_d = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]} = 1,82 \cdot 10^{-16}.$$

Молярная концентрация воды равна 55,35 М.

$$K_d C_{\text{воды}} = [\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-] = 1,82 \cdot 10^{-16} \cdot 55,35 = 10^{-14} \text{ или } \text{pH} = 14.$$

Для чистой воды характерно равенство концентраций ионов водорода и гидроксидов $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] = 10^{-7}$, а $-\lg \text{H}^+ = \text{pH} = 7,0$. При pH 7,0 водный раствор имеет нейтральную реакцию. Если концентрация ионов водорода больше, чем концентрация ионов гидроксидов $[\text{H}^+] > [\text{OH}^-]$ (pH < 7,0), раствор имеет кислую реакцию; в противном случае $[\text{H}^+] < [\text{OH}^-]$ (pH > 7,0), раствор имеет щелочную реакцию.

Для определения значений рН буферного раствора используются приборы, которые называются рН-метрами. В основу работы этих приборов положен потенциометрический метод, основанный на измерении потенциала индикаторного электрода, находящегося в зависимости от состава среды.

Значение потенциала определяется по уравнению Нернста:

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln C,$$

где E_0 — величина стандартного потенциала, измеренного при концентрации ионов, равной 1 моль/л; R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура (К); z — число электронов, участвующих в реакции; F — постоянная Фарадея; $\ln C$ — концентрация ионов.

Величина окислительно-восстановительного потенциала зависит от природы среды и концентраций окисленной и восстановленной формы вещества и может быть определена по формуле

$$E = E_0 + \frac{0,059}{z} \cdot \lg \frac{[\text{Ок}]}{[\text{Восс}]},$$

$[\text{Ок}]$ и $[\text{Восс}]$ — концентрации окисленной и восстановленной формы ионов соответственно.

Для измерения величины рН среды необходимо наличие двух электродов: электрода сравнения (каломельный) и измерения (стеклянный).

Каломельный электрод должен обладать большей электропроводностью, иметь меньшую диффузию анализируемого раствора в электрод, при соблюдении особой чистоты всех реактивов и ртути, применяемых для изготовления электрода.

В качестве электрода сравнения чаще всего используется Ag/AgCl электрод. Он представляет собой платиновую проволоку, электрически покрытую серебром, а затем слоем AgCl . В некоторых случаях в качестве электрода сравнения можно использовать водородный или хингидронный электрод.

Перед измерениями необходимо доливать в каломельный электрод насыщенный раствор KCl , с внесением нескольких

кристаллов хлорида калия, с целью создания постоянной насыщенности. По истечении 2 ч с момента заполнения электрод сравнения готов к работе. В процессе эксплуатации следует следить за тем, чтобы раствор хлорида калия всегда находился на уровне наливного отверстия. В электроде не должно быть воздушных пузырей, так как это может привести к размыканию электрического контакта. В случае загрязнения раствора KCl он должен быть заменен на новый.

Каломельный электрод содержится погруженным в насыщенный раствор хлорида калия. Выкристаллизовавшийся хлорид калия перед использованием следует удалять, промывая электрод дистиллированной водой.

Стеклянный электрод представляет собой небольшой сосуд из тонкостенного стекла специального состава, обладающего большей электропроводностью, чем обычное стекло; внутрь сосуда должен быть налит раствор кислоты с определенной концентрацией ионов водорода, в который опущена платиновая проволока.

Стеклянный электрод позволяет измерять pH в широком интервале концентраций, может быть использован в присутствии окислителей и восстановителей и многих посторонних солей. Стеклянные электроды стабильны в течение долгого времени и в ряде случаев могут быть использованы в неводных средах. Однако к недостаткам их использования можно отнести возникновение потенциала асимметрии в том случае, если внутренняя его полость заполнена тем же раствором, что и измеряемая среда. Причиной возникновения этого потенциала является разница в строении наружной и внутренней поверхностей стекла. Потенциал асимметрии сказывается на определении pH, но изменяется сравнительно мало и может быть учтен введением поправки в процессе калибровки электрода.

Новый стеклянный электрод рекомендуется перед началом эксплуатации выдерживать в течение 24 ч в 0,1 М растворе HCl, а затем тщательно промыть дистиллированной водой, в которой он выдерживается еще 24 ч. Перед началом измерения необходимо стеклянный электрод выдерживать в воде или подходящем буферном растворе. Хранить подготовленные и откалиброванные электроды следует

в дистиллированной воде. При работе на рН-метре необходимо соблюдать особую осторожность, чтобы не повредить хрупкую стеклянную мембрану электродов.

Индивидуальная подготовка электродов к работе выполняется согласно прилагаемой к ним инструкции по эксплуатации. При настройке рН-метра всегда пользоваться стандартными калибровочными растворами с близкими к измеряемому диапазону значениями рН.

1.2.3. ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Метод центрифугирования основан на том, что частицы вещества, имеющие разную плотность, форму и размеры, осаждаются под действием центробежной силы с разной скоростью. Различают препаративное и аналитическое центрифугирование. Препаративное центрифугирование позволяет выделять большое количество клеточных частиц, с возможностью последующего изучения их структуры и биологической активности. Метод применим для выделения молекул ДНК и белков из предварительно очищенных препаратов. Аналитическое центрифугирование применяется для изучения высокоочищенных препаратов (например, органелл клеток), а для этого необходимо небольшое количество материала.

При этом характеристической величиной является величина центробежного ускорения (G), которое прямо пропорционально угловой скорости ротора (ω , рад \cdot с $^{-1}$) и расстоянию от оси вращения до середины центрифужной пробирки (r , см).

$$G = \omega^2 r.$$

При этом один оборот ротора составляет 2π радиан, поэтому угловая скорость ротора в оборотах в минуту при скорости вращения ротора (V , об/мин) равна

$$\omega = \frac{2\pi V r}{60}.$$

Центробежное ускорение будет равно

$$G = \frac{4\pi^2 V^2 r}{3600},$$

а относительное центробежное ускорение, выражаемое в единицах g при гравитационной постоянной, равной $980 \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$, можно вычислить по формуле

$$G = \frac{4\pi^2 V^2 r}{3600 \cdot 980} \quad \text{или} \quad G = 1,12 \cdot 10^{-5} V^2 r.$$

1.3. ПОДГОТОВКА ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.3.1. СБОР РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Растения для аналитических исследований собирают в сухую погоду в дневные часы, когда растения обсохнут от дождя и росы. Заготовку корней и корневищ (подземных органов) производят независимо от погодных условий. Максимальное количество активных веществ содержится в растении в период цветения (цветки и листья), а в период созревания плодов (корни, клубни и корневища). Надземные части собирают в начале цветения. У высоких растений срезают только цветущие верхушки (20–30 см), а толстые стебли, лишенные листьев, не трогают из-за содержания в них небольшого количества биологически активных веществ. Цветки и соцветия обрывают вручную во время цветения. В этот период цветы содержат больше действующих веществ, меньше осыпаются при хранении, лучше выдерживают сушку. Собранные растения тщательно сортируют, определяют видовой состав и затем сушат.

1.3.2. СУШКА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Заготовленное растительное сырье сушат в помещении при комнатной температуре, раскладывая сырье ровным слоем в 1–2 см, расправляя листья. Корни и корневища отряхивают от земли, обрезают надземные части, тонкие корни, отмершие и поврежденные участки и промывают в холодной воде. Промытое сырье раскладывают тонким слоем на чистую подстилку и подсушивают, при этом сырье часто перемешивают. Сушку производят до максимальной

потери влаги собранными растениями (корни и стебли ломаются с характерным треском, листья, цветки и соцветия легко растираются в порошок). Хранение сырья производят в бумажных пакетах, маркируя образцы, куда заносят данные по видовому составу, указывая место и сроки сбора растения.

1.3.3. СОДЕРЖАНИЕ ВЛАГИ В СЕМЕНАХ

Принцип метода. Необходимыми условиями для прорастания семян являются достаточная влажность, доступ кислорода и благоприятная температура, тогда как одним из условий сохранения жизнеспособности семян, находящихся в состоянии вынужденного покоя, служит низкое содержание в них воды в пределах 5–10%. При этом их жизнеспособность во время длительного хранения в основном зависит от температуры хранения и влажности семян. Для определения содержания воды в семенах их предварительно измельчают на механической мельнице, а затем высушивают в сушильных шкафах при 130°C. Семена древесных и других, содержащих эфирные масла, следует сушить при 105°C. При измельчении семян необходимо избегать согревания размалываемого материала и потери влаги. Перед сушкой семена необходимо грубо или мелко размолоть. Тонкий помол необходим семенам зерновых культур и хлопчатника. При этом следует использовать сито с ячейками 1 мм. Грубый помол необходим для семян бобовых и древесных пород, используя сито с ячейками 3–4 мм. Семена с высоким содержанием масла лучше не размалывать, а растирать в фарфоровой ступке.

Оборудование: секундомер; весы аналитические; сушильный шкаф; механическая мельница; тигельные щипцы.

Посуда: стаканчики из нержавеющей стали с закругленными у основания боковыми стенками, плоским дном и с плотно пригнанными крышками; эксикатор с осушителем.

Материалы и реактивы: 5 г помола зерновок пшеницы.

Ход работы. Взвесить стаканчик вместе с крышкой. Засыпать 5 г помола зерновок пшеницы в стаканчик, равномерно распределив по дну. Закрыть стаканчик крышкой и снова взвесить. Поставить стаканчик на крышку

и поместить в сушильный шкаф, нагретый предварительно до 130°C. Чтобы избежать потери тепла, стаканчик нужно ставить в сушильный шкаф очень быстро. После того как температура шкафа достигнет 130°C, сушка должна длиться при этой температуре 60 мин. Для семян твердой пшеницы продолжительность сушки следует увеличить до 120 мин. По окончании сушки стаканчики нужно быстро закрыть крышками и поместить на 30–40 мин в эксикатор для охлаждения с помощью тигельных щипцов. Затем взвесить стаканчики с их содержимым и крышками. Влажность образца рассчитывают по следующей формуле:

$$A, \% = \frac{[m_2 - m_3]}{[m_2 - m_1]} \cdot 100,$$

где m_1 — масса стаканчика и его крышки, г; m_2 — масса стаканчика, крышки и его содержимого, г; m_3 — масса стаканчика, крышки и его содержимого после сушки.

Определение влажности в семенах растений лучше проводить в 2–3 повторностях. Полученные результаты измерений не должны различаться между собой более чем на 0,2%.

Оформление работы. Записать результаты измерений и определить процент влажности зерновок пшеницы.

1.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВОДЫ И СУХОГО ВЕЩЕСТВА В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Принцип метода. Содержание воды в листьях является важнейшим показателем адаптации растений к условиям окружающей среды. Накопление воды в листьях растений зависит от погодных условий и этапов вегетации. В среднем содержание воды у большинства растений составляет 65–72% от сырой массы. Влаголюбивые виды растений имеют более высокое содержание воды при достаточной оводненности почвы, но быстро теряют влагу при ее понижении. У устойчивых к засухе растений содержание воды в растительных тканях бывает ниже, но ее колебания в условиях дефицита влаги меньше.

Оборудование: секундомер; весы аналитические; сушильный шкаф; щипцы; ножницы.

Посуда: бюксы, эксикатор.

Материалы и реактивы: 10 г проростков пшеницы.

Ход работы. Опыт проводится в двух повторностях, используя навески измельченных ножницами проростков пшеницы массой не менее 5 г. Вначале определяют массу сухого бюкса, который вместе с крышкой помещают в сушильный шкаф с температурой 130°C. Через 20 мин бюкс берут тигельными щипцами и помещают с открытой крышкой в эксикатор на 30 мин для охлаждения. После этого бюкс накрывают крышкой, берут щипцами и взвешивают на аналитических весах. Затем бюкс с открытой крышкой еще раз ставят в сушильный шкаф на 20 мин, после этого охлаждают в эксикаторе и снова взвешивают. Если масса бюкса не изменяется, то в него можно помещать навеску растительных тканей.

Бюкс с навеской взвешивают на аналитических весах и ставят в сушильный шкаф, прогретый до 130°C, на 60 мин. Затем образец охлаждают в эксикаторе и вновь взвешивают. После этого действие повторяется до тех пор, пока масса бюкса с материалом не будет изменяться.

Вычитая из массы исходного растительного материала массу высушенных проростков пшеницы, определяют количество воды во взятой навеске.

Метод расчета. Содержание воды в тканях растений рассчитывают в процентах от сырой или сухой растительной массы. Уравнение для расчета влажности приведено выше.

Оформление работы. Записать результаты измерений и определить процент влажности проростков пшеницы.

1.3.5. ОТБОР РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ АНАЛИЗА НА МИКРОЭЛЕМЕНТЫ

Принцип метода. В растениях накапливаются функционально активные вещества и различные элементы. Качественный и количественный состав элементов зависит от вида растения, сроков их сбора, места произрастания, а также от способов заготовки и условий хранения, собранных образцов растений и др. Растения для аналитических исследований собирают в сухую погоду в дневные часы,

когда они обсохнут от дождя и росы. Заготовку корней и корневищ (подземных органов) производят независимо от погодных условий. Надземные части собирают в начале цветения. Собранные растения тщательно сортируют, определяют видовой состав и затем сушат.

Оборудование: весы технические, ножницы, нож, лопата.

Материалы и реактивы: корни и надземная часть растений, бумажные пакеты, веревка.

Ход работы. Вблизи почвенного разреза закладывают три площади размером 1 м^2 с учетом микрорельефа и типичности состава. Травянистую растительность с площади состригают, связывают в снопы и взвешивают в свежем состоянии. Масса пробы для химического анализа должна быть не менее 1 кг.

Цветки и соцветия обрывают вручную во время цветения.

Крупностебельчатые растения (кукуруза, подсолнечник, топинамбур и др.) срезают с делянок в $2\text{--}4 \text{ м}^2$ по диагоналям или по рядкам, через каждые 3–4 куста отбирают части (листья, стебли, соцветия, семена) от 10 растений с делянки. В лаборатории пробы растений измельчают, перемешивают и определенную часть используют для анализа.

Корневую систему растений отбирают в двух или трех повторностях с площади в 25 см^2 на глубину интенсивного развития корневой системы.

Заготовленное сырье сушат в помещении при комнатной температуре, раскладывая сырье ровным слоем в 1–2 см, расправляя листья. Корни и корневища отряхивают от земли, обрезают надземные части, тонкие корни, отмершие и поврежденные участки и промывают в холодной воде. Промытое сырье раскладывают тонким слоем на чистую подстилку и подсушивают, при этом сырье часто перемешивают. Сушку производят до максимальной потери влаги собранными растениями (корни и стебли ломаются с характерным треском, листья, цветки и соцветия легко растираются в порошок). Хранение сырья производят в бумажных пакетах, маркируя образцы, куда заносят данные по видовому составу, указывая место и сроки сбора растения.

В лабораторных условиях растительный материал сушат в сушильных шкафах при 105°C в течение 6–8 ч. Образцы необходимо взвешивать до и после сушки на аналитических весах.

Оформление работы. Записать результаты исследований, охарактеризовав видовой состав растений, условия заготовки и сроки их хранения.

1.3.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОЛЬНОСТИ ЗЕРНОВОК ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

Принцип метода. Содержание минеральных несгораемых веществ в зерновках злаковых культур, выраженное в процентах, называется зольностью. Зольность отдельных частей зерна неодинакова, что имеет большое значение при определении посевных качеств зерновок. Наиболее высокую зольность имеют оболочки и алейроновый слой, несколько меньшую — зародыш и самую низкую — эндосперм. При этом содержание зольных веществ зависит от вида зерновок.

В семенах содержание золы составляет в среднем 3%.

Оборудование: муфельная печь; механическая мельница; аналитические весы; тигельные щипцы; шпатель.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетка автоматическая или пипетки на 5 мл — 3 шт.; фарфоровые или кварцевые тигли.

Подготовка тиглей к работе. Перед употреблением тигли помещают на 2 ч в 50%-ный раствор соляной кислоты, а затем обязательно промывают в растворе соляной кислоты, бидистиллированной водой и просушивают в течение 2 ч в сушильном шкафу при температуре 100–150°C. После промывания тигли нумеруют и прокаливают до постоянной массы.

Материалы и реактивы: 10 г зерновок пшеницы; 96%-ный этиловый спирт; концентрированная азотная кислота или спиртовой раствор уксуснокислого магния; бидистиллированная вода.

Ход работы. Зольность муки определяют двумя способами: 1) озоление без применения ускорителя; 2) озоление с применением в качестве ускорителя азотной кислоты или спиртового раствора уксуснокислого магния.

Способ 1. Определение зольности без применения ускорителя. Это основной метод. Берут 30–50 г зерновок и очищают их от сорных примесей, а затем размалывают на механической мельнице. При этом размер ячеек сита должен быть 1–2 мм. Помол массой 20–30 г высыпают на стеклянную пластинку размером 20×20 см и перемешивают шпателем. Затем помол набирают из разных мест (не менее чем из 10) с помощью совка в заранее прокаленные и взвешенные тигли (около 1,5–2 г), которые взвешивают с точностью до 0,0002 г. Тигли с помолом ставят у края дверцы муфельной печи, нагретой до температуры 400°C. Помол в тиглях сгорает. При этом надо следить за тем, чтобы продукт не воспламенился. После выделения продуктов сухой перегонки тигли задвигают внутрь муфеля. Сжигают помол до полного исчезновения черных частиц, пока цвет золы не станет белым или слегка сероватым. Затем тигли переносят в эксикатор для охлаждения. Когда тигли приобретут комнатную температуру, их взвешивают и массу записывают в журнал. Взвешенные тигли вновь помещают в накалившую муфельную печь на 20 мин, затем снова охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Если масса тиглей уменьшилась, то озоление продолжают до тех пор, пока два последующих взвешивания не дадут одинаковой массы или расхождения составят не более 0,0002–0,0003 г. После того как тигли достигнут постоянной массы, озоление считается законченным. Зольность в процентах на абсолютно сухое вещество вычисляют по формуле

$$A, \% = \frac{m_1 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - B)},$$

где m — масса навески муки, г; m_1 — масса золы, г; B — влажность муки, %.

Способ 2. Определение зольности с применением в качестве ускорителя азотной кислоты. Всю подготовительную работу к озолению и начало озоления проводят в порядке, указанном в методике определения зольности без ускорителя. Озоление ведут примерно около 1 ч, т. е. пока содержимое тигля не превратится в рыхлую массу серого цвета. Затем тигли вынимают из печи, ставят на фарфоровую или металлическую подставку и охлаждают (вне эксикатора).

После охлаждения в каждый тигель пипеткой прибавляют 0,2–0,5 мл азотной кислоты. Для выпаривания азотной кислоты тигли помещают на открытую дверцу муфельной печи. Выпаривать следует осторожно, не допуская кипения, чтобы предотвратить разбрызгивание кислоты и потери озоляемого продукта. Как только закончится испарение кислоты, тигли помещают на 20 мин внутрь муфельной печи, нагретой до 400°C, и продолжают озоление до полного сгорания продукта. Потом тигли охлаждают в эксикаторе, взвешивают и вычисляют процент зольности, как уже было описано выше.

Оформление работы. Записать результаты исследований. Сравнить способы озоления помола зерновок пшеницы между собой.

1.3.7. ОЗОЛЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Принцип метода. Озоление растительного материала используется для удаления всех органических соединений из исследуемого образца, при экстрагировании элементов раствора, для последующего их количественного определения. Озоление растительного материала можно провести двумя способами: сухое озоление и мокрое озоление. Метод сухого озоления основан на нагревании органических веществ до высокой температуры при доступе воздуха. Сухое озоление производят в фарфоровых, кварцевых или платиновых тиглях. При разрушении органических веществ с помощью этого метода на исследование берут относительно небольшие навески (1–10 г) исследуемых объектов и нагревают их в тигле до 300–400°C. Увеличение навесок исследуемых объектов является нежелательным, так как это значительно увеличивает время озоления. Этот метод минерализации имеет ряд недостатков, которые необходимо учитывать при проведении исследований. К главным относятся прежде всего улетучивание некоторых металлов или их соединений в процессе нагревания, а также взаимодействие отдельных металлов с материалом тиглей. При сухом озолении трудно контролировать температуру исследуемого материала непосредственно в тигле. При перегреве содержимого тигля некоторые металлы могут улетучиваться. В процессе сухого

озоления биологического материала даже при относительно невысокой температуре частично или полностью улетучиваются соединения ртути, таллия и др. При температуре выше 400°C хлориды кадмия, свинца, серебра, цинка, марганца, мышьяка являются летучими. При несколько более высокой температуре могут улетучиваться некоторые соединения меди, никеля, хрома и др. В процессе сухого озоления органических веществ при высокой температуре цинк, серебро, свинец и некоторые другие металлы могут взаимодействовать со стенками кварцевых и фарфоровых тиглей, а кобальт способен сплавляться со стенками платиновых тиглей или взаимодействовать с материалом фарфоровых тиглей. Кроме того, следует помнить, что при озолении растительного материала необходимо использовать деионизированную бидистиллированную воду, реактивы марки особой чистоты и посуду с высокой степенью частоты. Озоление органических веществ должно производиться в вытяжном шкафу с хорошей тягой.

Содержание золы в корнях и стеблях составляет 4–5, а листьях — 5–15%.

Оборудование: муфельная печь; ножницы; механическая мельница.

Посуда: фарфоровые тигли; колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетка автоматическая или пипетки на 5 мл — 3 шт.; колба Кьельдаля на 250 мл.

Материалы и реактивы: 10 г сухого измельченного растительного материала.

Реактивы: концентрированные HNO_3 и H_2SO_4 (конц- HNO_3 и конц- H_2SO_4), 20%-ная H_2SO_4 ; фтористоводородная кислота; бидистиллированная вода.

Ход работы.

1. *Сухое озоление.* Для этого берут 3 г мелкоизмельченного сухого растительного материала, который помещают в фарфоровые тигли. Затем тигли переносят в муфельную печь и озоляют при 400°C 2,5 ч. Золу обрабатывают азотной кислотой, которую затем выпаривают и прокаливают в муфеле в течение 2 ч. После этого золу смачивают водой, прибавляют 20 мл 20%-ной H_2SO_4 , нагревают и фильтруют через плотный бензольный фильтр. Осадок промывают водой,

подкисленной H_2SO_4 . Фильтр с осадком помещают в тот же тигель, подсушивают, прокалывают в муфеле, охлаждают, приливают 5 мл фтористоводородной кислоты. Затем выпаривают досуха, а к остатку приливают 5 мл 20%-ной H_2SO_4 . Раствор присоединяют к первому фильтрату. Объем доводят до 100 мл дистиллированной водой.

2. *Мокрое озоление.* Навеску измельченной растительной ткани (5–10 г) помещают в колбу Кьельдаля, смачивают конц- HNO_3 и добавляют 5 мл конц- H_2SO_4 . Колбу ставят в наклонное положение и оставляют до прекращения бурного вспенивания. После этого ставят на плитку и осторожно нагревают. По мере выпаривания в колбу добавляют по 5 мл конц- HNO_3 . После просветления раствора жидкость полностью выпаривают, осадок растворяют в 3 мл конц- H_2SO_4 , разбавляют водой и объемно переносят в мерную колбу на 100 мл.

Оформление работы. Записать методики сухого и мокрого озоления растительных тканей. Объяснить возможности их использования.

1.3.8. МЕТОДИКИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СУПЕРНАТАНТА

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 $(7000-12\ 000) \cdot g$ в рефрижераторных центрифугах при 0°C . Полученный после центрифугирования супернатант хранят в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$. Расчет объема супернатанта производят путем сложения величин объемов предварительно определенной в исследуемой растительной ткани гидровлаги и раствора, взятого для экстракции биогенных соединений (см. приложение 1).

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.

Пример приготовления гомогената из растительных тканей. Целое растение или его часть после взвешивания подвергают гомогенизированию путем механического растирания в ступке при постоянном охлаждении. После получения однородной массы ее центрифугируют. Надосадочную жидкость подвергают исследованию.

Зерновки с влажностью 8–10% и другие сухие части растений измельчают на механической мельнице (2 г зерновок

измельчают в течение 1 мин). Полученный сухой порошок взвешивают и растворяют в бидистиллированной воде или другой среде выделения в соотношении 1:3 (на 1 г зерновок добавляют 3 мл охлажденной среды выделения), охлажденной до 0°C. После перемешивания исследуемый образец центрифугируют при 7000g. Надосадочную жидкость (супернатант) используют для биохимических исследований. Методы расчета содержания БАВ в исследуемом образце приведены в приложении 1.

1.3.9. ЭКСТРАКЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Органы растений (листья, стебли, корни) вначале разрезают на мелкие части, а затем измельчают на механической мельнице в порошок с размером частиц в 1–2 мм. Вытяжку готовят путем настаивания порошка в 50% -ном этаноле в соотношении 1:20 (1 г растительного порошка настаивают на 20 мл 50% -ного этанола). Экстракцию проводят в течение 24 ч при +4°C. Удаление неразрушенных частиц, клеток, ядер и др. проводят путем фильтрования тканевого гомогената или центрифугированием при 7000g в течение 10–15 мин при температуре 2–4°C. Затем прозрачный раствор (фильтрат или супернатант) подвергают химическим исследованиям.

1.3.10. МЕТОДЫ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ ГОМОГЕНАТА РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Принцип метода. При определении низкомолекулярных соединений в гомогенатах растительных тканей необходимо прежде всего избавиться от белков, присутствие которых может повлиять на результаты исследований. Для осаждения белков в гомогенатах растительных тканей используют 5% -ные растворы трихлоруксусной кислоты (ТХУ, CCl_3COOH) или хлорной кислоты (ХК, HClO_4). После добавления к раствору гомогената осадителей смесь перемешивают, а затем центрифугируют 15 мин при 7000g. Осадок отбрасывают, а в супернатант добавляют NaOH или K_2CO_3 для нейтрализации pH среды. После добавления раствора щелочи среда должна быть нейтральной (pH 6,0–7,0),

что устанавливается с помощью рН-метра или лакмусового индикатора.

Оборудование: центрифуга; рН-метр; гомогенизатор; аналитические весы.

Посуда: коблы на 100 мл — 4 шт.; пипетки на 1 мл — 1 шт., на 2 мл — 1 шт., на 10 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: гомогенат проростков пшеницы; 5% -ная трихлоруксусная кислота; 5% -ная хлорная кислота; 1 М раствор NaOH; 5 М раствор K_2CO_3 .

Приготовление растворов. Растворы трихлоруксусной кислоты (50 мг/мл); хлорной кислоты (50 мг/мл); NaOH (40 мг/мл); K_2CO_3 (691,05 мг/мл) готовят, растворяя соответствующие навески в д. в.

Ход работы. Навеску растительной ткани (0,5–1,0 г) растирают до однородной массы, а затем переносят в центрифужную пробирку с 2 мл 5% -ной хлорной кислоты или ТХУ. Смесь перемешивают, добавляют еще осадителя до общего соотношения 1:9 (на 1 г ткани 9 мл осадителя) и оставляют на 15 мин для более полной экстракции низкомолекулярных соединений. Осажденные белки растительных тканей отделяют центрифугированием в течение 15 мин при 7000g. Супернатант переносят в центрифужную пробирку и нейтрализуют избыток осадителя, добавляя в пробирку 0,2 мл 5 М раствора K_2CO_3 или 1 М NaOH. После перемешивания измеряют рН раствора. Если рН раствора нейтральный, то пробирку центрифугируют 15 мин при 7000g. Полученный после центрифугирования супернатант используют для определения содержания низкомолекулярных соединений растительных тканей.

Оформление работы. Записать результаты исследования, а также раскрыть механизм действия трихлоруксусной кислоты и хлорной кислоты, используемых для осаждения белков.

1.3.11. МЕТОДЫ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ СУЛЬФАТОМ АММОНИЯ

Принцип метода. Растворимость белков зависит от их строения, величины изоэлектрической точки, наличия на поверхности белковой глобулы заряженных и гидрофобных

аминокислотных остатков и др. В изоэлектрической точке белки обладают обычно минимальной растворимостью, что принимается во внимание при разработке метода их осаждения. Осаждать белки можно с помощью неорганических и органических соединений. Эффект высаливания зависит от природы ионов соли. По силе осаждающего действия анионы натриевых солей располагаются в следующем порядке: $\text{SO}_4^{2-} > \text{цитрат} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{CNS}$. Эффективность высаливающего действия среди катионов возрастает в следующем ряду: $\text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+$.

Действие ионов обусловлено усилением ориентации диполей молекул воды в поверхностных структурах белковой глобулы, способствуя уменьшению растворимости белков. В присутствии высоких концентраций соли белки утрачивают упорядоченное расположение полипептидных цепочек в поверхностных структурах, что создает условия для образования белковых ассоциатов, неустойчивых в растворе. Процессу осаждения белков способствует понижение температуры раствора, которая сопровождается конформационными перестройками белковой глобулы, уменьшением степени гидратации белков, обуславливающими их агрегацию и выпадение в осадок.

Оборудование: спектрофотометр; центрифуга; аналитические весы; шейкер; штатив.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт.; пипетки на 5 мл — 2 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; лиофилизированный препарат пероксидазы ($RZ = 0,6-1,0$); 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 , путем их смешивания на pH-метре до pH 7,0. Раствор пероксидазы (0,4 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0. Супернатант готовят из проростков пшеницы, используя 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0.

Ход работы. 16 пробирок установить в два ряда по 8 пробирок в каждом. В первый ряд пробирок вносят по 5 мл супернатанта, а во второй ряд пробирок по 5 мл 10 мкМ

раствора пероксидазы. Затем в 7 пробирок первого и второго рядов вносят навеску сульфата аммония как показано в таблице 1.2. После растворения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ пробирки помещают в холодильник ($+2^\circ\text{C}$). Через 2 ч отмечаем появление осадка в каждой пробирке.

Пробирки с раствором пероксидазы центрифугируют в течение 15 мин при 7000g, а надосадочную жидкость анализируют на спектрофотометре, измеряя светопоглощение при 403 нм. Данные записывают в таблицу 1.2.

Таблица 1.2

Растворы супернатанта и пероксидазы, белок которых осаждают сульфатом аммония

№ пробирки	Объем раствора, мл	Масса $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, г	Концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, %	Степень насыщения раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Наблюдаемые изменения	Светопоглощение D_{403} , усл. ед.
1	5,0	0,56	10	0,23		
2	5,0	0,88	15	0,35		
3	5,0	1,25	20	0,47		
4	5,0	1,67	25	0,58		
5	5,0	2,14	30	0,70		
6	5,0	2,69	35	0,81		
7	5,0	3,33	40	0,93		
8 конт- роль	5,0	—	—	—		

Метод расчета. Содержание сульфата аммония (C , %) в растворе рассчитывают по следующей формуле:

$$C, \% = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100,$$

где m_0 — масса раствора, г; m_1 — масса сульфата аммония, г.

Степень насыщения раствора (X) сульфатом аммония рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C_{\%}}{43,4},$$

где $C_{\%}$ — концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, %; 43,4 — насыщающая концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 100 г раствора при 25°C, %.

Оформление работы. Определить концентрацию сульфата аммония, необходимую для осаждения белков супернатанта и в растворе пероксидазы. Построить график зависимости светопоглощения раствора пероксидазы (D_{403} , усл. ед.) от концентрации сульфата аммония (C , %).

1.3.12. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Принцип метода. Растворимость белков зависит от природы растворителей, pH среды, ионной силы, температуры, наличия в белке гидрофобных аминокислотных остатков, уровня структурной организации, концентрации и т. д. При растворении белков в воде, молекулы которой имеют высокую полярность и поэтому ориентируют расположение полярных и заряженных аминокислотных остатков в поверхностных структурах белковой глобулы, создаются условия для сохранения нативной структуры белков в растворе. При этом контакт молекул воды с поверхностными аминокислотными остатками обуславливает формирование гидратной оболочки, препятствующей слипанию белков, повышающей их растворимость в водной среде. Однако при добавлении органического растворителя происходят изменения в составе молекул, располагающихся в поверхностном слое белковой глобулы, что оказывает влияние на ориентацию белка в среде, способствуя возрастанию сил притяжения между молекулами белка и их агрегацию. При этом следует отметить, что сольватация является процессом адсорбционным, обуславливая существование динамического равновесия во взаимодействии поверхностных функциональных групп белка с молекулами растворителя, что способствует изменению конформации белковой глобулы. Процесс агрегации белковых молекул может возрасти при добавлении в среду электролитов (NaCl , KCl , CaCl_2 , $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ и др.). Кроме того, следует помнить, что использование органических растворителей для осаждения ферментов может приводить к частичной их денатурации.

При этом величина инактивации фермента зависит от степени его очистки.

Оборудование: штатив; секундомер.

Посуда: пробирки на 2,0 мл — 1 шт., на 5 мл — 3 шт.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; 96% -ный этиловый спирт; ацетон; хлороформ; 2,0 М раствор NaCl.

Приготовление растворов. Раствор NaCl (117 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в. Супернатант готовят, измельчая и растирая проростки пшеницы до однородной массы, к которой добавляют 2,0 М раствор NaCl.

Ход работы. В три пробирки вносят по 2,0 мл супернатанта в 2,0 М растворе NaCl. В первую пробирку добавляют 3,0 мл 96% -ного этилового спирта, во вторую — 3,0 мл ацетона, в третью — 3,0 мл хлороформа. Пробирки встряхивают и затем отмечают время образования осадка. Результаты записывают в таблицу 1.3.

Таблица 1.3

Объемы органических растворителей, используемых для осаждения белков супернатанта проростков пшеницы

№ пробирок	Объем супернатанта, мл	Объем растворителя, мл			Время образования осадка, мин
		этанол	ацетон	хлороформ	
1	2,0	3,0	—	—	
2	2,0	—	3,0	—	
3	2,0	—	—	3,0	

Оформление работы. Записать результаты опыта и определить органический растворитель, в присутствии которого белки проростков пшеницы быстрее выпадают в осадок.

1.3.13. МЕТОДЫ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ АЦЕТОНОМ

Принцип метода. При растворении белков в воде силы притяжения между молекулами биополимера и воды значительно превосходят взаимное притяжение молекул белков, поэтому они присутствуют в растворе. Внесение в раствор органического растворителя уменьшает притяжение

полярных групп белка с молекулами воды, способствуя возрастанию сил взаимодействия между молекулами белков, обуславливая процесс их агрегации и выпадения в осадок. Скорость осаждения белков возрастает в присутствии солей, ионы которых вызывают усиление ориентации диполей молекул воды, способствуя уменьшению растворимости белков. Кроме того, ускорению процесса осаждения белков способствует понижение температура среды. Поэтому осаждение ферментов лучше всего проводить при 0–2°C, используя в качестве органического растворителя этиловый спирт или ацетон. Высокая степень очистки ферментов приводит к уменьшению количества посторонних белков, которые в избытке могли бы защитить его от действия денатурирующих факторов среды.

Оборудование: водяная баня; термометр; центрифуга; мешалка.

Посуда: химический стакан.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; ацетон (технический) и ацетон (х. ч.); 0,05 M NaCl.

Приготовление растворов. Гомогенат получают путем измельчения проростков пшеницы и растирания их на гомогенизаторе. В среду добавляют 0,05 M NaCl. Раствор NaCl (2,93 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Ход работы. Стакан с гомогенатом растительных тканей (100 мл) помещают в ацетоновую баню с температурой –4°C. При постоянном перемешивании гомогената, производя измерение температуры среды. Как только температура понижается до 0°C, начинают приливать охлажденный до такой же температуры ацетон. Объем ацетона должен быть равен 0,5 объема гомогената. Затем смесь центрифугируют при 0°C в течение 15 мин при 10 000g. Надосадочную жидкость сливают и к ней добавляют такое же количество охлажденного ацетона. После 5 мин перемешивания смесь снова центрифугируют в течение 15 мин при 10 000g. Осадки объединяют и лиофилизируют.

Оформление работы. Записать результаты опыта, отметить особенности действия органических растворителей при осаждении белков.

1.3.14. ДИАЛИЗ БЕЛКОВ

Принцип метода. Диффузия ионов и молекул низкомолекулярных веществ через пористую мембрану называется диализом. Диализ основан на применении мембран, проницаемых для воды и низкомолекулярных веществ и непроницаемых для белков. Чаще всего с этой целью используют пленки из целлофана (нитрат целлюлозы). В лаборатории подлежащий диализу раствор белка помещают в мешок из целлофана и погружают последний в сосуд с дистиллированной водой (рис. 1.2).

Метод диализа позволяет избавиться от избытка соли, использованной при высаливании белков. При этом непрерывный ток воды через сосуд приводит к полному переходу в него всех проходящих через целлофан веществ, а белки остаются внутри. В результате диализа происходит отделение высокомолекулярных веществ, например белков, от электролитов и молекул низкомолекулярных веществ.

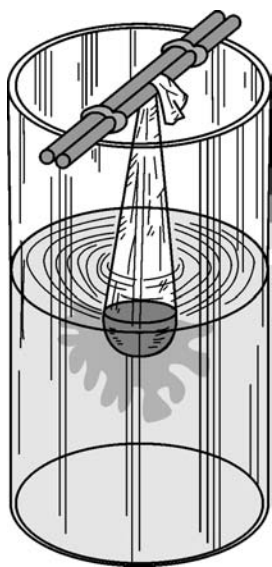


Рис. 1.2
Стакан с диализным мешком

Оборудование: фотоэлектроколориметр; магнитная мешалка; аналитические весы.

Посуда: пипетки на 1 мл — 2 шт., на 5 мл — 1 шт.; химический стакан на 1 л.

Материалы и реактивы: 10 мкМ раствор пероксидазы из корней хрена ($RZ = 0,6-1,0$) и 0,5 мМ раствор 2,4-динитрофенола.

Приготовление растворов. Раствор 0,5 мМ 2,4-динитрофенола готовят из исходного 5 мМ раствора (0,92 мг/мл) путем его разбавления в 10 раз.

Раствор пероксидазы (0,4 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,5 мМ растворе 2,4-динитрофенола.

Ход работы. В диализный мешочек, сделанный из целлофана,

заливают раствор пероксидазы с 2,4-динитрофенолом. Диализ проводят в стакане, наполненном дистиллированной водой, куда помещают диализный мешочек с раствором пероксидазы и 2,4-динитрофенола, оставляя завязанный конец мешочка над поверхностью воды, при постоянном перемешивании. В течение 60 мин наблюдают за изменением окраски дистиллированной воды в стакане, отбирая в пробирки по 5 мл раствора через каждые 15 мин. Поглощение растворов измеряют на фотоэлектроколориметре при 340–360 нм. Результаты опыта записывают в таблицу 1.4.

Таблица 1.4

Величины светопоглощения раствора 2,4-динитрофенола от времени диализа

Измерения	Время t , мин	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Оформление работы. Записать условия проведения диализа, зарисовать диализатор, построить график зависимости величин светопоглощения (D , усл. ед.) от времени (t , мин) диализа.

1.3.15. МЕТОД ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ РАСТВОРА ПЕРОКСИДАЗЫ С 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛОМ

Принцип метода. Гель-фильтрация относится к специализированным методам очистки белков от низкомолекулярных соединений. Чаще всего очищают белки, которые осадили с помощью различных солей или органических соединений. Кроме того, гель-фильтрация используется для удаления субстратов из гомогенатов, содержащих ферменты.

В гель-фильтрации используется нерастворимый носитель, которым обычно заполняется хроматографическая колонка. При этом носитель представляет собой гранулы, имеющие поры, через которые низкомолекулярные

вещества способны проникать в них. Это замедляет скорость перемещения по колонке низкомолекулярных веществ и обеспечивает быстрое движение белков, которые не способны проникнуть через поры во внутрь гранулы.

В качестве носителя используют гели полисахарида декстрана, который принято называть сефадексом. В аналитической практике нашли применение несколько типов сефадексов (G-10, G-25, G-50, G-75, G-100 и др.), которые различаются между собой размером и количеством пор, а также величиной гранул. Сефадексы легко набухают в воде, образуя гель. Хроматографическая колонка, заполненная сефадексом, способна разделить вещества в зависимости от их молекулярной массы.

Оборудование: спектрофотометр с проточной кюветой, коллектор фракций, хроматографическая колонка размером 1×30 см.

Посуда: химический стакан; пипетки; пробирки.

Материалы и реактивы: пероксидаза из корней хрена ($RZ = 0,6-1,0$); 2,4-динитрофенол; сефадекс G-25, раствор 0,05 M NaCl.

Приготовление растворов. Раствор 0,5 mM 2,4-динитрофенола готовят из исходного 5 mM раствора (0,92 мг/мл) путем его разбавления в 10 раз. Раствор пероксидазы (0,4 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,5 mM растворе 2,4-динитрофенола. Раствор NaCl (2,93 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Приготовление геля. 4 г сефадекса G-25 насыпают в химический стакан объемом 500 мл и заливают в него 200 мл д. в. После перемешивания дают время гранулам сефадекса осесть, а надосадочную жидкость сливают. Процедуру повторяют несколько раз, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. Если замачивание сефадекса проводить при 23°C, то гель набухнет через 3 ч. Нагревание геля на водяной бане при 100°C может ускорить процесс набухания до 1 ч.

Подготовка колонки. Для хроматографии используется обычно колонка размером 1×30 см. На дне колонки должен быть установлен фильтр, который должен пропускать только элюирующий раствор и фракционируемые вещества.

Перед началом работы хроматографическую колонку устанавливают в вертикальное положение, а затем ее заполняют сефадексом, избегая попадания пузырьков воздуха в гель. Колонка с сефадексом уравнивается элюируемым раствором 0,05 М NaCl и подбирается оптимальная скорость элюции (20–40 мл/ч).

Ход работы. Перед началом хроматографирования на поверхность геля осторожно наносится раствор пероксидазы с 2,4-динитрофенолом, который должен проникнуть в гель и после этого начинается элюирование раствора фермента 0,05 М NaCl, отбирая элюат с колонки в пробирки. Для этого используется коллектор фракций. За движением по колонке пероксидазы и 2,4-динитрофенола можно наблюдать визуально, так как пероксидаза в растворе имеет коричневую окраску, а 2,4-динитрофенол — желтую. Кроме того, на выходе с колонки элюат можно пропустить через проточную кювету, установленную в спектрофотометре, регистрируя светопоглощение раствора при 403 нм (максимум светопоглощения пероксидазы в растворе).

По окончании элюции светопоглощение растворов пероксидазы и 2,4-динитрофенола измеряют на спектрофотометре при 350 и 403 нм. Результаты опыта записывают в таблицу 1.5.

Таблица 1.5

Величины светопоглощения и объемы элюции растворов пероксидазы и 2,4-динитрофенола после их фракционирования на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной 0,05 М NaCl

№ пробирки	Объем элюата V , мл	Светопоглощение D , усл. ед.	
		350 нм	403 нм

Оформление работы. Записать условия опыта. Построить график элюции пероксидазы и 2,4-динитрофенола, откладывая на оси абсцисс величины объема элюата (V , мл), а на оси ординат — светопоглощение проб (D , усл. ед.).

1.4. ПОДГОТОВКА ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.4.1. ПОЛУЧЕНИЕ ПЛАЗМЫ И СЫВОРОТКИ КРОВИ

Забор крови производится из вены с помощью иглы или иглы со шприцем в центрифужную пробирку (предварительно пробирка промывается дистиллированной водой). Пробирка и игла должны быть сухими, во влажных может происходить гемолиз эритроцитов, что может повлиять на результаты анализа. Кровь центрифугируют 15–20 мин при 3000 об/мин. В результате центрифугирования формируются два слоя: верхний светло-желтый — плазма, нижний — красный — состоит из форменных элементов крови. До начала биохимических исследований плазма крови хранится в холодильнике при +4°C.

Сыворотку крови получают после отстаивания крови в холодильнике при +4°C в течение суток. После этого верхний слой жидкости осторожно сливают в чистую пробирку, не повреждая образовавшийся сгусток форменных элементов крови. Сыворотка крови отличается от плазмы тем, что в ней отсутствуют элементы свертывания крови.

1.4.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГОМОГЕНАТА ИЗ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Свежую ткань печени или мышц предварительно многократно промывают 0,9% -ным раствором NaCl (физиологический раствор), охлажденным до 0°C, а затем обсушивают фильтровальной бумагой и измельчают ножницами. На весах взвешивают измельченную ткань и помещают в стакан для гомогенизирования. В случае если используется стеклянный гомогенизатор, зазор между стенкой и пестиком должен быть 0,2–0,3 мм; скорость вращения пестика не более 800 об/мин. Время измельчения тканей: печень — 30–40 с, мышцы — до 60 с. Если используют механический гомогенизатор, скорость вращения ножей можно доводить до 900 об/мин. Все работы необходимо проводить на холоде, помещая стакан гомогенизатора в чашку со льдом.

Разбавление при гомогенизировании должно проводиться с учетом содержания определяемого биологически активного вещества. Так, в случае определения активности алкогольдегидрогеназы в печени используют разбавление 1:3 или 1:5 (на 1 г сырой ткани добавляют 3 или 5 мл охлажденной среды выделения).

Полученный тканевой гомогенат центрифугируют при 7000g в течение 10–15 мин ($t = 0^{\circ}\text{C}$). Надосадочную жидкость (супернатант) подвергают биохимическим исследованиям. Методы расчета содержания БАВ в исследуемом образце приведены в приложении 1.

1.4.3. ПОЛУЧЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНОЙ МАССЫ

Принцип метода. Эритроцитарную массу получают из крови путем центрифугирования и отделения от плазмы. Для длительного хранения к эритроцитарной массе добавляют раствор с криоконсервантами, который ее консервирует и стерилизует. После этого эритроцитарную массу помещают в пластиковые контейнеры и хранят в замороженном виде.

Оборудование: центрифуга; аналитические весы.

Посуда: колбы на 500 мл.

Материалы и реактивы: кровь; 0,9% -ный NaCl; маннит или сахароза; глицерин ($\rho = 1,248$), Na_2HPO_4 ; жидкий азот.

Приготовление растворов. Раствор NaCl готовят, растворяя 9 г соли в 991 мл б. д.

Раствор криоконсерванта готовят в колбе на 1 л согласно таблице 1.6.

Таблица 1.6

Состав криоконсерванта

Реагенты	Молекулярная масса	Содержание в 1 л раствора	Концентрация, мг/мл	Концентрация, М
Маннит	182,2	40,0 г	40,0	0,22
NaCl	58,5	7,0 г	7,0	0,12
Na_2HPO_4	358,1	0,3 г	0,3	0,00084
Глицерин	92,1	400,0 мл	499,2	5,42
H_2O	18,0	до 1000,0 мл	—	—

Ход работы. 500 мл крови центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. Затем плазму сливают, а осадок промывают 3–4 раза 0,9% -ным NaCl. После каждого промывания раствор NaCl удаляют центрифугированием. Для длительного хранения к эритроцитарной массе приливают раствор криоконсерванта в соотношении 1:1 (к 1 г эритроцитарной массы добавляют 1 г криоконсерванта). Взвесь эритроцитов оставляют при комнатной температуре на 15 мин для полной их глицеринизации. Более длительная экспозиция может приводить к частичному гемолизу эритроцитов. После перемешивания смесь центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а оставшуюся эритроцитарную массу замораживают.

Замораживание эритроцитов производят путем погружения контейнера в жидкий азот (–196°C) на 2 мин. Хранится эритроцитарная масса в контейнере с жидким азотом.

Оттаивают эритроциты на водяной бане при температуре 45°C в течение 25–30 с, при постоянном покачивании.

Оформление работы. Записать методику консервирования эритроцитов и раскрыть их роль в крови животных и человека.

1.5. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ

1.5.1. ВЫДЕЛЕНИЕ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ ИЗ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ

Принцип метода. Основными субклеточными органеллами являются митохондрии, ядро, лизосомы, мембраны эндоплазматического ретикулума. Для выделения субклеточных структур готовится определенная среда, содержащая соединения, препятствующие их разрушению, и сохраняющая весь спектр низко- и высокомолекулярных биогенных соединений, которые в дальнейшем можно определить с помощью стандартных аналитических методов исследования. В основе способа выделения субклеточных фракций используется метод ультрацентрифугирования, который позволяет получить в достаточном количестве субклеточные элементы (ядра, митохондрии, хлоропласты и микросомы)

и изучить их состав и функции. Все операции необходимо проводить при температуре 0–4°C, используя охлажденную посуду и растворы.

Оборудование: ультрацентрифуга; весы аналитические; гомогенизатор или фарфоровая ступка.

Посуда: колба на 500 мл — 1 шт.; пипетка на 5 мл — 1 шт.; центрифужные пробирки.

Материалы и реактивы: колеоптили проростков пшеницы. *Среда гомогенизации:* 0,5 М раствор сахарозы, 10 мМ раствор 2-меркаптоэтанола, 5 мМ раствор ЭДТА, 50 мМ трис-НСl буфер, рН 7,8.

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,05 М растворов триса и HCl путем их смешивания на рН-метре до рН 7,8. Затем в буферный раствор добавляют сахарозу (171 мг/мл), 2-меркаптоэтанол (0,781 мг/мл) и ЭДТА (1,461 мг/мл).

Ход работы. Навеску колеоптилей пшеницы (12–15 г) растирают на гомогенизаторе или в фарфоровой ступке в течение 1 мин с 1–2 объемами среды гомогенизации при температуре 0–4°C и слабом освещении. Гомогенат фильтруют через 4 слоя марли и центрифугируют при 750g в течение 10 мин, осаждая ядра и мембраны клеточных стенок. Надосадочную жидкость осторожно переносят в центрифужные пробирки, которую затем центрифугируют в течение 15 мин при 15 000g. В осадке получают фракцию митохондрий. Надосадочную жидкость вновь центрифугируют при 106 000g в течение 60 мин. В осадке получают фракцию микросом.

Оформление работы. Нарисовать схему эксперимента, выделить этапы получения субклеточных фракций. Назвать и описать строение компонентов субклеточных фракций.

1.5.2. ОЧИСТКА И ОБОГАЩЕНИЕ МИКРОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ В СТУПЕНЧАТОМ ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ САХАРОЗЫ

Принцип метода. Градиентное центрифугирование позволяет разделить полученную в предыдущем эксперименте фракцию микросом на отдельные компоненты. Анализуют 6 фракций из 7, которые формируются по степени убывания концентрации сахарозы от 45 до 20%.

При этом верхняя (седьмая) фракция, содержащая большое количество растворимых белков нестабильной концентрации не анализируется. Для анализа компонентов фракции микросом используют электронно-микроскопический контроль и определяют активность ферментов маркерных реакций (сукцинат-цитохром с-редуктазы, К, Na-АТФазу, НАДН-цитохром с-редуктазы, ИДФазу). В 34–45% -ной сахарозе обычно выявляются фрагменты плазмалеммы, в 30% -ной — мембраны аппарата Гольджи, а в 20–25% -ной — мембраны эндоплазматического ретикулума.

Оборудование: ультрацентрифуга, гомогенизатор.

Посуда: колба на 500 мл — 2 шт., колбы на 25 мл — 6 шт., пипетка на 10 мл — 6 шт.

Материалы и реактивы: фракция микросом, растворы сахарозы: 45, 38, 34, 30, 25 и 20% . Среда выделения: 0,5 М раствор сахарозы, 5 мМ *трис*-HCl буфер, pH 7,2.

Приготовление растворов. *Буферный раствор* готовится из исходных 0,005 М растворов *триса* и HCl путем их смешивания на pH-метре до pH 7,2. Затем в буферный раствор добавляют сахарозу (171 мг/мл).

Растворы сахарозы готовят, растворяя навеску сахарозы в 5 мМ *трис*-HCl буфере, pH 7,2 (45% (1,20 г/мл), 38% (1,17 г/мл), 34% (1,15 г/мл), 30% (1,13 г/мл), 25% (1,10 г/мл) и 20% (1,08 г/мл)).

Ход работы. Для приготовления ступенчатого градиента плотности сахарозы в центрифужную пробирку (3×53 мл) вначале вносят 8 мл 45% -ного раствора сахарозы, а затем осторожно последовательно по степени убывания плотности наслаивают на него по 7 мл растворы сахарозы: 38, 34, 30, 25 и 20% . Пробирку с градиентом плотности сахарозы готовят обычно за 30 мин до нанесения микросомальной суспензии. Осадок микросом, полученный в предыдущем опыте, промывают средой выделения и затем ресуспендируют с помощью стеклянного гомогенизатора в 3 мл среды выделения. После этого полученную суспензию осторожно наслаивают в приготовленный градиент сахарозы. Далее пробирку центрифугируют при 95 000g в течение 120 мин. После центрифугирования отбирают фракции микросом. Разделение на фракции происходит таким

образом, что каждый последний миллилитр слоя попадает в последующую фракцию, что обеспечивает полный сбор мембранного материала с границей между слоями. Полученные микросомальные фракции подвергают электронно-микроскопическому контролю, анализу маркерных ферментов, изучают состав белков и липидов.

Оформление работы. Нарисовать схему эксперимента, проанализировать микросомальные фракции и описать их функции.

1.5.3. СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ЯДЕР ИЗ КЛЕТОК ЭВГЛЕНА

Принцип метода. Для выделения ядер клетки или ткани разрушают в средах, содержащих ионы кальция и магния, с последующей очисткой ядер. Однако следует учитывать, что ядра обладают низкой по сравнению с другими органеллами клетки, механической прочностью и поэтому выход ядер из растительных тканей не превышает 5–8%. Поэтому для разрушения клеток предлагается использовать ультразвук.

Оборудование: центрифуга рефрижераторная; гомогенизатор Поттера; камера Горяева; микроскоп; аналитические весы; pH-метр; ультразвуковая установка.

Посуда: чашки Петри, колбы на 1 л — 4 шт.; на 100 мл — 1 шт.; пипетка на 10 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: культура эвглены, *среда А*: 1 л раствора содержит 0,25 М сахарозы, 0,5 мМ CaCl_2 , 10 мМ *трис*-HCl-буфера (pH 7,2) и 100 г декстрана Т-40; *раствор 1* — в 1 л 2,4 М сахарозы, 0,5 мМ CaCl_2 , 10 мМ *трис*-HCl-буфера (pH 7,2) и 100 г декстрана Т-20; *раствор 2* — в 1 л 2,2 М сахарозы, 0,5 мМ CaCl_2 , 10 мМ *трис*-HCl-буфера (pH 7,2) и 1 мл тритона Х-100; *среда для промывания* — в 1 л 0,14 М NaCl, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид или 60 мМ NaHSO_4 , 0,5 мМ CaCl_2 и 10 мМ *трис*-HCl-буфера (pH 7,2); *раствор метилгрюн-пиронина* — 150 мг метилового зеленого и 250 мг пиронина растворяют в 2,5 мл 96%-ного этанола, добавляют 20 мл глицерина и доводят до 100 мл 0,5%-ным раствором свежеперегнанного фенола.

Приготовление растворов. Реактивы готовят в день опыта и хранят при 0°C. *Буферный раствор* готовится из

исходных 10 мМ растворов триса и HCl путем их смешивания на рН-метре до рН 7,2. *Среду А* готовят, добавляя в колбу на 1 л 85,6 г сахарозы, 55,5 г CaCl₂ и 100 г декстрана Т-40; объем раствора доводят до 1 л 10 мМ *трис*-HCl-буфером (рН 7,2). *Раствор 1* готовят, добавляя в колбу на 1 л 821,5 г сахарозы, 55,5 г CaCl₂ и 100 г декстрана Т-20; объем раствора доводят до 1 л 10 мМ *трис*-HCl-буфером (рН 7,2). *Раствор 2* готовят, добавляя в колбу на 1 л 756,06 г сахарозы, 55,5 г CaCl₂ и 1 мл тритона Х-100; объем раствора доводят до 1 л 10 мМ *трис*-HCl-буфером (рН 7,2). *Среду для промывания* готовят, добавляя в колбу на 1 л 8,19 г NaCl, 17,4 мг фенилметилсульфонилфторида или 7,2 г NaHSO₄, 55,5 г CaCl₂ и объем раствора доводят до 1 л 10 мМ *трис*-HCl-буфером (рН 7,2).

Ход работы. Гетеротрофную (не содержащую хлорофилла) культуру эвглены снимают шпателем с чашек Петри, суспендируют с помощью гомогенизатора Поттера в 50 мл *среды А*, подсчитывают в камере Горяева плотность суспензии и центрифугируют при 4000g в течение 1 мин. Все последующие операции выполняют при температуре 0–4°C. Осадок суспендируют *средой А* до плотности 14–17 · 10⁶ клеток/мл. Затем суспензию разливают по пробиркам от ультразвукового дезинтегратора объемом 30 мл. Пробирки опускают в стакан со льдом. Обработку ультразвуком проб проводят в течение 7–8 мин с интервалом в 1 мин и перерывом в 30 с при оптимальном режиме работы прибора. Ход разрушения клеток контролируется под микроскопом с фазово-контрастным устройством. В препарате должны быть видны разрушенные клетки, обрывки клеточной пелликулы, единичные неразрушенные клетки. При окрашивании разбавленным в 5–10 раз метилгрюн-пиронина на общем розовом фоне препарата должны быть видны бирюзовые ядра. Полученный гомогенат центрифугируют 5 мин при 6000g. Осадки объединяют и суспендируют в 15 мл *среды А* в гомогенизаторе Поттера. Далее суспензию центрифугируют в ступенчатом градиенте сахарозы. В центрифужные пробирки наливают по 3 мл *раствора 1*, после этого аккуратно — 20 мл *раствора 2*, а сверху наслаивают 5 мл суспензии. Затем суспензию и *раствор 2* осторожно перемешивают,

погружая стеклянную палочку на $1/3$ объема *раствора* 2. Пробирки центрифугируют 80 мин при 50 000*g*. Надосадочную жидкость осторожно отбирают пипеткой с широким кончиком и отбрасывают. Стенки пробирки тщательно вытирают ватным тампоном и осторожно снимают верхний слой осадка, суспендируют его в 50 мл *среды для промывания* и оставляют на ночь в холодильнике при перемешивании. Суспензию центрифугируют 10 мин при 6000*g*. Осадок суспендируют в 15 мл *среды А* и вновь центрифугируют в ступенчатом градиенте сахарозы, как описано выше.

Полученный осадок содержит ядра и небольшое количество зерен парамилона. Контрольное окрашивание метилгрюн-пиронином и микроскопирование в фазовом контрасте должны показать отсутствие неразрушенных клеток, обрывков пелликулы и цитоплазматических загрязнений.

Выход ядер определяют по содержанию ДНК, которое должно составлять 10–15%.

Оформление работы. Нарисовать схему эксперимента, проанализировать полученные фракции и определить процентный состав фракции ядер.

1.5.4. СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Принцип метода. Митохондрии служат органеллами, осуществляющими в клетках растений функции дыхания. Митохондрии имеют двойную мембрану. Внутренняя мембрана образует выросты — кристы. Внутреннее пространство митохондрии заполнено матриксом, где локализуются ферменты цикла трикарбоновых кислот, окисления жирных кислот и нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК) для биосинтеза белка. Во внутренней мембране расположены компоненты электрон-транспортной системы. Предлагаемый способ позволяет выделить из клеток растений митохондрии и изучить функциональную активность некоторых ферментов.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; 0,9%-ный раствор NaCl или KCl; 0,25–0,3 М раствор сахарозы, содержащий 10 мМ ЭДТА, pH 7,4; 0,25 М раствор сахарозы,

содержащий 10 мМ триэтаноламина и 2 мМ ЭДТА, рН 7,4; 0,01 М фосфатный буфер, рН 7,4–7,5.

Все реактивы готовят перед началом исследований на бидистиллированной воде и хранят при +4°C.

Условия эксперимента. Все действия по выделению субклеточных фракций проводят при 0°C. Для этого используют ледяную баню или процедуры проводят в холодной комнате. Предварительно охлаждают и инструменты, используемые во время исследований.

Получение гомогената. На аналитических весах взвешивают измельченную растительную ткань (навеска 1 г) и помещают в стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком. Гомогенизирование растительной ткани проводят в выбранной среде выделения при соотношении 1:9 (1 г ткани на 9 мл охлажденной среды выделения), в течение 30–60 с при скорости вращения пестика — 800–900 об/мин. Все процедуры следует проводить при низкой температуре. Полученный тканевой гомогенат фильтруют или подвергают центрифугированию.

Градиентное центрифугирование. На первом этапе центрифугирования достигается удаление неполностью разрушенных клеток и ядер. Для этого гомогенат помещают в центрифужную пробирку, уравнивают и центрифугируют в течение 10 мин при 10^3g . Супернатант I осторожно сливают, а осадок, содержащий ядра и неразрушенные клетки, отбрасывают. На втором этапе, для осаждения митохондрий, супернатант I центрифугируют в течение 10 мин при $14 \cdot 10^3g$. После центрифугирования в осадке получают митохондрии, которые промывают средой выделения. Если митохондрии выделяли в сахарозной среде, то для промывки используют 0,25 М раствор сахарозы, не содержащей ЭДТА. Для этого к осадку митохондрий добавляют 5 мл среды выделения и осторожно гомогенизируют вручную с помощью тефлонового пестика. Затем полученную взвесь митохондрий еще раз центрифугируют (10 мин при $14 \cdot 10^3g$). Супернатант III отбрасывают, а осадок промытых митохондрий используют в аналитических исследованиях.

Исследование митохондрий. Для изучения активности митохондриальных ферментов, которые локализируются на

внутренней мембране или матриксе, необходимо разрушить органеллы. Для этого используют ультразвук, многократное действие замораживания и оттаивания, обработку детергентом (дигитонин, производные холевой или дезоксихолевой кислот, додецилсульфат натрия, тритон X-100, твин-80 и др.).

При анализе активности трансаминаз (АсТ и АлТ), сукцинат- и малатдегидрогеназ митохондрии разрушают с помощью 0,1% -ного раствора тритона X-100 в соотношении 1:2 (на 1 г ткани добавляют 2 мл тритона X-100). Осадок митохондрий суспендируют вручную в стеклянном гомогенизаторе, оставляя после этого пробы на 25–30 мин при 0°C. Фрагменты митохондриальных мембран удаляют центрифугированием в течение 20 мин при $24 \cdot 10^3 g$.

При исследовании активности ферментов пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса митохондрии разрушают путем замораживания и оттаивания. При этом замораживание осуществляется при -20°C , а оттаивание — при $+23^\circ\text{C}$. Действие повторяют 3–4 раза.

Оформление работы. Записать условия опыта и нарисовать схему эксперимента. Зарисовать митохондрии и написать формулу АТФ.

1.5.5. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ ИЗ МЕЗОКОТИЛЕЙ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

Принцип метода. Митохондрии являются органеллами, в которых протекают процессы синтеза АТФ. Митохондрии обычно имеют удлинённую палочковидную форму длиной 4–7 мкм и диаметром 0,5–2 мкм. При выделении митохондрий необходимо придерживаться следующих правил. Гомогенизация должна проводиться в течение ~5 мин и при температуре 0–4°C. В среде гомогенизации должен присутствовать осмотик (сахароза, манит или сорбит), создающий изотонические условия. Кроме того, в среду вводят антиоксиданты (аскорбиновая кислота, 2-меркаптоэтанол, цистеин или др.) и бычий сывороточный альбумин. Постоянство рН среды поддерживается буферным раствором с рН, близкой к нейтральной (рН 7,4). Для связывания катионов используются комплексообразователи (ЭДТА или ЭГТА).

Оборудование: центрифуга рефрижераторная; рН-метр; аналитические весы; ступка и пестик из оргстекла; пинцет с пластиковым покрытием; мягкая кисточка, весы.

Посуда: колбы на 500 мл — 4 шт.; пипетки на 5 мл — 1 шт.; бокс с крышкой на 5 мл; стаканы химические на 250 мл — 2 шт.; воронки диаметром 10–12 см — 2 шт.; центрифужные пробирки; посуда со льдом.

Материалы и реактивы: этиолированные проростки кукурузы или пшеницы. *Среда гомогенизации:* 0,4 М сахара в трис-НCl-буфере 0,2 М (рН 7,4 при 0°C); 1%-ный бычий сывороточный альбумин (БСА); 5 мМ ЭДТА. *Среда промывки:* 0,4 М сахара в трис-НCl-буфере 0,2 М (рН 7,4 при 0°C).

Приготовление растворов. Реактивы готовят в день опыта и хранят при 0°C. *Буферный раствор* готовится из исходных 0,2 М растворов триса и НCl путем их смешивания на рН-метре до рН 7,4. Затем в буферный раствор добавляют сахарозу (137,8 мг/мл), БСА (1 г в 100 г раствора) и ЭДТА (1,461 мг/мл).

Ход работы. Мезокотили 4-дневных этиолированных проростков (20 г) измельчают, промывают дистиллированной водой, обсушивают и выдерживают 30 мин при +4°C. Все дальнейшие операции проводят при +4°C. Навеску растирают в пластиковой ступке, последовательно заливая ее *средой гомогенизации* в соотношении 1:5. Гомогенат фильтруют через 4 слоя марли. Отжимают марлю с помощью пинцета. Фильтрат центрифугируют 10 мин при 1000g. Осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость разливают в пробирки и центрифугируют 15 мин при 12 000g. Надосадочную жидкость сливают, а к осадкам добавляют по 2 мл *среды промывки*. После этого стеклянной палочкой осадок отделяют от дна и переводят в раствор с помощью кисточки. Содержимое пробирок объединяют в одной или двух пробирках, а затем центрифугируют 15 мин при 12 000g. После удаления надосадочной жидкости осадок с митохондриями переносят в бокс и ресуспендируют в 1–2 мл *среды промывки* осторожными движениями кисточки. Обычно из 20 г мезокотилей выделяется около 2 мг белка митохондрий. Маркерными ферментами митохондрий могут быть

цитохромоксидаза, сукцинатдегидрогеназа и изоцитрат-дегидрогеназы.

Оформление работы. Записать условия опыта и нарисовать схему эксперимента. Объяснить присутствие в среде гомогенизации осмотика и антиоксиданта.

1.5.6. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ

Принцип метода. Выделение митохондрий печени проводят в холодной комнате при 0°C. Печень после промывания измельчают ножницами и гомогенизируют до однородной массы. С помощью центрифугирования избавляются от неразрушенных клеток и ядер (10 мин при 600g). Осаждают митохондрии центрифугированием в течение 10 мин при 14 000g. Для консервирования митохондрий используют 0,25 М раствор сахарозы. Хранят митохондрии при 0°C.

Оборудование: аналитические весы; гомогенизатор; центрифуга, штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 6 шт.; пипетка на 1 мл — 3 шт., на 10 мл — 1 шт.;

Материалы и реактивы: печень; фильтровальная бумага; 0,25 М раствор сахарозы, содержащий 0,001 М ЭДТА, pH 7,4; 0,25 М раствор сахарозы; концентрированная HCl; КОН.

Приготовление растворов. Среда выделения содержит сахарозу (85,6 мг/мл) и ЭДТА (0,292 мг/мл), pH 7,4. pH раствора доводят с помощью растворов HCl и КОН.

Раствор сахарозы (85,6 мг/мл) готовят, растворяя навеску в б. в.

Растворы 1 М КОН (56,11 мг/мл) и 0,1 М КОН (5,61 мг/мл) готовят, растворяя соответствующие навески в б. в.

Растворы 1 М и 0,1 М HCl готовят, растворяя соответствующие объемы концентрированной соляной кислоты в б. в.

Ход работы. Печень (10 г) промывают охлажденной до 0°C средой выделения, измельчают ножницами. Ткань переносят в гомогенизатор, добавляют среду выделения в соотношении 1 : 10 (на 1 г печени 10 мл среды выделения), а затем гомогенизируют до однородной массы. Гомогенат

центрифугируют 10 мин при 600g. Супернатант сливают и хранят при 0°C. К осадку добавляют 20 мл среды выделения и после гомогенизирования центрифугируют 10 мин при 600g. Супернатанты объединяют и центрифугируют в двух пробирках 10 мин при 14 000g. Осадки объединяют и суспендируют в 0,5 мл среды выделения, а затем добавляют 40 мл среды выделения и центрифугируют 10 мин при 14 000g. Осадок суспендируют в 0,25 М растворе сахарозы, не содержащей ЭДТА, и вновь центрифугируют 10 мин при 14 000g. Супернатант сливают, а на осадок митохондрий осторожно наливают 0,3 мл 0,25 М раствора сахарозы, смывая его верхний слой. Процедуру повторяют два раза и после этого осадок суспендируют 0,5 мл 0,25 М раствором сахарозы. Суспензию митохондрий хранят при 0°C.

Оформление работы. Записать последовательность выполнения исследований и отметить особенности в методике выделения митохондрий из печени.

1.6. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И РАСЧЕТА КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВА В РАСТВОРЕ

1.6.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ 0,1 М АЦЕТАТНОГО БУФЕРНОГО РАСТВОРА

Принцип метода. Буферными называют растворы, величина pH которых практически не изменяется от прибавления к ним небольших количеств сильной кислоты или щелочи, а также при их разведении. При этом определяемая величина pH — это отрицательный логарифм концентрации ионов водорода, измеряемый в диапазоне 0–14 усл. ед. Ацетатный буферный раствор представляет собой смесь слабой кислоты (уксусной кислоты) и соли (ацетата натрия), имеющих с этой кислотой общий анион (CH_3COO^-).

Оборудование: pH-метр, механическая мешалка.

Посуда: колбы на 500 мл — 2 шт.; мерный стакан; пипетка на 5 или 10 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: 0,1 М раствор уксусной кислоты; 0,1 М раствор ацетата натрия.

Приготовление рабочих растворов. Раствор уксусной кислоты готовят, добавляя 2,86 мл 17,5 М кислоты (ледяная уксусная кислота) в колбу на 500 мл, объем которой доводят до метки дистиллированной водой; раствор ацетата Na готовят, растворяя 6,8 г навески ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) в колбе на 500 мл, доводя объем до метки д. в.

Подготовка рН-метра к работе. Приступать к работе можно только через 20–30 мин после включения рН-метра. Перед эксплуатацией прибор должен быть настроен по стандартным буферным растворам (обычно используются два стандартных буферных раствора со значениями рН, близкими к диапазону приготавливаемых буферных растворов). Все измерения выполнять при постоянной температуре. Перед выполнением измерений электроды необходимо промывать дистиллированной водой и вытирать досуха мягкой фильтровальной бумагой. Во время измерения электроды должны погружаться в исследуемый раствор на глубину не менее 1 см. Показатели можно регистрировать только после 30–120 с от начала погружения электродов в исследуемый раствор.

Ход определения. Мерный стакан устанавливают на механическую мешалку, и затем последовательно начинают приливать в него растворы уксусной кислоты и ацетата натрия, постоянно перемешивая. При приближении показаний рН-метра к требуемой величине рН лучше дальнейшее добавление растворов производить с помощью пипетки. Постепенно приливая компоненты буферного раствора до установления необходимого значения рН.

Задача 1. Сколько мл уксусной кислоты и грамм ацетата натрия необходимо взять, чтобы приготовить 500 мл раствора, в котором концентрация уксусной кислоты была равна 0,1 М, а ацетата натрия — 0,2 М? Для приготовления раствора использовать ледяную уксусную кислоту с плотностью 1,05 г/см³.

Задача 2. Вычислить величину рН приготовленного выше раствора, если величина pK_a уксусной кислоты равна 4,76.

Задача 3. Определить величину рН приготовленного раствора на рН-метре и сравнить ее значение с теоретической величиной.

1.6.2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ВЕЩЕСТВА В РАСТВОРЕ

Способ построения калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используется исходный стандартный раствор анализируемого вещества, из которого готовят ряд разбавлений. Затем в каждой пробе проводят химическую реакцию с содержащимся веществом. По окончании реакции производят измерение поглощения в каждой пробе при длине волны, соответствующей максимуму поглощения раствора.

Кроме того, для построения калибровочного графика можно использовать вещество с известным коэффициентом молярного поглощения, путем его разбавления.

Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая полученные данные в координатах (D , усл. ед., C , мг/мл или моль/л).

D — поглощение вещества в растворе, усл. ед., откладывается по оси ординат, а C — концентрация вещества в исследуемом растворе, выраженная в мг/мл или моль/л, по оси абсцисс.

Метод расчета. Количество вещества (мкмоль/г влажной массы) в пробе рассчитывают по формуле

$$C = \frac{C_0 V_1 V_2}{V_3 P},$$

где C_0 — концентрация вещества, определенная по калибровочному графику, мг/мл; V_1 — общий объем гомогената, мл; V_2 — объем реакционной среды в кювете, мл; V_3 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; P — навеска ткани, г.

Определение количества вещества по стандартному образцу. Для этого используется стандартный раствор вещества, приготовленный с высокоточной навеской. Расчет вещества в анализируемой пробе производят, используя следующие уравнения:

$$D_{\text{оп}} = C_{\text{оп}} \varepsilon l,$$

$$D_{\text{ст}} = C_{\text{ст}} \varepsilon l,$$

где $D_{\text{оп}}$ и $D_{\text{ст}}$ — поглощение опытного и стандартного образцов; $C_{\text{оп}}$ и $C_{\text{ст}}$ — концентрации веществ в опытной и стандартной пробах.

$$\frac{D_{\text{оп}}}{C_{\text{оп}}} = \frac{D_{\text{ст}}}{C_{\text{ст}}},$$

Определение содержания анализируемого вещества в опытной пробе производят по следующему уравнению:

$$C_{\text{оп}} = \frac{D_{\text{оп}} C_{\text{ст}}}{D_{\text{ст}}}.$$

1.6.3. СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВА В РАСТВОРЕ

Раствор — это однородная система переменного состава, состоящая из двух и более компонентов, между которыми имеются физические, а иногда реализуются и химические взаимодействия. Присутствие вещества в растворе определяется понятием «концентрация». Концентрации могут быть выражены различными способами (процентная, молярная, моляльная, нормальная, мг%, мг/мл и др.). Наиболее часто в практических расчетах используются только процентная ($C_{\%}$) и молярная ($C_{\text{м}}$) концентрации. При этом с помощью процентной концентрации выражают присутствие вещества в 100 г раствора, а молярной — присутствие количества вещества в 1 л (дм^3) раствора. При расчете молярной концентрации количественный показатель (моль) означает присутствие в растворе $6,022 \cdot 10^{23}$ молекул и их элементарных составляющих (атомов, ионов, электронов и т. д.).

Процентную концентрацию вычисляют с помощью формулы

$$C_{\%} = \frac{m_c}{m_0} \cdot 100,$$

где m_c — масса вещества; m_0 — масса раствора.

Молярную концентрацию вычисляют, используя следующую формулу:

$$C_{\text{м}} = \frac{n}{V}, \quad (\text{моль/л (М), ммоль/л (мМ), мкмоль/л (мкМ)}),$$

где n — количество вещества; V — объем раствора.

Взаимный пересчет концентраций можно осуществить, используя уравнения молярной массы (M_M , г/моль) и плотности (ρ , г/см³):

$$M_M = \frac{m_c}{n}, \quad \rho = \frac{m_0}{V},$$

$$C_{\%} = \frac{C_M \cdot M_M \cdot V \cdot 100}{m_0} = \frac{C_M \cdot M_M}{10 \cdot \rho},$$

$$C_M = \frac{C_{\%} m_0}{100 \cdot M_M \cdot V} = \frac{10 \cdot C_{\%} \cdot \rho}{M_M}.$$

1.6.4. СПОСОБ РАСЧЕТА КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРА ПРИ ЕГО РАЗБАВЛЕНИИ

В основе способа лежит закон постоянства количества вещества в растворе и отсутствие его зависимости от отбираемого объема.

$$C_{M1} = \frac{n}{V_1}, \quad C_{M2} = \frac{n}{V_2},$$

$$C_{M1} \cdot V_1 = C_{M2} \cdot V_2,$$

$$C_{M2} = \frac{C_{M1} \cdot V_1}{V_2},$$

где C_{M1} и C_{M2} — концентрации растворов до и после разбавления соответственно; V_1 и V_2 — объемы растворов до и после разбавления соответственно; n — количество вещества.

Задача. Рассчитать концентрацию раствора, полученного после разбавления, если для разбавления было взято 0,5 мл раствора с концентрацией 5 ммоль/л и после разбавления общий объем раствора составил 0,5 л?

1.6.5. СПОСОБ РАСЧЕТА КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВА В РАСТВОРЕ

В основе способа, закон постоянства значения коэффициента молярного поглощения вещества и независимость этого показателя от концентрации раствора.

$$D_1 = \varepsilon C_{M1} l,$$

$$D_2 = \varepsilon C_{M2} l,$$

$$\varepsilon = \frac{D_1}{C_{M1} \cdot l}, \quad \varepsilon = \frac{D_2}{C_{M2} \cdot l},$$

$$\frac{D_1}{C_{M1} \cdot l} = \frac{D_2}{C_{M1} \cdot l},$$

$$C_{M2} = \frac{C_{M1} \cdot D_1}{D_2},$$

где D_1 и D_2 — поглощение растворов до и после разбавления соответственно; C_{M1} и C_{M2} — концентрации растворов до и после разбавления соответственно; ε — молярный коэффициент поглощения; l — ширина кюветы.

1.6.6. СПОСОБ ОБРАБОТКИ ГРАФИКА ЛИНЕЙНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ПО МЕТОДУ НАИМЕНЬШИХ КВАДРАТОВ

Проводя химические эксперименты исследователь получает набор величин, которые могут быть выражены уравнением общего вида $y = f(x)$, где y рассматривается в качестве зависимой переменной, или функции от другой — независимой переменной величины x , называемой аргументом. Соответствие между аргументом и функцией может быть задано таблицей, формулой, графиком и т. д. При этом в случае исследования кинетики реакций используется следующее уравнение: $dC = v \cdot dt$. Где y может быть концентрацией продукта (dC), x — показателем времени (dt), тогда как тангенс наклона прямой определяет величину скорости химической реакции (v). Анализ таких данных называется регрессионным анализом, а графическая прямая — линией регрессии. Зависимость устанавливаемая между переменными y и x имеет следующий вид:

$$y = ax + b.$$

При этом величина a определяет значения тангенса наклона прямой, а b — величину отрезка, отсекаемого на оси y .

Метод наименьших квадратов основан на предположении, что сумма квадратов отклонений x_i от их средней \bar{x} есть величина минимальная, т. е.

$$\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = \min.$$

Используя метод наименьших квадратов можно определить величины a и b , характеризующие прямую линию, которая представляет наиболее точное соответствие с экспериментальными данными используя следующее уравнение.

$$a = \frac{N \sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2},$$

$$b = \frac{(\sum y_i)(\sum x_i^2) - (\sum x_i)(\sum x_i y_i)}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2},$$

x_i и y_i — данные, полученные экспериментально; N — число измерений.

1.6.7. СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАКСИМУМА СВЕТОПОГЛОЩЕНИЯ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛА

Принцип метода. В основе фотометрического способа исследования веществ проявляется способность химических соединений поглощать энергию света определенных длин волн с последующим определением их качественного и количественного состава. Используемые для этих целей приборы преобразуют с помощью фотоэлементов световую энергию в электрическую.

Поглощение веществ в ультрафиолетовой (200–350 нм) и видимой (350–800 нм) областях количественно описывается следующим уравнением:

$$D = \lg \frac{100}{T} = \varepsilon \cdot C \cdot l,$$

где D — светопоглощение вещества, усл. ед.; T — пропускание образца, %; ε — коэффициент молярного светопоглощения, $\text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$; C — концентрация исследуемого вещества, моль/л; l — толщина кюветы, см.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; аналитические весы.

Посуда: колбы на 500 мл, 100 мл; пробирки — 7 шт.; цилиндр на 100 мл; пипетка на 10 мл.

Материалы и реактивы: 500 мл 0,5 мМ раствора 2,4-динитрофенола (рабочий раствор) и дистиллированная вода. Опытный образец — раствор 2,4-динитрофенола с неизвестной концентрацией.

Ход работы. 50 мкМ раствор 2,4-ДНФ залить в кювету и установить в кюветное отделение ФЭКа. Контролем служит кювета с дистиллированной водой. Попеременно переключая светофильтры, необходимо при каждом из них снять показания величин пропускания (T , %) и светопоглощения (D , усл. ед.), которые записывают в таблицу 1.7, и затем рассчитать значения молярного коэффициента поглощения 2,4-динитрофенола при разных длинах волн.

Таблица 1.7

Величины длин волн и максимумов светопоглощения
2,4-динитрофенола

№ свето- фильтра	Длина волны, нм	Величина пропус- кания T , %	Величина светопогло- щения D , усл. ед.	Концент- рация 2,4-ДНФ, мкМ	Молярный коэффициент светопоглощения, $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$
1					
2					
3					
4					
5					
6					

По данным таблицы построить на миллиметровой бумаге два графика: 1) зависимость величин светопоглощения раствора (D , усл. ед.) от длины волны (λ , нм); 2) зависимость молярного коэффициента светопоглощения (ε , $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) от длины волны (λ , нм). Затем из графиков определить величину длины волны максимального светопоглощения 2,4-динитрофенола (λ_{max}).

Оформление работы. Записать величину (D , усл. ед.) максимального поглощения и указать λ_{max} .

1.6.8. СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЯРНОГО КОЭФФИЦИЕНТА СВЕТОПОГЛОЩЕНИЯ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛА ПО КАЛИБРОВОЧНОМУ ГРАФИКУ

Приготовить калибровочные растворы 2,4-динитрофенола, как показано в таблице 1.8. Для этого в пробирки последовательно вносят вначале раствор 2,4-динитрофенола с исходной концентрацией 50 мкМ, а затем приливают дистиллированную воду. После перемешивания производят измерения поглощения полученных растворов. Контролем служит кювета с дистиллированной водой. Показания поглощения растворов записывают в таблицу 1.8.

По данным таблицы построить на миллиметровой бумаге график зависимости величин светопоглощения раствора (D , усл. ед.) от его концентрации (2,4-ДНФ, мкМ). По тангенсу угла наклона калибровочной кривой определить величину молярного коэффициента светопоглощения 2,4-динитрофенола.

Таблица 1.8

Приготовление рабочих растворов 2,4-динитрофенола для построения калибровочного графика

Пробирки	Объем раствора 2,4-ДНФ, мл	Объем дистиллированной воды, мл	Концентрация 2,4-ДНФ в пробирке				Светопоглощение D , усл. ед.
			мкг/мл	мкг	мкМ	нмоль	
1	1,0	4,0					
2	2,0	3,0					
3	3,0	2,0					
4	4,0	1,0					
5	5,0	—					

Метод расчета. Основное уравнение, используемое для расчета молярного коэффициента светопоглощения 2,4-динитрофенола:

$$D = \varepsilon \cdot C \cdot l, \quad \varepsilon = \frac{D}{C \cdot l},$$

где D — светопоглощение раствора 2,4-динитрофенола, усл. ед.; ε — коэффициент молярного светопоглощения, $\text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$; C — концентрация 2,4-динитрофенола, мкМ; l — ширина кюветы, см.

Определение концентрации опытного образца. Опытный раствор заливают в спектрофотометрическую кювету и проводят определение светопоглощения. Контролем служит кювета с дистиллированной водой. Затем по калибровочному графику, или используя молярный коэффициент светопоглощения, определяют концентрацию 2,4-динитрофенола в опытной пробе.

Оформление работы. Произвести запись определенного молярного коэффициента светопоглощения 2,4-динитрофенола и его концентрацию в опытной пробе. Рассчитать массу и количество 2,4-динитрофенола в опытной пробе.

1.7. МЕТОДЫ РАСЧЕТА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Любой экспериментатор при проведении измерений получает серию данных, несколько отличающихся друг от друга, что может быть вызвано многими причинами. В основном различают систематические, случайные ошибки и промахи.

Систематические ошибки могут возникнуть в результате неисправной работы приборов, загрязнения реактивов. Такие ошибки повторяются при проведении всей серии измерений.

Случайные, независимые друг от друга ошибки вызываются непредсказуемыми и поэтому неконтролируемыми явлениями. Такие ошибки возникают при попадании загрязнений во время измерений в некоторые пробы, при отборе проб различными (по объему) пипетками и т. д.

Систематические ошибки можно выявить и уменьшить, тогда как случайные трудно поддаются устранению.

Промахи возникают вследствие недостаточного внимания исследователя: несоблюдения условий проведения эксперимента, неправильной подготовки образцов или записи наблюдений, ошибок при выполнении вычислений.

Статистическую обработку полученных опытным путем данных проводят по следующей схеме.

Данные, полученные из n измерений, составляют ряд различающихся между собой величин $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$.

Из этой серии измерений находят пределы отклонения, где x_i — данные, полученные при проведении измерений; \bar{x} — среднее арифметическое, найденное путем

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}.$$

Сумма всех положительных и отрицательных отклонений от среднего должна равняться нулю: $\sum \Delta x_i = 0$.

Это равенство выполняется тем точнее, чем точнее вычислено значение \bar{x} .

Единичные измерения в серии (выборке) характеризуются среднеквадратичной ошибкой или стандартным отклонением \bar{S} :

$$\bar{S} = \sqrt{\frac{\sum (\Delta x_i)^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}.$$

Число выборок может быть как угодно велико. Каждая из них является случайной со своей средней и среднеквадратичной ошибкой ($S_{\bar{x}}$):

$$S_{\bar{x}} = \frac{\bar{S}}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum (\Delta x_i)^2}{n(n-1)}}.$$

Вычисление погрешности результата измерений проводят при определении степени надежности α — долей случаев, в которых при данном числе измерений среднее арифметическое лежит в определенных пределах. В большинстве случаев принимают $\alpha = 0,95$ или $0,99$. Это значит, что 95% или 99% всех измерений лежат в указанных пределах:

$$\Delta x = \epsilon_{\alpha,k} = t_{\alpha,k} \cdot S_{\bar{x}}.$$

Коэффициент $t_{\alpha,k}$ называется коэффициентом нормированных отклонений или критерием Стьюдента. Эту величину находят по специальным таблицам в зависимости от α и $K = n - 1$. Величина K называется числом степеней свободы. Коэффициенты нормальных отклонений для значений α , равные 0,95 и 0,99, приведены в таблице 1.9.

Коэффициенты нормальных отклонений ($t_{\alpha, k}$)

α	K								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,95	4,30	3,18	2,78	2,57	2,45	2,37	2,31	2,26	2,23
0,99	9,93	5,84	4,60	4,03	3,71	3,50	3,36	3,25	3,17

В завершение расчета определяют относительную ошибку:

$$\varepsilon_x = \frac{\Delta x}{\bar{x}} \cdot 100, \%$$

Следовательно, порядок вычисления погрешностей должен быть записан в такой последовательности:

- 1) среднее арифметическое $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$;
- 2) стандартное отклонение $\bar{S} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$;
- 3) среднеквадратичная ошибка среднего $S_{\bar{x}} = \frac{\bar{S}}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$;
- 4) погрешность результатов измерений

$$\Delta x = \varepsilon_\alpha = t_{\alpha, k} \cdot S_{\bar{x}},$$

где $t_{\alpha, k}$ — коэффициент Стьюдента, найденный по таблице;

- 5) окончательный результат измерений

$$\bar{x} \pm \Delta x;$$

- 6) относительная ошибка

$$\varepsilon_x = \frac{\Delta x}{\bar{x}} \cdot 100, \%$$

1.8. ПОРЯДОК ЗАПИСИ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

При выполнении лабораторной работы необходимо все записи производить в следующем порядке.

1. Принцип метода.
2. Оборудование.
3. Посуда.
4. Реактивы.
5. Приготовление рабочих растворов.
6. Построение калибровочного графика.
7. Ход определения.
8. Метод расчета.
9. Оформление работы.

Такой порядок записи работ позволяет студентам, поняв суть метода, разобраться в механизме качественной реакции, описанной в разделе «Принцип метода». Разделы 2–5 приводятся для того, чтобы лаборанты могли подготовить, а студенты знать, какие приборы, посуда, реактивы и рабочие растворы необходимы для выполнения лабораторной работы. Рабочие растворы готовятся, как описано в разделе «Приготовление растворов». Расчет концентрации вещества в растворе и способ построения калибровочного графика описаны выше. Величины буферных растворов приведены в приложении 2, а значения молекулярных масс соединений, используемых в практикуме, в приложении 3. Разделы 6–9 используются студентами уже при выполнении лабораторных работ. При этом концентрацию вещества в исследуемом образце студенты определяют по калибровочному графику или по формуле, данной в разделе «Методы расчета». Кроме этого, исследователю необходимо помнить, что данные, полученные с использованием в расчетах малого числа повторностей, могут содержать высокий процент ошибки. При этом ошибка может возрастать, если в расчетах используются данные единичных стандартных проб, тогда как использование калибровочного графика, построенного на основании множества данных стандартных проб, позволяет этого избежать. Однако при построении калибровочной кривой экспериментатор должен помнить, что тангенс угла наклона кривой должен быть равен 45° . Так как отклонение угла наклона калибровочной кривой от этой величины будет приводить к возрастанию ошибки в величинах экспериментальных данных. *Поэтому все результаты исследований должны подвергаться*

статистической обработке, основные показатели которой описаны выше в разделе «Методы расчета экспериментальных данных». При этом лабораторная работа считается выполненной только после записи результатов работы, которые должны содержать описание наблюдаемых изменений при выполнении эксперимента и краткий анализ полученных данных.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие меры безопасности нужно соблюдать в биохимической лаборатории?
2. Рассказать о мерах безопасности при работе с концентрированными кислотами и щелочами.
3. Рассказать об оказании первой помощи при химических ожогах.
4. Описать основные физико-химические методы, используемые в биохимии.
5. Где и в какие сроки собирают и сушат растительное сырье?
6. Рассказать о методах определения влаги в зерновках и растительном материале.
7. Составить схему опыта озоления растительного материала.
8. С какой целью и как осаждают белки из раствора?
9. При каких концентрациях сульфата аммония в растворе можно полностью осадить белки?
10. Какие органические растворители используются для осаждения белков?
11. С помощью каких методов можно удалить из белкового раствора низкомолекулярные соединения?
12. Как доказать, что при диализе белок остается в диализном мешочке, а низкомолекулярные вещества находятся в диализирующей жидкости?
13. Охарактеризовать методы, используемые для выделения субклеточных фракций.
14. Чем отличается химический состав сыворотки крови от плазмы?
15. Какие существуют способы выражения концентрации вещества в растворе?
16. Как определить максимум светопоглощения вещества в растворе?
17. Почему при обработке линейных графиков необходимо использовать метод наименьших квадратов?
18. Описать способ определения молярного коэффициента поглощения 2,4-динитрофенола?

ГЛАВА 2 УГЛЕВОДЫ

Углеводами называются вещества органической природы, основными компонентами которых являются альдегиды и кетоны многоатомных спиртов, а также полимеры этих соединений. Основными организмами, синтезирующими углеводы, являются растения, которые из CO_2 и H_2O вырабатывают их в процессе фотосинтеза. В составе углеводов присутствуют атомы углерода, водорода и кислорода, но некоторые из них содержат атомы азота, фосфора и серы. Многие сельскохозяйственные растения способны накапливать углеводы в корнях, клубнях, семенах, плодах и ягодах, используются затем в качестве запасных веществ. Углеводы входят в состав клеточных стенок растений, а продукты распада углеводов используются в процессах синтеза других соединений. Содержание углеводов может составлять до 90% сухого вещества растительных организмов. В живых организмах углеводы служат основными источниками энергии, окисляясь в различных метаболических процессах, они обеспечивают основные энергетические потребности растительного организма. Входя в состав белков (гликопротеиды) и липидов (гликолипиды), углеводы участвуют в формировании упорядоченных структур мембран клеток, а также выполняют защитную и регуляторную (рецепторы мембран клеток) функции в организме. Моносахариды (рибоза и дезоксирибоза) являются компонентами нуклеиновых кислот (РНК и ДНК), которые служат основными информационными молекулами живых организмов. Гликопротеиды, на поверхности белковой глобулы которых имеются моносахариды, обладают высокой термоустойчивостью, а также с помощью углеводов белки защищены от разрушительного действия свободных радикалов. Поверхностные углеводы способны обеспечивать фиксацию белков в структурах клеточных

мембран. Некоторые углеводсодержащие соединения являются рецепторами для связывания различных токсинов, бактериальных клеток, вирусов, гормонов, метаболитов. Кроме того, полисахарид (целлюлоза, клетчатка), присутствующие в составе кормов животных, повышают моторику кишечника, способствуют перемещению пищевого комка по желудочно-кишечному тракту. Окисление глюкозы и фруктозы в метаболических процессах обеспечивает энергетические потребности живых организмов. Превращение моносахаридов осуществляется в нескольких метаболических процессах, среди которых наибольшую значимость имеют анаэробный процесс окисления моносахаридов, пентозофосфатный путь превращения углеводов, а также процессы синтеза и распада крахмала и гликогена, резервируемых в различных органах и тканях растений и животных. Промежуточными продуктами превращения глюкозы в метаболических процессах могут быть фосфорилированные производные моносахаридов (глюкозо-6-фосфат, глюкозо-1-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, фосфоглицериновый альдегид, фосфодиоксиацетон, 3-фосфоглицерат, 1,3-дифосфоглицерат и др.). Продуктами окисления глюкозы могут быть альдегиды, кетоны и карбоновые кислоты.

Углеводы условно делят на три группы: моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Моносахариды. К группе моносахаридов относят многоатомные спирты, имеющие в составе альдегидную ($R-CHO$) или кетонную группу ($R-C(=O)$), которые подразделяются соответственно на альдозы и кетозы. Большинство моносахаридов имеют эмпирическую формулу $(CH_2O)_n$, где n равно или больше трех. В зависимости от количества в структуре углеродных атомов они делятся на триозы (C_3), тетрозы (C_4), пентозы (C_5), гексозы (C_6) и т. д. Альдозы, в составе которых 4–7 атомов углерода, имеют 2–5 хиральных атомов углерода и поэтому могут быть представлены в виде нескольких оптически активных стереоизомеров. Количество стереоизомеров можно рассчитать по формуле 2^n (n — число хиральных атомов углерода). Все моносахариды существуют в виде двух энантиомерных форм (D - и L -формы). В живых организмах встречаются как D -формы, так и L -формы моносахаридов.

Олигосахариды. К олигосахаридам относят углеводы, в составе которых два и более моносахарида, обычно не более десяти. Основными представителями олигосахаридов в живых организмах являются *дисахариды* (мальтоза, сахароза, целлобиоза, лактоза и др.), в составе которых два моносахарида, связанных между собой за счет гликозидной связи. Последняя образуется в результате взаимодействия гидроксильной группы одного из моносахаридов с аномерным атомом углерода второго моносахарида. Гликозидные связи могут гидролизироваться при участии кислот или ферментов гликозидаз (амилазы, целлюлазы, декстраназы, хитиназы и др.).

В составе мальтозы присутствуют два остатка *D*-глюкозы, соединенных между собой α -1 \rightarrow 4-гликозидной связью, образуется при гидролизе крахмала при участии β -амилазы. Высокое содержание фермента отмечается в проросшем зерне. Высушенное проросшее зерно называется солодом.

Мальтоза хорошо сбраживается дрожжами. Целлобиоза содержит также два остатка *D*-глюкозы, но соединенных уже β -1 \rightarrow 4-гликозидной связью.

Целлобиоза является основной структурной единицей клетчатки (целлюлозы). В свободном виде в растениях встречается редко. Образуется в основном в рубце жвачных животных при участии ферментов целлюлазного комплекса.

В составе молекулы сахарозы содержатся остатки двух гексоз — *D*-глюкоза и *D*-фруктоза. Служит компонентом пищевого сахара. Сахароза широко распространена в растительном мире, особенно много ее содержится в плодах, ягодах и корнеплодах. Так, в сахарной свекле содержание сахарозы составляет 14–20%, а в соке стеблей сахарного тростника ее содержание доходит до 11–15%. Эти растения используются для промышленного получения пищевого сахара. Для расщепления сахарозы используется сахараза (инвертаза), которая локализуется в эпителиальных клетках тонкого кишечника жвачных животных. *D*-фруктоза почти в 2,5 раза слаще, чем глюкоза. Используя методы колоночной хроматографии, во многих странах организовано промышленное производство фруктозы, которое основано на использовании

глюкозоизомеразы. Фермент иммобилизуется на нерастворимом носителе, катализирует обратимую реакцию изомеризации. Полученный продукт (*D*-фруктоза) может быть использован в пищевой промышленности, при производстве безалкогольных напитков и мороженого.

Лактоза является основным углеводом молока, но дисахарид обнаружен и в пыльцевых трубках некоторых растений. В составе лактозы молекулы α -*D*-глюкозы и β -*D*-галактозы связаны между собой β -1,4-гликозидной связью. Лактоза активно вырабатывается в молочной железе млекопитающих. В коровьем молоке содержится 4–5,5% лактозы.

Полисахариды. К группе полисахаридов относятся различные по строению высокомолекулярные соединения, образованные за счет поликонденсации моносахаридных остатков, связанных между собой гликозидными связями и формирующих линейные или разветвленные цепи. Полисахариды входят в состав тканей растений и животных. Между собой полисахариды различаются строением и свойствами входящих в их состав моносахаридов. Полисахариды различаются по молекулярной массе и функциональным действием. При этом даже однородные полисахариды имеют различия в размерах, способны формировать подвижные и устойчивые комплексы с белками, проявляя при этом сложное функциональное действие.

Полисахариды растений можно условно разделить на гомополисахариды, гетерополисахариды и гликолипиды.

К группе гомополисахаридов относят полимеры, в составе которых одинаковые по типу моносахариды, тогда как в состав гетерополисахаридов входят разные по типу моносахариды. Гликолипиды характеризуются как разнообразием остатков моносахаридов, так и липидов.

К группе гомополисахаридов растений относятся крахмал, инулин, целлюлоза (клетчатка), а животных — гликоген.

В растениях крахмал присутствует в виде крахмальных зерен, различающихся по химическому составу и свойствам. В основном крахмал накапливается в семенах пшеницы, овса, гречихи, риса, кукурузы, а также в клубнях картофеля. Крахмал гетерогенен по составу полисахаридов,

которые различаются по физико-химическим свойствам и представлены двумя типами: амилоза и амилопектин. Большинство разновидностей крахмала содержат 15–25% амилозы и 75–85% амилопектина. Содержание амилозы и амилопектина в растениях может меняться в зависимости от условий выращивания и в процессе вегетации. В составе амилозы остатки α -D-глюкопираноз связаны между собой α -1 \rightarrow 4 гликозидными связями в линейную полимерную цепь. Линейные молекулы амилозы имеют спиральную конформацию, при этом каждый виток спирали состоит из шести остатков α -D-глюкозы. Амилоза легко растворяется в теплой воде, образуя слегка вязкий раствор. Молекулярная масса амилозы равна $3 \cdot 10^5$ – 10^6 Да. Амилопектин при растворении в горячей воде образует вязкий коллоидный раствор. Остатки D-глюкозы связаны в линейные структуры не только за счет формирования α -1,4-гликозидных связей, но в точках ветвления образуются и α -1,6-связи.

Инулин содержится в клубнях земляной груши и георгина, в корнях одуванчика, цикория, артишоков. Полимерная цепочка инулина формируется из остатков D-фруктозы, которые связаны между собой 2 \rightarrow 1-связями через метиленовую ($-\text{CH}_2-$) группу. Полифруктозид может содержать в небольших количествах остатки глюкопираноз и способен легко гидролизоваться под действием разбавленных кислот. Гидролизуется при участии инулазы в клетках растений до фруктозы.

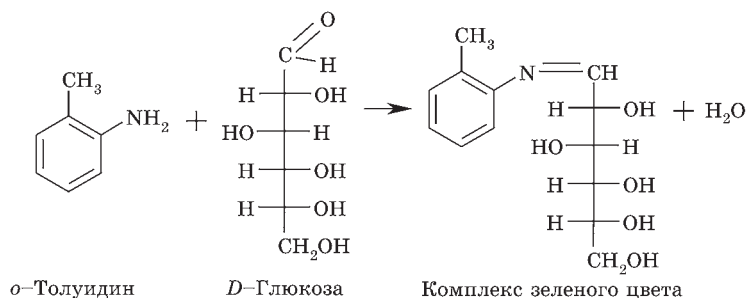
Целлюлоза (клетчатка) является основным компонентом клеточных стенок растений. Полимерная цепочка целлюлозы формируется из последовательно связанных за счет гликозидных β -1 \rightarrow 4-связей остатков β -D-глюкопираноз. Молекулярная масса целлюлозы из разных растений сильно варьируется и в максимуме может достигать $\sim 2 \cdot 10^6$ Да. По данным рентгеноструктурного анализа, молекулы клетчатки имеют нитевидную форму, образующую структуры в виде фибрилл, в составе которых 40–60 молекул. Прочность структуры обеспечивается за счет водородных связей, в образовании которых участвуют атомы водорода гидроксильных групп клетчатки, а также адсорбированные клетчаткой молекулы воды. Расщепление целлюлозы в желудочно-

кишечном тракте травоядных животных происходит при участии ферментов целлюлаз, вырабатываемых преимущественно микроорганизмами рубца. В организме других млекопитающих целлюлоза не расщепляется и в основном выполняет функцию стимулятора моторики кишечника.

Основным представителем гетерополисахаридов растений является гемицеллюлоза. Полисахарид входит в состав клеточных стенок растений, резервируясь в качестве питательного запасного вещества. В щелочной среде гемицеллюлоза легко гидролизруется под действием кислот. В гидролизате определяются: глюкоза, галактоза, фруктоза, манноза, арабиноза и ксилоза. Гемицеллюлоза составляет основу стеблей злаковых и кормовых растений, входит в состав оболочек семян и зерновок, кукурузных початков, содержится в отрубях.

2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ О-ТОЛУИДИНОВЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Глюкоза при нагревании с *о*-толуидином в присутствии уксусной кислоты дает специфический комплекс, окрашенный в зеленый цвет, интенсивность которого пропорциональна концентрации глюкозы.



Оборудование: фотоэлектроколориметр; центрифуга; водяная баня.

Посуда: пипетки на 0,1 мл — 2 шт., 5 мл — 1 шт.; пробирки — 7 шт.; колбы мерные на 100 мл — 2 шт.

Материалы и реактивы: супернатант зерновок пшеницы; *о*-толуидин, очищенный путем перегонки (реактив должен иметь слегка желтоватую окраску; хранят его в холодильнике в посуде из темного стекла без доступа воздуха); ледяная уксусная кислота, х. ч.; 3%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; тиомочевина; бензойная кислота; глюкоза.

Приготовление растворов. *о*-Толуидиновый реактив. 0,15 г тиомочевины растворяют в 94 мл ледяной уксусной кислоты и после перемешивания к раствору добавляют 6 мл 8%-ного бесцветного или слегка желтоватого *о*-толуидина. Реактив стоек. Хранится в холодильнике.

Стандартный раствор глюкозы (СРГ). В мерной колбе емкостью 100 мл растворяют 500 мг глюкозы в 0,2%-ном водном растворе бензойной кислоты, высушенной до постоянного веса при 100°C.

Калибровочные растворы глюкозы готовят путем разбавления стандартного раствора глюкозы. Для этого в 5 пробирок последовательно вносят по 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 мл стандартного раствора глюкозы. Затем в первые четыре пробирки добавляют по 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 мл дистиллированной воды. Общий объем в пробирках равен 0,5 мл. После разбавления концентрация глюкозы в пробирках будет равна 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 5,0 мг/мл соответственно. Контролем служит шестая пробирка, куда вносят только 0,5 мл дистиллированной воды. Данные представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1

Данные к построению калибровочного графика для определения глюкозы в супернатанте зерновок пшеницы

№ пробирок	Объем СРГ, мл	Объем д. в., мл	Конечная концентрация глюкозы С, мг/мл	Светопоглощение D, усл. ед.
1	0,1	0,4	1,0	
2	0,2	0,3	2,0	
3	0,3	0,2	3,0	
4	0,4	0,1	4,0	
5	0,5	—	5,0	
6 (контроль)	—	0,5	—	

Затем после перемешивания во все пробирки добавляют по 4,5 мл *о*-толуидинового реактива. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 8 мин. Вода должна непрерывно кипеть. Следует точно соблюдать время выдерживания пробирки в водяной бане. Затем пробирки вынимают и сразу охлаждают под водопроводной водой до комнатной температуры. Светопоглощение раствора измеряют на ФЭКе при 630 нм (красный светофильтр) в кювете шириной 1 см против контроля.

Холостая проба содержит 0,5 мл ТХУ и 4,5 мл *о*-толуидинового реактива.

Опытная проба. В пробирку наливают 0,9 мл 3% -ной ТХУ и 0,01 мл супернатанта зерновок пшеницы. После перемешивания пробирку центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. К 0,5 мл супернатанта (надосадочная жидкость) добавляют 4,5 мл *о*-толуидинового реактива. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 8 мин. После охлаждения колориметрируют на ФЭКе при 670 нм (красный светофильтр) в кювете 1 см против холостой пробы (0,5 мл ТХУ и 4,5 мл *о*-толуидинового реактива).

Метод расчета. Для расчета содержания глюкозы (мг/мл) в исследуемой ткани используют формулу

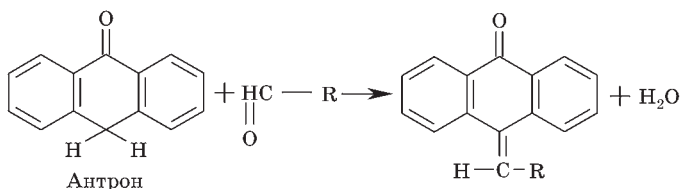
$$C_{\text{опыт}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}}}{D_{\text{ст}}} \quad (\text{мг/мл}),$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытной пробы; $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение калибровочного раствора глюкозы; $C_{\text{ст}}$ — концентрация глюкозы в калибровочном растворе, мг/мл.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта, построить калибровочный график (D , C) и определить концентрацию глюкозы в исследуемом образце.

2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ С ПОМОЩЬЮ АНТРОНА

Принцип метода. Глюкоза при нагревании в растворе с концентрированной H_2SO_4 образует с антроном окрашенное соединение, имеющее максимум поглощения при 620 нм.



Светопоглощение комплекса пропорционально концентрации глюкозы в пределах 10–100 мкг в пробе.

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; центрифуга; аналитические весы; водяная баня.

Посуда: колбы на 100 мл — 2 шт.; пипетки на 1 мл — 3 шт., на 5 мл — 1 шт.; цилиндр на 100 мл.

Материалы и реактивы: супернатант или плазма крови; 0,2%-ный раствор антрона; 1,1 мМ раствор глюкозы; 95%-ный раствор H_2SO_4 ($\rho = 1,834$); бензойная кислота.

Приготовление растворов. Раствор антрона готовят, растворяя 0,2 г навески в 54,5 мл 95%-ного раствора H_2SO_4 . Раствор готовят перед определением и хранят при 0°C.

Стандартный раствор глюкозы (0,2 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в. При длительном хранении в раствор стандартный глюкозы добавляют бензойную кислоту (2 мг/мл).

Ход работы. В три пробирки (проба, стандарт, контроль) последовательно вносят реактивы согласно прописи, приведенной в таблице 2.2.

Таблица 2.2

Реактивы и порядок их внесения в аналитические пробирки

№ п/п	Реактивы	Пробирки		
		проба	стандарт	контроль
1	Супернатант или плазма крови	0,5	—	—
2	Стандартный раствор глюкозы	—	0,5	—
3	Вода дистиллированная	—	—	0,5
4	Раствор антрона	4,5	4,5	4,5
	Светопоглощение D , усл. ед.			

Растворы перемешивают и после этого пробирки помещают в водяную баню при 90°C. Через 10 мин пробирки

охлаждают в бане с ледяной водой и измеряют светопоглощение растворов пробы и стандарта против контроля при 620 нм.

Метод расчета. Содержание глюкозы (мг/мл и мг/г массы) в исследуемой пробе определяют по следующим формулам:

$$C_{\text{опыт}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}}}{D_{\text{ст}}}, \text{ мг/мл}; \quad C_{\text{опыт}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}} \cdot V}{D_{\text{ст}} \cdot P}, \text{ мг/г},$$

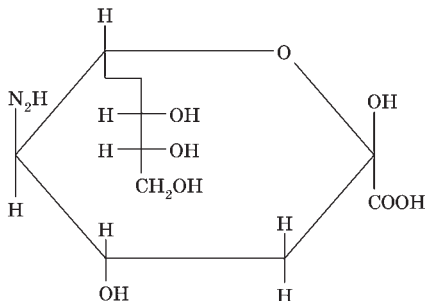
где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытной пробы; $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение калибровочного раствора глюкозы; $C_{\text{ст}}$ — концентрация глюкозы в калибровочном растворе, мг/мл; V — объем супернатанта, мл; P — масса навески, г.

Кроме того, содержание глюкозы в пробе можно определить и по калибровочному графику, для построения которого готовят несколько стандартных растворов глюкозы.

Оформление работы. Записать результаты исследований и определить содержание глюкозы в исследуемом образце.

2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ ПО РЕАКЦИИ С РЕЗОРЦИНОМ

Принцип метода. Сиаловые кислоты являются полифункциональными соединениями с сильными кислотными свойствами. Основным представителем сиаловых кислот является *N*-ацетилнейраминовая кислота.



5-Ацетамид-3,5-дидезокси-*D*-глицеро-*D*-галактононулозоновая кислота

В свободном виде сиаловые кислоты в живых организмах практически не встречаются, так как входят в состав различных углеводсодержащих соединений, таких как гликопротеиды, гликолипиды (ганглиозиды), олигосахариды. Занимая в молекулах этих веществ концевое положение, они оказывают значительное влияние на их физико-химические свойства и биологическую активность. Так, например, наличие сиаловой кислоты в составе белков крови и некоторых гормонов определяет длительность циркуляции этих соединений в кровотоке, так как после отщепления сиаловой кислоты они теряют биологическую активность. Длительность циркуляции в кровотоке эритроцитов и лимфоцитов также зависит от наличия сиаловой кислоты на поверхности их плазмалеммы, а процесс старения клеток крови обусловлен прежде всего уменьшением в их составе сиаловых кислот. Кроме того, сиаловые кислоты могут быть компонентами клеточных рецепторов, специфичных для вирусов гриппа.

Определение сиаловых кислот в данном методе основано на том, что в кислой среде происходит гидролиз гликопротеинов с отщеплением нейраминовой кислоты, которая вступает в реакцию с раствором резорцина с образованием хромагена синего цвета.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; водяная баня; центрифуга.

Посуда: колбы на 100 мл — 5 шт.; пипетки на 2,0 мл — 6 шт.; на 5 мл — 1 шт.; пробирки.

Реактивы: резорциновый реактив; концентрированная HCl; 0,1 М раствор CuSO_4 ; бутилацетат и бутиловый спирт или изоамиловый спирт; 5% -ный раствор ТХУ; 1,6 мМ раствор N-ацетилнейраминовой кислоты.

Приготовление рабочих растворов. Резорциновый реактив готовят за 4 ч до исследований в мерной колбе на 100 мл, последовательно внося 200 мг резорцина, 10 мл воды, 80 мл концентрированной HCl (плотность $1,19 \text{ г/см}^3$) и 0,25 мл 0,1 М раствора CuSO_4 . После перемешивания объем доводят до метки дистиллированной водой. Хранить раствор можно при $+4^\circ\text{C}$ в течение месяца; раствор CuSO_4 (15,96 мг/мл) готовят, растворяя навеску в дистиллированной воде.

Реактив для экстракции окрашенного продукта готовят, смешивая 85 мл бутилацетата с 15 мл бутилового спирта (можно использовать изоамиловый спирт).

5% -ный раствор ТХУ готовят, растворяя 5 г навески в 95 мл дистиллированной воды.

Стандартный раствор N-ацетилнейраминовой кислоты (2 мг/мл) готовят, растворяя навеску в дистиллированной воде.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 2,0 мл гомогената и 2,0 мл 5% -ного ТХУ. После перемешивания пробу помещают на кипящую водяную баню на 10 мин. После охлаждения пробирку центрифугируют 15 мин при $7 \cdot 10^3 g$. Супернатант осторожно сливают, отбирают в чистую пробирку 2,0 мл раствора, содержащего сиаловые кислоты, и прибавляют 2,0 мл резорцинового реактива. После перемешивания пробу ставят на 15 мин в кипящую водяную баню. При наличии в растворе N-ацетилнейраминовой кислоты появляется интенсивное красно-вишневая окраска. После охлаждения окрашенный комплекс экстрагируют добавляя в пробу 5,0 мл реактива для экстракции. Затем пробу встряхивают и оставляют стоять на 15 мин для расслоения фаз. Верхний окрашенный слой осторожно отбирают в пробирку или кювету.

Для проведения измерений необходимо подготовить контрольную и стандартную пробу, которые готовят как опытную пробу, но вместо супернатанта в контрольную пробу вносят 2,0 мл дистиллированной воды, а в стандартную пробу 2,0 мл стандартного раствора N-ацетилнейраминовой кислоты. Остальные действия производят как с опытной пробой.

Светопоглощение опытной ($D_{оп}$) и стандартной ($D_{ст}$) проб измеряют при 580 нм, против контрольной пробы.

Метод расчета. Содержание сиаловых кислот в опытной пробе определяют по формуле

$$C_{опыт} = \frac{D_{оп} \cdot C_{ст}}{D_{ст}}.$$

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации нейраминовой кислоты в исследуемой пробе.

2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПО МЕТОДУ ГЕССА

Принцип метода. Нейраминовая кислота является компонентом тканей и биологических жидкостей животных. Определяют нейраминовую кислоту в безбелковом гомогенате, который получают путем гидролиза и осаждения белков. При этом из состава гликопротеинов выделяются сиаловые кислоты, которые при нагревании с раствором кислот дают цветную реакцию, окрашивая раствор в красно-фиолетовый цвет.

Оборудование: ФЭК; центрифуга; аналитические весы; водяная баня; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пробирки на 1 мл — 5 шт.; пробирки — 7 шт.; центрифужные пробирки — 2 шт.

Материалы и реактивы: гомогенат ткани животных, 10% -ный раствор ТХУ; 100% -ная уксусная кислота; концентрированная серная кислота; стандартный раствор N-ацетилнейраминовой кислоты (100 мг%).

Приготовление растворов. Раствор кислот готовят путем смешивания 100% -ной уксусной кислоты с концентрированной серной кислотой в соотношении 95:5 (к 95 частям 100% -ной уксусной кислоты приливают 5 частей концентрированной серной кислоты).

Стандартный раствор N-ацетилнейраминовой кислоты (1,0 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика в 6 пробирок последовательно вносят растворы, как показано в таблице 2.3.

После перемешивания растворов в каждую пробирку добавляют по 5 мл раствора кислот, а затем пробирки помещают в кипящую водяную баню на 30 мин. После охлаждения растворов определяют их светопоглощение на ФЭКе при 500–560 нм против раствора кислот.

Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая полученные данные в координатах (D , C).

Ход работы. В центрифужную пробирку наливают 1 мл гомогената и при осторожном встряхивании добавляют

**Данные к построению калибровочной кривой
для определения сиаловых кислот**

№ пробирки	Стандартный раствор, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация N-ацетилнейраминовой кислоты C, мг/мл	Светопоглощение D, усл. ед.
1	0,10	0,30	0,250	
2	0,15	0,25	0,375	
3	0,20	0,20	0,500	
4	0,25	0,15	0,625	
5	0,30	0,10	0,750	
6	0,40	—	1,000	

1 мл 10% -ной ТХУ. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 5 мин. После этого пробирку охлаждают и центрифугируют 15 мин при 7000g. Надосадочную жидкость осторожно сливают в отдельную пробирку и из нее в опытную пробирку отбирают 0,4 мл супернатанта. Для проявления сиаловых кислот в опытную пробирку добавляют 5 мл раствора кислот, а затем пробирку помещают в кипящую водяную баню на 30 мин. После охлаждения раствора определяют светопоглощение пробы на ФЭКе при 500–560 нм против раствора кислот.

Метод расчета. Содержание сиаловых кислот (мг/г влажной ткани) определяют по следующей формуле:

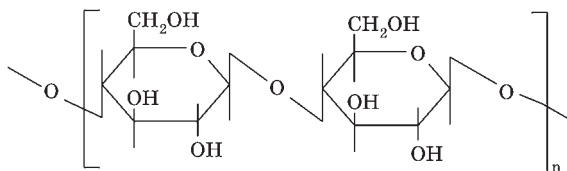
$$C_{\text{опыт}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot D_{\text{оп}} \cdot V_1 \cdot V_2}{D_{\text{ст}} \cdot P \cdot V_3},$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытной пробы, усл. ед.; $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение стандартной пробы, усл. ед.; $C_{\text{ст}}$ — концентрация сиаловых кислот, определенная по калибровочному графику, мг/мл; V_1 — объем гомогената, мл; V_2 — общий объем в пробирке, мл; V_3 — объем вносимой пробы в пробирку, мл; P — навеска ткани, г.

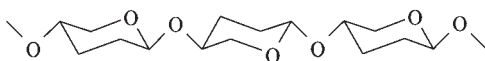
Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации нейраминовой кислоты в исследуемой пробе.

2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ (КЛЕТЧАТКИ) (ПО КЮРШНЕРУ И ГАНЕКУ)

Принцип метода. Целлюлоза (клетчатка) относится к полисахаридам, служащим основным компонентом клеточных стенок растений. Полимерная цепочка целлюлозы формируется из последовательно связанных за счет гликозидных β -1 \rightarrow 4-связей остатков β -D-глюкопираноз.



Участок полисахаридной цепи целлюлозы



Структура молекулы целлюлозы

Молекулярная масса целлюлозы из разных растений сильно варьируется и в максимуме может достигать $\sim 2 \cdot 10^6$ Да.

При определении содержания клетчатки в растительных тканях материал обрабатывается смесью концентрированных кислот (HNO_3 и CH_3COOH), взятых соответственно в соотношении 1:10. При этом в инкубируемой среде происходит растворение липидов, гидролиз белков и нуклеиновых кислот, окисление и нитрование органических соединений, разрушение пигментов. Однако структура клетчатки сохраняется полностью.

Оборудование: водяная баня; ножницы; аналитические весы; сушильный шкаф.

Посуда: коническая колба на 100 мл; стеклянный бюкс; обратный холодильник; стеклянный тарированный тигель Гуча с пористым дном или в воронка с пористой перегородкой.

Материалы и реактивы: побеги проростков пшеницы; 70% -ная азотная кислота ($\rho = 1,4150$); 80% -ная уксусная

кислота ($\rho = 1,070$); 96% -ный этиловый спирт ($\rho = 0,8014$); хлороформ; горячая д. в., фильтровальная бумага.

Приготовление растворов. Смесь кислот (HNO_3 и CH_3COOH) готовят, смешивая кислоты в соотношении 1:10 (к 1 части 70% -ной HNO_3 добавляют 10 частей 80% -ной CH_3COOH).

Ход работы. Навеску растительной ткани (1 г) измельчают на кусочки размером в 3–4 мм, которые помещают в коническую колбу на 100 мл. Кроме того, в стеклянный бюкс помещают навеску (5 г) растительного материала для определения влажности.

Затем в коническую колбу наливают 25 мл смеси кислот, колбу помещают в кипящую водяную баню и соединяют с обратным холодильником. Гидролиз сопутствующих целлюлозе соединений проводят в течение 1,0–1,5 ч (для бобовых — 1,5–2,0 ч). Завершают процесс гидролиза при условии исчезновения зеленой окраски растительного материала. Затем целлюлозу в колбе промывают 3–4 раза горячей д. в. (по 50 мл). После этого целлюлозу количественно смывают д. в. в стеклянный тарированный тигель Гуча с пористым дном или в воронку с пористой перегородкой для фильтрования, на дно которых кладут кружок фильтровальной бумаги. Осадок на фильтре тщательно промывают горячей д. в., а затем 96% -ным этиловым спиртом и хлороформом. По окончании промывания целлюлозу высушивают в сушильном шкафу при 105°C до постоянной массы и затем взвешивают на аналитических весах.

Метод расчета. Содержание целлюлозы (A , %) в растительной ткани вычисляют по формуле

$$A = \frac{m_1 \cdot 100}{m_0},$$

где m_1 — масса целлюлозы после высушивания, г; m_0 — масса исходной навески растительного материала, г.

Для перерасчета на абсолютно сухое вещество (A_0) вычисленное содержание целлюлозы (A) умножают на показатель влажности растительного материала. Расчет производится по следующей формуле:

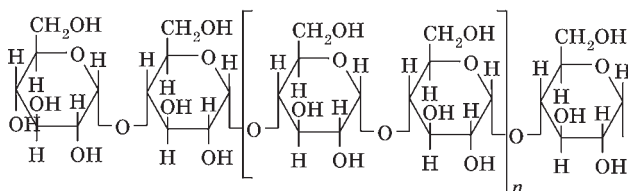
$$A_0 = \frac{A \cdot 100}{100 - B},$$

где B — процент влажности анализируемого вещества.

Оформление работы. Записать результаты опыта, определить процент целлюлозы в анализируемой растительной ткани.

2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ

Принцип метода. Крахмал является биополимером и в основном состоит из двух полисахаридов: амилозы и амилопектина. Амилаза относится к линейным полисахаридам, имеющим молекулярную массу 300–1000 кДа. Амилопектин представлен разветвленной полисахаридной цепочкой, молекулярная масса которого может достигать несколько сотен дальтон. Большинство разновидностей крахмала содержат 15–25% амилозы и 75–85% амилопектина. Содержание амилозы и амилопектина в растениях может меняться в зависимости от условий выращивания и в процессе вегетации. В составе амилозы остатки α -D-глюкопираноз связаны между собой α -1 \rightarrow 4 гликозидными связями в линейную полимерную цепь.

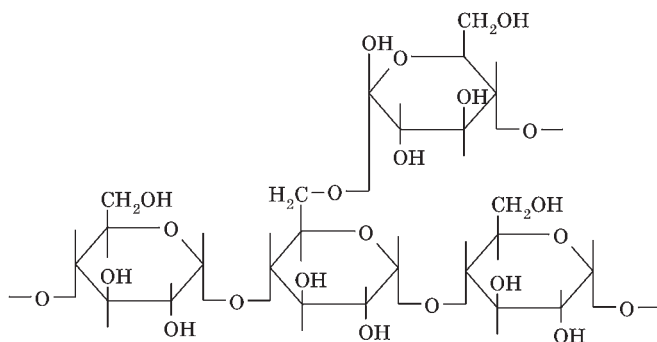


Фрагмент структуры амилозы

Линейные молекулы амилозы имеют спиральную конформацию, при этом каждый виток спирали состоит из шести остатков α -D-глюкозы. Амилоза легко растворяется в теплой воде, образуя слегка вязкий раствор.

Амилопектин при растворении в горячей воде образует вязкий коллоидный раствор. Остатки D-глюкозы связаны в линейные структуры не только за счет формирования

α -1,4-гликозидных связей, но в точках ветвления образуются и α -1,6-связи.



Фрагмент структуры амилопектина

В клубнях картофеля может содержаться крахмала от 8,0 до 29,4%, в плодах томатов — 0,1–0,2%, в капустном листе — 0,4–0,5%, листьях салата, петрушки, укропа до 1–2%. В зерновках злаковых культур содержание крахмала может сильно зависеть от условий выращивания культур и от их сорта. Так, в зерновках пшеницы содержание крахмала может составлять 49–73%, ржи — 55–73, ячменя — 45–68, овса — 34–64, кукурузы — 61–83, проса — 51–70, риса — 50–70%.

Для определения крахмала в гомогенате растительных тканей используются растворы йода или йодистого калия, окрашивающие крахмал в сине-фиолетовый цвет. При этом амилоза дает с йодом синее окрашивание, а амилопектин — красно-фиолетовое.

Оборудование: гомогенизатор; водяная баня; штатив.

Посуда: круглодонная колба на 250 мл с обратным холодильником, пипетка на 0,2 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: зерновки пшеницы; плоды и корнеплоды; 0,3%-ный раствор йода; 96%-ный этиловый спирт, 10%-ный раствор крахмала.

Приготовление растворов. Раствор йода (3 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 96%-ном этиловом спирте. Раствор крахмала (100 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в. при нагревании.

Ход работы. 10 г растительной ткани помещают в сосуд, приливают 10 мл д. в. и измельчают в течение 5 мин до однородной массы. Полученный гомогенат переливают в колбу на 250 мл. Затем колбу помещают в кипящую водяную баню и кипятят 5 мин с обратным холодильником. После охлаждения из колбы отбирают 5 мл гомогената в пробирку и приливают 0,2 мл 0,3% -ного раствора йода.

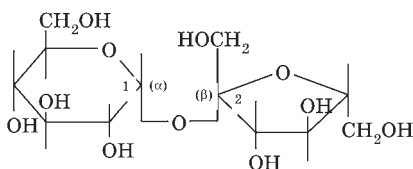
Окраска раствора может меняться в зависимости от концентрации крахмала, приобретая цвет от светло-синего (~1% -ный раствор) до темно-синего (~3,5% -ный раствор).

Для определения содержания крахмала в исследуемом гомогенате необходимо построить калибровочную шкалу, используя набор стандартных растворов крахмала от 1 до 7%, с интервалом в 0,5%.

Оформление работы. Записать результаты исследования, построить калибровочную шкалу, определить процентное содержание крахмала в исследуемых тканях и сравнить их с литературными.

2.7. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА САХАРОЗЫ ИЗ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Принцип метода. В составе молекулы сахарозы содержатся остатки двух гексоз — α -D-глюкоза и β -D-фруктоза.



Сахароза

Служит компонентом пищевого сахара. Сахароза широко распространена в растительном мире, особенно ее много в плодах, ягодах и корнеплодах. Так, в сахарной свекле содержание сахарозы составляет 14–20%, а в соке стеблей сахарного тростника ее содержание доходит до 11–15%. Эти растения используются для промышленного получения пищевого сахара.

Сахарную свеклу измельчают и гомогенизируют до однородной массы. Для извлечения сахарозы используют оксид кальция, смесь пропускают через марлю. Кальций осаждают, пропуская через фильтрат углекислый газ. В осадок выпадает карбонат кальция, который удаляют на воронке Бюхнера. Сатурацию с последующим фильтрованием повторяют 2–3 раза. Раствор сахарозы упаривают на роторном испарителе и охлаждают при 0°C. Кристаллы сахарозы промывают д. в.

Оборудование: гомогенизатор; вакуумный насос; криотермостат; роторный испаритель.

Посуда: колбы на 1 л — 1 шт.; стакан химический на 1 л — 2 шт.; воронка Бюхнера.

Материалы и реактивы: марля; сахарная свекла; окись кальция; активированный уголь; фильтровальная бумага.

Приготовление растворов. Известковое молоко готовят, растворяя 15 г СаО в 500 мл д. в.

Ход работы. 400 г сахарной свеклы промывают, измельчают на терке в стружку и растирают в фарфоровой ступке или на гомогенизаторе до однородной массы.

В литровую колбу последовательно вносят 500 мл известкового молока и гомогенат сахарной свеклы. Колбу закрывают пробкой и оставляют на 2–3 ч, периодически перемешивая ее содержимое. На этой стадии извлекается сахароза и идет дефекация сахарного раствора.

Затем смесь пропускают через несколько слоев марли в стакан, куда сильно отжимают остаток. Добавляют 300 мл холодной д. в. и переносят в колбу на 1 л, которую энергично встряхивают. После этого смесь вновь пропускают через несколько слоев марли в стакан, куда сильно отжимают остаток. Затем добавляют 200 мл холодной д. в. После третьей обработки водой в выжимках остается не более 0,5% сахарозы.

Через объединенную смесь пропускают в течение 30 мин углекислый газ. При этом выпадает в осадок карбонат кальция, который удаляют на воронке Бюхнера. Сатурацию с последующим фильтрованием повторяют 2–3 раза. Прозрачный, но чуть желтоватый раствор обесцвечивают фильтрованием через слой активированного угля на маленькой

воронке Бюхнера. Осветленный раствор сахарозы упаривают на ротаторном испарителе и охлаждают при 0°C. Для иницирования кристаллизации к смеси добавляют несколько кристаллов сахарозы. При медленном охлаждении выпадают крупные таблички моноклинных кристаллов сахарозы. Маточник осторожно сливают, кристаллы просушивают между листами фильтровальной бумаги. Для полноты очистки сахарозу перекристаллизовывают из небольшого объема воды, при необходимости упаривая раствор. Выход около 30 г.

Оформление работы. Записать методику выделения и очистки сахарозы из сахарной свеклы и определить выход продукта.

2.8. ВЫДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА ИЗ ЗЕРНОВОК ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

Принцип метода. В растениях крахмал присутствует в виде крахмальных зерен, различающихся по химическому составу и свойствам. В основном крахмал накапливается в семенах пшеницы, овса, гречихи, риса, кукурузы, а также в клубнях картофеля. Крахмал нерастворим в холодной воде и других полярных растворителях, которые обычно используются для его выделения.

Оборудование: центрифуга; механическая мельница с размером сита 1 мм; аналитические весы; сушильный шкаф.

Посуда: колбы на 500 мл — 5 шт.; химический стакан на 500 мл.

Материалы и реактивы: зерновки пшеницы; 5%-ный раствор K_2SO_4 ; 0,06%-ный раствор NaOH; 96%-ный этиловый спирт.

Приготовление растворов. Раствор сульфата калия готовят, растворяя 25 г навески в 475 мл в д. в. Раствор NaOH готовят, растворяя 60 мг навески в д. в. в колбе на 100 мл.

Ход работы. Зерновки пшеницы (20 г) измельчают на механической мельнице с размером сита 1 мм. Полученный порошок растворяют в д. в. в соотношении 1:3 (на 1 г массы зерновок 3 мл д. в.). Гомогенат центрифугируют 15 мин при

5000g. Затем осадок отмывают 5% -ным раствором сульфата калия в соотношении 1:5. Смесь центрифугируют в течение 15 мин при 5000g. Процедуру повторяют 3 раза, а затем осадок промывают д. в. 2 раза. После этого осадок заливают 0,06% -ным раствором NaOH в соотношении 1:5, перемешивают 15–20 мин и центрифугируют 10 мин при 3000g. После удаления надосадочной жидкости с осадка осторожно снимают верхний кремовый или желтый слой, в котором присутствуют белки и другие соединения. Осадок промывают несколько раз д. в. и в конце 96% -ным этиловым спиртом. Сушат крахмал на чистом стекле. Высушенный крахмал взвешивают и определяют его содержание, как описано выше. Кроме этого, определяют еще и влажность клубней картофеля.

Метод расчета. Рассчитать выход крахмала (A , %) можно по следующей формуле:

$$A = \frac{m_2 \cdot 100}{m_1},$$

где m_1 — масса сухой навески, г; m_2 — масса крахмала, г.

Оформление работы. Записать все этапы выделения крахмала из зерновок пшеницы, составить схему опыта и рассчитать процент выхода крахмала.

2.9. ВЫДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА ИЗ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

Принцип метода. Картофель широко используется как пищевая, кормовая и техническая культура. Клубни картофеля содержат много биогенных соединений, среди которых особую ценность имеет крахмал. Полисахарид может накапливаться в клубнях до 68% от их сухой массы. Поэтому переработка клубней картофеля позволяет получать из них крахмал в промышленных масштабах. Для выделения крахмала используются солевые и спиртовые растворы.

Оборудование: гомогенизатор; аналитические весы; сушильный шкаф.

Посуда: колбы на 500 мл — 2 шт.; химический стакан на 500 мл.

Материалы и реактивы: клубни картофеля; 10% -ный раствор NaCl; 96% -ный этиловый спирт.

Приготовление растворов. Раствор NaCl готовят, растворяя 50 г навески в 450 мл д. в.

Ход работы. У клубней картофеля вначале удаляют поверхностную кожуру, а затем их измельчают и растирают до гомогенной массы на гомогенизаторе. Гомогенат переносят в химический стакан и добавляют д. в. Многократно промывают оседающий на дно осадок, постоянно сливая надосадочный слой жидкости. Для удаления белков к осадку добавляют 10% -ный раствор NaCl. Смесь перемешивают в течение 2 ч, а затем надосадочную жидкость сливают и осадок несколько раз промывают д. в. В конце осадок промывают 96% -ным этиловым спиртом и после этого крахмал сушат на стекле. Высушенный крахмал взвешивают и определяют его содержание, как описано выше.

Метод расчета. Рассчитать выход крахмала (A , %) можно по следующей формуле:

$$A = \frac{m_2 \cdot 100}{m_1},$$

где m_1 — масса сухой навески, г; m_2 — масса крахмала, г.

Оформление работы. Записать все этапы выделения крахмала из клубней картофеля, составить схему опыта и рассчитать процент выхода крахмала.

2.10. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА ИЗ ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ

Принцип метода. В организме животных гликоген присутствует в двух формах: прочно и слабо связанных с белками. Для выделения прочно связанной формы гликогена используется 30% -ный раствор КОН, который при нагревании разрушает ткани и гидролизует белки. При этом присутствующий в растворе гликоген осаждают с помощью этилового спирта. Кроме того, гликоген можно извлекать из животных тканей используя 3- или 5% -ный раствор трихлоруксусной кислоты, но при этом не удастся полностью извлечь гликоген, связанный с белками.

Гликоген резервируется в клетках печени и мышцах животных, где его содержание соответственно составляет 4,0–5,0 и 0,3–4,0%.

Оборудование: центрифуга; аналитические весы; водяная баня; холодильник; вакуум-эксикатор; фарфоровая ступка; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетки на 0,2 мл — 1 шт., на 2 мл — 1 шт., на 5 мл — 2 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: печень и мышцы животных; 30% -ного раствора КОН; 10% -ного раствора Na_2SO_4 ; 96% -ный этиловый спирт; хлористый кальций.

Приготовление растворов. Растворы КОН и Na_2SO_4 готовят, растворяя навески в д. в.

Ход работы. 1,0 г печени и 1,0 г мышц, взятые отдельно, растирают в двух фарфоровых ступках. Затем гомогенаты помещают в пробирки с 2 мл 30% -ного раствора КОН. Пробирки нагревают 60 мин на кипящей водяной бане, постоянно перемешивая их содержимое. По завершении гидролиза пробирки охлаждают, а затем в каждую добавляют по 0,2 мл 10% -ного раствора Na_2SO_4 и 5 мл 96% -ного этилового спирта. После этого растворы перемешивают и охлаждают в течение 2 ч. Затем пробирки центрифугируют 30 мин при 7000g. Надосадочную жидкость отбрасывают, а осадки в пробирках растворяют в 3 мл д. в. После перемешивания в пробирки добавляют 96% -ный этиловый спирт в соотношении 1:2 (на 1 объем смеси добавляют 2 объема 96% -ного этанола). Снова содержимое пробирок перемешивают и помещают на 60 мин в холодильник при 0°C. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием, растворяют в д. в. и переосаждают 96% -ным этанолом. После третьего переосаждения гликогена надосадочную жидкость удаляют, а осадок высушивают в вакуум-эксикаторе над свежепрокаленным хлористым кальцием и взвешивают на аналитических весах.

Метод расчета. Содержание гликогена (А, %) определяют по следующей формуле:

$$A, \% = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100,$$

где m_0 — масса ткани, г; m_1 — масса гликогена, г.

Оформление работы. Записать результаты исследований. Определить содержание гликогена в печени и мышцах животных и сравнить эти величины между собой.

2.11. ГИДРОЛИЗ ГЛИКОГЕНА

Принцип метода. Гликоген представляет собой полисахарид с разветвленной структурой, состоящей из последовательно связанных между собой в линейные структуры остатков *D*-глюкопиранозы за счет α -1,4-гликозидных связей, а также в точках ветвления — α -1,6-связей. У гликогена одна связь α -1,6-типа приходится на 8–12 остатков *D*-глюкопиранозы. Молекулярная масса гликогена может достигать до 10^8 Да. При кислотном гидролизе выявляются в основном α -*D*-глюкоза, α -мальтоза и α -изомальтоза.

Оборудование: водяная баня.

Посуда: колбы на 100 мл — 2 шт.; пипетки на 5 мл — 2 шт.

Материалы и реактивы: гликоген; концентрированная HCl; NaOH.

Приготовление растворов. 2,5% -ный раствор HCl готовят, разбавляя конц-HCl в д. в.; 10% -ный раствор NaOH готовят, растворяя навеску (10 г) в 90 мл д. в.

Ход работы. К осадку гликогена, полученного в предыдущем опыте, добавляют 3–4 мл 2,5% -ного раствора HCl и кипятят на водяной бане 15–20 мин. Раствор нейтрализуют 10% -ным раствором NaOH. После этого определяют содержание глюкозы.

Оформление работы. Определить содержание глюкозы в гидролизате, оценить полноту гидролиза гликогена в присутствии соляной кислоты.

2.12. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Принцип метода. Вторичные продукты сельского хозяйства (солома и плодовые оболочки злаков), основу которых составляет целлюлоза, гидролизуются мультиферментным комплексом. Ферменты целлюлазного комплекса

катализируют реакции гидролитического расщепления целлюлозы и ее производных до глюкозы. В состав мультиферментного комплекса входят четыре типа карбогидраз: 1,4- β -*D*-глюкан-4-глюканогидролаза, 1,4- β -*D*-глюкан-4-целлобиогидролаза, 1,4- β -*D*-глюкан-4-глюкогидролаза и β -*D*-глюкозидглюкогидролаза.

Реакция ферментативного гидролиза целлюлозы состоит из нескольких стадий: диффузии молекул ферментов к поверхности нерастворимого в воде субстрата, специфической сорбции ферментов и образования фермент-субстратного комплекса, реакции гидролиза и диффузии продуктов реакции в раствор. Лимитирующей стадией процесса гидролиза является диффузия реагентов и отвод продуктов реакции. Скорость реакции может быть увеличена с помощью механической активации твердого целлюлозного субстрата в мельницах или специальных активаторах, в результате которой происходит измельчение, аморфизация и разупорядочение целлюлозных материалов, или ускорением массопереноса путем механического воздействия на реагенты во время протекания химической реакции. В результате измельчения целлюлозных материалов происходит увеличение удельной поверхности субстрата и разупорядочение его структуры, а следовательно, увеличение площади поверхности субстрата, доступного для молекул фермента. Поэтому мультиферментный целлюлазный комплекс при 55°C и pH 5,5, способен расщепить измельченные части соломы и плодовые оболочки злаков до глюкозы.

Оборудование: ФЭК; термостат; мельница; мешалка; штатив.

Посуда: колбы на 500 мл — 4 шт.; пипетки на 1 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: солома и плодовые оболочки злаков; ферментативный комплекс «Целлозим ультра» с целлюлазной активностью 520 ед./г; 0,2 М Na-ацетатный буфер, pH 5,5; ледяная уксусная кислота; ацетат натрия.

Приготовление растворов. Субстрат целлюлозы (солома и плодовые оболочки злаков) измельчают на механической мельнице до размера 0,1–0,2 мм.

Раствор буфера готовят, смешивая 0,2 М растворы CH_3COOH и CH_3COONa на pH-метре до pH 5,5.

Ход работы. В колбу на 500 мл помещают 150 мл 0,2 М На-ацетатный буфер, pH 5,5 и 0,15 г ферментативного препарата (3% от массы субстрата). После перемешивания добавляем 5 г измельченного субстрата. Гидролиз проводят при 55°C в течение 72 ч при постоянном перемешивании реакционной смеси со скоростью 200 об/мин. Через каждые 8 ч отбираем пробу суспензии по 0,5 мл для определения концентрации глюкозы. Концентрацию глюкозы определяем по цветной реакции с *o*-толуидином. Данные записываем в таблицу 2.4.

Таблица 2.4

Содержание глюкозы в инкубируемой среде от продолжительности ферментативного гидролиза

№ пробы	Время гидролиза, ч	Светопоглощение <i>D</i> , усл. ед.	Концентрация глюкозы, мг/мл
1	0		
2	8		
3	16		
4	24		
5	32		
6	40		
7	48		
8	56		
9	64		
10	72		

Контролем служит эксперимент, в котором вместо раствора ферментного препарата добавляют соответствующее количество буферного раствора (табл. 2.5).

Оформление работы. Записать методику гидролиза. Построить график зависимости концентрации глюкозы от продолжительности гидролиза в отсутствие и в присутствии ферментов. Составить общую схему ферментативного гидролиза целлюлозы.

Содержание глюкозы в контрольной инкубируемой среде

№ пробы	Время гидролиза, ч	Светопоглощение D , усл. ед.	Концентрация глюкозы, мг/мл
1	0		
2	8		
3	16		
4	24		
5	32		
6	40		
7	48		
8	56		
9	64		
10	72		

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие биогенные молекулы называются углеводами?
2. С помощью каких реактивов можно осадить белки гомогенизированной ткани и сыворотки крови?
3. Написать уравнение химической реакции, которая используется при определении глюкозы *o*-толуидиновым методом.
4. Написать уравнение химической реакции, которая используется при определении глюкозы с помощью антрона.
5. Раскрыть значение сиаловых кислот для проявления функциональной активности гормонов.
6. Нарисовать фрагмент полимерной цепочки целлюлозы и раскрыть ее биологическую роль.
7. Нарисовать фрагменты структур амилозы и амилопектина, указать различия в их строении.
8. Перечислить названия растений с высоким содержанием крахмала.
9. В каких частях растений больше всего накапливается крахмал?
10. Назвать растения, которые используются для промышленного получения пищевого сахара.
11. Нарисовать технологическую схему получения сахарозы из сахарной свеклы.
12. Нарисовать схему опыта выделения крахмала из зерновок пшеницы.

13. Нарисовать схему опыта выделения крахмала из клубней картофеля.

14. В каких органах и тканях животных накапливается гликоген?

15. Описать процесс гидролиза гликогена.

16. Рассказать о ферментативном гидролизе целлюлозы.

Липиды — это гетерогенная группа органических веществ нерастворимых или плохо растворимых в полярных растворителях, но хорошо растворимых в неполярных растворителях. Липиды являются в основном составными частями мембранных структур клеток и их органелл (митохондрий, ядер, эндоплазматического ретикулума, лизосом и др.), а также участвуют в энергетических процессах, обеспечивая синтез АТФ. Кроме того, липиды регулируют протекание метаболических процессов в клетках, управляют экспрессией генов. Входя в состав углеводов и белков, липиды участвуют в определении локализации их в структуре мембран и обеспечивают их функциональную активность. В составе нуклеиновых кислот липиды выполняют защитную функцию.

Различают следующие группы липидов: жирные кислоты, ацилглицеролы, фосфолипиды, воска, стероиды, терпены. Кроме того, липиды входят в состав белков (липопротеиды) и углеводов (гликолипиды), формируя сложные функционально активные соединения.

К группе высших жирных кислот относятся к разновидности карбоновых кислот, в составе которых карбоксильная группа и гидрофобный радикал, представленный насыщенными или ненасыщенными углеводородами ($R-\text{COOH}$). Карбоновые кислоты являются продуктами реакций окисления спиртов и альдегидов, отличаясь от альдегидов тем, что имеют более сильную поляризацию двойной связи за счет оттягивания электронной плотности от атома кислорода ОН-группы, проявляемое в ослаблении энергии связи в гидроксиле ($\text{O} \leftarrow \text{H}$), способствующая легкому отщеплению атома водорода в виде протона (H^+). Карбоновые кислоты,

в отличие от спиртов и альдегидов, имеют более высокие температуры плавления и кипения. Все карбоновые кислоты проявляют кислую реакцию и в водном растворе способны диссоциировать в малой степени, являясь слабыми кислотами. Карбоновые кислоты образуют более прочные водородные связи, чем спирты. Кроме того, карбоновые кислоты легко образуют соли (CH_3COONa , CH_3COOK , $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ и др.). Реагируя со спиртами, карбоновые кислоты образуют сложные эфиры. Для большинства одноосновных карбоновых кислот $\text{pK}_a \approx 3,7-4,8$, что объясняется отсутствием электродонорного эффекта алкильных групп. Карбоновые кислоты с числом атомов углерода от 1 до 4 смешиваются с водой во всех отношениях и называются летучими жирными кислотами из-за низкой температуры кипения. Кислоты, в молекуле которых содержится от 5 до 10 и более атомов углерода, представляют собой маслянистые жидкости, со слабой растворимостью в воде — высшие жирные кислоты. Среди карбоновых кислот муравьиная, уксусная и пропионовая имеют резкий специфический запах, кислоты среднего ряда обладают неприятным запахом. Высшие жирные кислоты запаха не имеют. Карбоновые кислоты в живых организмах могут образовываться в результате реакций последовательного превращения спиртов (метанол, этанол, пропанол, бутанол и др.) и альдегидов (формальдегида, ацетальдегида и др.). Основные представители карбоновых кислот в биогенных системах образуются в реакциях анаэробного и аэробного окисления углеводов (уксусная, пропионовая и масляная кислоты). Среди карбоновых кислот встречаются соединения, содержащие кето-группы (пировиноградная, щавелевоуксусная, α -кетоглутаровая кислоты). Кроме того, карбоновые кислоты образуются в результате протекания реакций дезаминирования аминокислот, а также в реакциях трансаминирования. Среди них встречаются соединения, относящиеся к высшим жирным кислотам, которые входят в состав мембран клеток, образуют мицеллярные структуры. Высшие жирные кислоты можно условно разделить на две группы: насыщенные и ненасыщенные (в составе углеводородного радикала одна, две и более двойных связей). Общая формула насыщенных жирных кислот $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$.

Насыщенные жирные кислоты живых организмов, как правило, содержат четное число углеродных атомов. Ненасыщенные жирные кислоты имеют в своем составе одну или несколько двойных связей. Двойные связи жирных кислот в основном находятся в *цис*-конформации, обуславливая формирования изгибов алифатической цепи. Цис-изомеры высших жирных кислот имеют более низкую температуру плавления и активно метаболизируются. При комнатной температуре насыщенные жирные кислоты с 12 и более углеродными атомами находятся в твердом состоянии, а ненасыщенные жирные кислоты в виде жидкости. Среди насыщенных жирных кислот в растениях более всего преобладают лауриновая, пальмитиновая и стеариновая, а среди ненасыщенных — олеиновая и линолевая. Содержание олеиновой и линолевой в сумме составляет более 60% всех жирных кислот растений. Причем среди жирных кислот линолевая и линоленовая кислоты не синтезируются в организме млекопитающих и должны поступать с растительной пищей. Поэтому эти кислоты называют незаменимыми жирными кислотами для животных.

В клетках живых организмов протекают аэробные метаболические процессы, в результате которых образуются свободные радикалы и перекисные соединения органической и неорганической природы. Так, генерация супероксидного радикала в животных и растительных тканях может происходить в результате активности НАДФН-цитохром-*b5*-редуктазы, митохондриальной НАДН-дегидрогеназы, ксантиноксидазы и пероксидазы. Процесс начинается стадией инициирования, причем в роли инициаторов в основном выступают супероксидный (O_2^-) или гидроксильный радикалы ($OH\cdot$). 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 ($R\cdot$) далее взаимодействуют с кислородом, образуя перекисные радикалы ($RO_2\cdot$), а те в свою очередь вступают в реакцию с новой молекулой жирной кислоты с образованием $R\cdot$ и накоплением

гидроперекисей липидов ($ROOH$). Процесс подавляется антиоксидантами, которые способны реагировать со свободными радикалами, образуя малоактивные радикалы, не способные вступать в реакцию с новыми молекулами ненасыщенных жирных кислот.

К ацилглицеролам (глицеридам) относятся сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот. Последние могут быть представлены остатками насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Среди жирных кислот наиболее часто встречаются в составе ацилглицеролов пальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты. Трехатомный спирт глицерин может быть соединен сложноэфирной связью с одной, двумя и тремя молекулами жирных кислот, образуя моно-, ди- и триацилглицеролы. Ацилглицеролы различаются природой остатков жирных кислот, которые определяют их физические и химические свойства.

К группе фосфолипидов относятся сложные эфиры многоатомного спирта глицерина или сфингозина с высшими жирными кислотами, в составе которых еще имеется остаток фосфорной кислоты и полярная группа. Фосфолипиды содержатся во всех растительных клетках, являясь компонентами клеточных мембран. Больше всего фосфолипидов определяется в семенах масличных и бобовых растений. Если фосфолипид содержит остаток глицерина, то он называется глицерофосфолипидом, а если остаток сфингозина — то сфингофосфолипидом. В живых организмах определяется высокое содержание таких фосфолипидов, как фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и фосфатидилглицерины.

Соединения, в составе которых остатки высших спиртов и высших жирных кислот связаны между собой сложноэфирной связью, называются воска. Кислоты и спирты в составе воска содержат четное число атомов углерода (от 16 до 22). Воска обнаружены у животных, растений и микроорганизмов. В основном выполняют защитную функцию. Так, у животных воска входят в состав секретов желез, которые используются для смазывания кожи, шерсти и перьев. Растения покрывают восками листья, стебли, плоды, семена, защищая таким образом покровы от поражения вредителей

и потери влаги. В состав воска могут входить высокомолекулярные спирты: цетиловый ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}-\text{OH}$), мирициловый ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{30}-\text{OH}$), *n*-гексакозанол ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{25}-\text{OH}$) и др. На поверхности листьев некоторых тропических пальм слой воска может достигать 2–5 мм. В составе воска могут содержаться не только сложные эфиры, но и другие химические компоненты (свободные жирные кислоты, высокомолекулярные спирты, углеводороды парафинового ряда и др.). Воска, покрывающие поверхность листьев, плодов и овощей, выполняют преимущественно защитную функцию.

Стероиды — это группа функционально активных соединений, основным компонентом которых является пергидрофенантренциклопентан. К стероидам относятся следующие соединения: сердечные гликозиды, алкалоиды, регуляторы роста. Стероиды вследствие плохой растворимости в полярной среде переносятся по организму с помощью специализированных белков-переносчиков. После распознавания клетки-мишени стероид проникает внутрь клетки и в составе рецепторного комплекса переносится в ядро клетки, где связывается с промоторным участком ДНК и оказывает стимулирующее действие на процесс транскрипции. При этом увеличивается количество мРНК, которые стимулируют процесс трансляции различных функциональных белков.

Соединения, в составе которых присутствует остаток изопрена, называются терпенами. В зависимости от числа изопреновых структур в составе соединения терпены подразделяются на следующие группы: гемитерпены (C_5), монотерпены (C_{10}), сесквитерпены (C_{15}), дитерпены (C_{20}), сестертерпены (C_{25}), тритерпены (C_{30}), тетратерпены (C_{40}) и политерпены (C_{50} и более). Они являются компонентами эфирных масел, которые образуются в особых органах растений: в железистых волосках, чешуйках и др. В основном это органические вещества, нерастворимые в воде, придающие растениям специфический аромат, поэтому они используются в пищевой, фармацевтической, химической и парфюмерной промышленности. Эфирные масла семян котиандра и тмина используются в качестве ароматических приправ в хлебопекарной промышленности.

3.1. РАСТВОРИМОСТЬ ЛИПИДОВ

Принцип метода. Липиды относятся к группе органических веществ, нерастворимых или плохо растворимых в полярных растворителях, но хорошо растворимых в неполярных растворителях. Показателем полярности среды является величина диэлектрической постоянной.

В данной работе используются два полярных (вода и этанол) и два неполярных (хлороформ и бензол) растворителя, диэлектрические постоянные которых соответственно равны 78,5, 24,3, 4,7 и 2,28.

Оборудование: штатив.

Посуда: пипетки на 1,0 мл — 1 шт., на 2,0 мл — 4 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: растительное масло; 96% -ный этиловый спирт; бензол; хлороформ; д. в.

Ход работы. В четыре пробирки вносят по 0,5 мл подсолнечного масла. В первую пробирку добавляют 2,0 мл д. в., во вторую — 2,0 мл 96% -ного этанола, в третью — 2,0 мл бензола, в четвертую — 2,0 мл хлороформа. Содержимое всех пробирок перемешивают, интенсивно встряхивая. Через 5 мин отмечают наблюдаемые в пробирках изменения. Результаты записывают в таблицу 3.1.

Таблица 3.1

Объемы растворителей, используемых
для растворения компонентов подсолнечного масла

№ пробирки	Объем масла, мл	Объем растворителя, мл				Наблюдаемые изменения	Растворимость
		вода	этанол	бензол	хлороформ		
1	0,5	2,0	—	—	—		
2	0,5	—	2,0	—	—		
3	0,5	—	—	2,0	—		
4	0,5	—	—	—	2,0		

Оформление работы. Записать результаты опыта и сравнить растворимость липидов подсолнечного масла в различных растворителях. Объяснить наблюдаемые эффекты.

3.2. ЭКСТРАКЦИЯ ЛИПИДОВ ИЗ СУБКЛЕТОЧНЫХ ЧАСТИЦ

Принцип метода. Для экстракции липидов используется смесь неполярного растворителя и полярного спирта. Наиболее оптимальной является смесь хлороформа и метанола.

Оборудование: центрифуга, роторный испаритель, шейкер.

Посуда: пробирка с притертой пробкой; пипетка на 5 мл — 1 шт.; центрифужные пробирки; фильтр Шотта.

Материалы и реактивы: микросомальная фракция колеоптилей; метанол; хлороформ.

Ход работы. В пробирку с притертой пробкой помещают 5 мл суспензии микросомальных фракций колеоптилей кукурузы, полученных после очистки и обогащения в градиенте плотности сахарозы, с концентрацией белка 1–1,5 мг. Прибавляют 18,75 мл смеси хлороформ — метанол в соотношении 1:2 по объему. Смесь выдерживают 1–2 ч, периодически встряхивая. Затем смесь центрифугируют 10 мин при 1000g, верхнюю фазу отсасывают пипеткой, а нижнюю 2–3 раза промывают в смеси хлороформ — метанол — вода (47:48:3 по объему), каждый раз центрифугируя и отбрасывая верхнюю фазу. Нижнюю хлороформную фазу пропускают через фильтр Шотта и выпаривают с помощью роторного испарителя при температуре 40°C. После этого проводят количественный анализ липидов.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и написать структурные формулы жирных кислот, нейтральных липидов, фосфолипидов и стероидов растений.

3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩИХ ЛИПИДОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Принцип метода. Ненасыщенные липиды и жирные кислоты, фосфолипиды и холестерин после гидролиза серной кислотой взаимодействуют с фосфорнованилиновым реактивом с образованием соединения, окрашенного в красный цвет.

Оборудование: ФЭК, водяная баня.

Посуда: пипетки 0,1 мл — 2 шт.; 0,2 мл — 3 шт. и 5 мл — 2 шт.; пробирки — 6 шт.; колба мерная на 100 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: супернатант проростков пшеницы; 0,6% -водный раствор ванилина; 11,5 М ортофосфорная кислота (концентрированная); эталонный раствор общих липидов (8 г/л); серная кислота концентрированная; хлороформ марки х. ч. или «для наркоза».

Приготовление растворов. *Фосфорнованилиновую смесь* готовят, растворяя 0,6 г ванилина в небольшом количестве дистиллированной воды при нагревании на водяной бане; после охлаждения объем доводят до 100 мл дистиллированной водой. Затем добавляют 400 мл концентрированной ортофосфорной кислоты. После перемешивания смесь хранят в посуде из темного стекла при комнатной температуре.

Эталонный раствор. Готовят, растворяя общие липиды в хлороформе (8 мг/мл). Хранят его в холодильнике, в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

Ход работы. Определение общих липидов проводят следующим образом. В 3 пробирки вносят ингредиенты в соответствии с таблицей 3.2.

Таблица 3.2

Порядок внесения растворов в аналитические пробирки

Реактивы	Пробирки		
	опытная проба	эталонная проба	раствор сравнения
Супернатант, мл	0,05	—	—
Эталонный раствор глюкозы, мл	—	0,05	—
Серная кислота (конц.), мл	1,5	1,5	1,5
Светопоглощение			

После перемешивания растворов пробирки нагревают в течение 15 мин на кипящей водяной бане. Затем пробирки охлаждают и из каждой отбирают в другие сухие пробирки по 0,2 мл гидролизата и по 3,0 мл фосфорнованилиновой смеси. После перемешивания пробирки оставляют на 45–50 мин при комнатной температуре для протекания

реакции. После чего вновь перемешивают и измеряют светопоглощение опытной ($D_{\text{оп}}$) и эталонной ($D_{\text{эт}}$) проб против раствора сравнения в кювете шириной 0,5 см при 530 нм (зеленый светофильтр). Измерение должно быть проведено не позднее чем через 60 мин после добавления фосфорновалиновой смеси.

Метод расчета. Содержание липидов (мг/мл) в исследуемой жидкости или ткани определяют по формуле

$$C_{\text{опыт}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}}}{D_{\text{ст}}},$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытной пробы; $D_{\text{эт}}$ — светопоглощение эталонной пробы; $C_{\text{ст}}$ — концентрация липидов в эталонной пробе, мг/мл.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации липидов в проростках пшеницы.

3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА (МЕТОД ИЛЬКА)

Принцип метода. Холестерин в присутствии уксусного ангидрида, уксусной и серной кислот придает раствору зеленую окраску с максимумом светопоглощения при 630–690 нм.

Оборудование: ФЭК; центрифуга; аналитические весы; шейкер.

Посуда: колбы на 100 мл — 1 шт.; пипетки на 5 мл — 1 шт.; цилиндр, пробирки (сухие).

Материалы и реактивы: сыворотка крови или супернатант ткани; ледяная уксусная кислота; концентрированная серная кислота; уксусный ангидрид; 100%-ный этиловый спирт; хлороформ.

Приготовление растворов. Рабочий раствор (РР) готовят путем смешивания уксусной кислоты, уксусного ангидрида и H_2SO_4 в соотношении 1:5:1. При этом серная кислота добавляется в раствор последней очень осторожно небольшими порциями. Смесь при приготовлении должна охлаждаться и после приготовления быть прозрачной и бесцветной.

Стандартный раствор холестерина (1,8 мг/мл) готовят, растворяя вначале навеску в 2–5 мл хлороформа, а затем доводят объем до метки абсолютным этиловым спиртом.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используют 5 пробирок, в которые последовательно вносят определенные объемы стандартного раствора холестерина и рабочего раствора, как показано в таблице 3.3.

После перемешивания пробирки помещают на 20 мин в термостат при 37°C. Затем сразу измеряют светопоглощение раствора на ФЭКе при 650–690 нм. Данные записывают в таблицу 3.3. Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая полученные данные в координатах (D , C).

Таблица 3.3

Данные к построению калибровочного графика для определения холестерина

№ пробирки	Стандартный раствор холестерина, мл	Рабочий раствор (РР), мл	Количество холестерина в пробе, мг	Концентрация холестерина C , мг/мл	Светопоглощение D , усл. ед.
1	0,05	2,15	0,09	0,9	
2	0,10	2,10	0,18	1,8	
3	0,15	2,05	0,27	2,7	
4	0,20	2,00	0,36	3,6	
5	0,25	1,95	0,45	4,5	

Ход работы. В пробирку вносят 2,1 мл рабочего раствора, к которому очень осторожно по стенке приливают 0,1 мл сыворотки крови или супернатанта. После перемешивания пробирку помещают в термостат на 20 мин при 37°C. Затем сразу измеряют светопоглощение раствора на ФЭКе при 650–690 нм. В качестве контроля используют рабочий раствор.

Метод расчета. Концентрацию холестерина (мг/мл) в опытной пробе ($C_{\text{опыт}}$) определяют по калибровочному графику или по формуле

$$C_{\text{опыт}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}}}{D_{\text{ст}}},$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытной пробы; $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение стандартного раствора холестерина; $C_{\text{ст}}$ — концентрация холестерина в стандартном растворе, мг/мл.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации холестерина в исследуемой пробе.

3.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ β -ЛИПОПРОТЕИДОВ ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ (ПО БУРШТЕЙНУ И САМАЙ)

Принцип метода. В присутствии CaCl_2 и гепарина нарушается коллоидная устойчивость белков, в связи с чем осаждаются почти чистые β -липопротеиды. Гепарин способен образовывать с β -липопротеидами комплекс, который под действием хлористого кальция выпадает в осадок. По степени помутнения раствора судят о концентрации β -липопротеидов в исследуемой жидкости или сыворотке крови.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; аналитические весы.

Посуда: пробирки — 4 шт.; пипетки на 0,1 мл, 9,2 мл — 1 шт., 5 мл — 1 шт.; колбы на 1 л — 1 шт.

Материалы и реактивы: хлорид кальция (CaCl_2) безводный; 5% -ный раствор гепарина (5000 единиц активности).

Приготовление рабочих растворов. 0,28% -ный (0,025 М) раствор хлорида кальция готовят, растворяя 2,8 г CaCl_2 в дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 1 л. Раствор можно приготовить из 10% -ного раствора CaCl_2 , разбавляя его дистиллированной водой (к 10 мл 10% -ного раствора CaCl_2 добавляют 347 мл воды). 1% -ный раствор гепарина готовят путем разбавления 5% -ного раствора гепарина дистиллированной водой.

Ход работы. В 4 пробирки набирают по 2 мл 0,28% -ного раствора CaCl_2 и 0,2 мл сыворотки. После перемешивания в 3 пробирки последовательно с интервалом в 30 с вносят 0,04 мл 1% -ного раствора гепарина. После повторного перемешивания ровно через 4 мин измеряют поглощение (D , усл. ед.) каждой пробы против контроля при красном

светофилтре (630 нм). Контролем служит пробирка, в которой 2,0 мл 0,28% -ного раствора CaCl_2 и 0,2 мл сыворотки.

Метод расчета. Содержание β -липопротеидов в сыворотке крови определяют по формуле

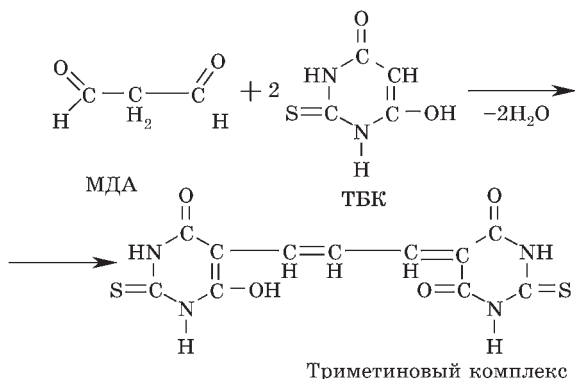
$$C_{\text{ЛП}} = D \cdot 100,$$

где 100 — эмпирический коэффициент.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и указать содержание β -липопротеидов в исследуемой сыворотке крови.

3.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Принцип метода. В основе метода лежит реакция между малоновым диальдегидом и тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре и кислом значении pH протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты. Максимум светопоглощения комплекса приходится на 532 нм ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).



Оборудование: фотоэлектроколориметр; центрифуга; водная баня, весы.

Посуда: колбы на 100 мл — 4 шт. и 50 мл — 1 шт.; пробирки со шлифами.

Материалы и реактивы. 100 мл 1% -ного раствора тритона X-100; 100 мл 0,6 М раствора HCl; 100 мл 0,06 М рабочего раствора ТБК; 50 мл 5 мМ раствора трилона Б; 100 мл 96% -ного этанола; 10 мл супернатанта проростков пшеницы.

Приготовление рабочих растворов. 1%-ный раствор тритона X-100 готовится путем растворения 1 мл концентрированного тритона X-100 в 99 мл 50% -ного этанола; 0,6 М раствор HCl готовят, добавляя к 5,1 мл 36% -ной HCl к 94,9 мл д. в.; 0,06 М рабочий раствор ТБК готовят, растворяя 864 мг тиобарбитуровой кислоты в 100 мл 1% -ного раствора тритона X-100 с 50% -ным этанолом; 5 мМ раствор трилона Б готовят, растворяя 84 мг навески в 50 мл д. в.; супернатант получают путем гомогенизирования 1 г сырой ткани проростков пшеницы в фарфоровой ступке с 3 мл 50% -ного этанола, а затем полученный гомогенат центрифугируют 10 мин при 7000g.

Ход определения. В пробирку с 0,5 мл супернатанта последовательно добавляют 0,5 мл 1% раствора тритона X-100, 0,2 мл 0,6 М раствора HCl и 0,8 мл 0,06 М рабочего раствора ТБК. Смесь нагревают в кипящей водяной бане в течение 10 мин. Охлаждение проводили при температуре 15°C в течение 30 мин. Для стабилизации окраски после охлаждения добавляют 0,2 мл 5 мМ раствора трилона Б и 5–10 мл 96% -ного этанола. Контролем служит пробирка, в которую добавляют все эти же растворы, кроме ТБК.

За накоплением продукта перекисного окисления липидов — малонового диальдегида — следили по реакции с тиобарбитуровой кислотой при 532 нм, $\epsilon = 155 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Метод расчета. Расчет ПОЛ (мкмоль/г) проводили по следующему уравнению:

$$\text{ПОЛ} = \frac{D \cdot V_1 \cdot V_3}{156 \cdot P \cdot V_2}, \text{ мкмоль/г,}$$

где D — светопоглощение образца, усл. ед.; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем гомогената ткани, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в пробирку,

мл; V_3 — конечный объем пробы в пробирке, мл; 156 — коэффициент микромолярного светопоглощения.

Оформление работы. Записать результаты исследований и раскрыть роль ПОЛ в процессах жизнедеятельности растений.

3.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Принцип метода. Для максимального извлечения флавоноидов из биологического материала используется раствор 96% -ного этанола с 1% -ным раствором тритона X-100, способного извлекать из мембранных структур нерастворимые в воде соединения. За счет формирования мицеллярных структур в тритоне X-100 могут растворяться гидрофобные соединения.

В основе реакции используется способность флавоноидов из растительных тканей реагировать с лимоннокислым борным реактивом, образуя окрашенный устойчивый комплекс с максимумом светопоглощения при 420 нм.

Оборудование: ФЭК; аналитические весы.

Посуда: колбы на 50 мл — 2 шт., 100 мл — 2 шт.; пипетки на 0,2 мл — 2 шт., 5 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы. 50 мл 20% -ного раствора лимонной кислоты; 50 мл 5% -ного раствора борной кислоты; 100 мл 96% -ного этанола с 1% -ным раствором тритона X-100; 100 мл 96% -ного этанола; 20 мл 0,1 мг/мл раствора рутина.

Приготовление рабочих растворов. Вначале готовят раствор 96% -ного этанола в 1% -ном растворе тритона X-100 (рабочий раствор 1 (РР1)); растворы 20% -ной лимонной кислоты и 5% -ной борной кислоты готовят путем растворения навески в рабочем растворе при нагревании на водяной бане; для построения калибровочного графика используют раствор рутина 0,1 мг/мл, который готовят, растворяя навеску на 96% -ном этаноле; непосредственно перед определением смешивали растворы борной и лимонной кислот для получения опытного раствора в соотношении

1:1 (50 мл раствора борной кислоты и 50 мл раствора лимонной кислоты — рабочий раствор 2 (РР2)); экстракцию флавоноидов проводят путем настаивания навески растительной ткани на рабочем растворе в соотношении 1 : 5 (на 1 г ткани 5 мл рабочего раствора) в течение 24 ч.

Построение калибровочного графика. Установить в штатив 12 пробирок. Первый ряд из 6 пробирок используется для проведения реакции рутина с лимоннокислым борным реактивом, в каждую из которых последовательно вносят разные объемы исходного 0,1 мг/мл раствора рутина и рабочего раствора 2, как показано в таблице 3.4.

Таблица 3.4

Объем и концентрация растворов, используемых для построения калибровочного графика для определения содержания флавоноидов

№ п/п	Калибровочные растворы		Контрольные пробы		Концентрация рутина в пробирке, мкг/мл	Светопоглощение D , усл. ед.
	объем рутина, мл	объем рабочего раствора 2, мл	объем рутина, мл	объем рабочего раствора 1, мл		
1	0,2	4,80	0,2	4,80	4,0	
2	0,4	4,60	0,4	4,60	8,0	
3	0,6	4,40	0,6	4,40	12,0	
4	0,8	4,20	0,8	4,20	16,0	
5	1,0	4,00	1,0	4,00	20,0	
6	1,2	3,80	1,2	3,80	24,0	

Второй ряд из 6 пробирок служит контролем, в которые последовательно приливают разные объемы исходного 0,1 мг/мл раствора рутина и рабочего раствора 1.

Измерения калибровочных растворов проводят против контрольных растворов. Светопоглощение растворов измеряют через 15 мин на ФЭКе при 420 нм. Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая величины в координатах (D , C).

Ход определения. В пробирку (опытная проба) последовательно вносят 0,6 мл супернатанта (объем вносимого образца можно изменять в пределах 0,05–0,6 мл в зависимости от содержания флавоноидов в исследуемой пробе),

а затем объем доводят до 3 мл опытным раствором. После перемешивания измерения проводят через 15 мин при 420 нм.

Контролем служат пробирки, в которые добавляют рабочий раствор 1 с супернатантом и рабочий раствор 2.

Метод расчета. Содержание флавоноидов в исследуемом образце вычисляют по формуле

$$C_{\text{фл}} = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{P \cdot V_2}, \text{ мг/г ткани,}$$

где C — концентрация флавоноидов, определенная по калибровочному графику, мг/мл; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем после экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в пробирку, мл; V_3 — конечный объем пробы в пробирке, мл.

Оформление работы. Определить содержание флавоноидов в исследуемой ткани, раскрыть их роль в жизнедеятельности растений.

3.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Принцип метода. В основе метода лежит реакция ненасыщенных жирных кислот с ионами железа (Fe^{2+}), которые активизируют процессы перекисного окисления липидов. Продуктом реакции является малоновый диальдегид, образование которого при добавлении природных антиоксидантов может замедляться. По степени понижения ПОЛ антиоксидантами, содержащимися в экстрактах растений, оценивают антиокислительную активность. Определение АОА проводят по реакции между малоновым диальдегидом и тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре и кислом значении рН протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты. Максимум светопоглощения комплекса приходится на 532 нм ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Оборудование: ФЭК; центрифуга; термостат; аналитические весы.

Посуда: колбы на 100 мл — 7 шт., 20 мл — 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 1 шт., 0,2 мл — 7 шт., 1 мл — 2 шт., 10 мл — 1 шт.; пробирки — 4 шт.

Материалы и реактивы. 100 мл рабочего раствора; 100 мл линетол или НЖК; 100 мл 1 мМ FeSO_4 ; 20 мл 1%-ного α -токоферола; 100 мл 0,6 М HCl ; 100 мл 0,06 М рабочего раствора ТБК; 100 мл 5 мМ ЭДТА; 100 мл раствора этанола с хлороформом в соотношении (7:3) (раствор состоял из 7,0 мл 96%-ного этанола и 3 мл хлороформа); 10 мл супернатанта растительной ткани.

Приготовление рабочих растворов. Линетол, препарат на продажу (вместо линетол можно использовать НЖК); *рабочий раствор* готовят, растворяя 1 мл концентрированного раствора тритона X-100 в 99 мл 50%-ного этанола; 0,6 М раствор HCl готовят, добавляя к 5,1 мл 36%-ной HCl к 94,9 мл д. в.; 0,06 М раствор ТБК готовят, растворяя 864 мг тиобарбитуровой кислоты в 100 мл рабочего раствора; 5 мМ раствор ЭДТА готовят, растворяя 84 мг навески в 50 мл д. в.; 1 мМ раствор FeSO_4 готовят, растворяя 15 мг навески в 100 мл д. в.; супернатант растительной ткани или животной ткани получают путем настаивания навески на рабочем растворе в течение 24 ч, а затем путем центрифугирования отделяют нерастворимые компоненты при 7000g в течение 15 мин.

Ход определения выполняют в два этапа.

I этап. Определение антиокислительной активности экстракта.

В опытную пробирку последовательно вносили 0,2 мл супернатанта, 0,04 мл линетол, 0,2 мл 1 мМ FeSO_4 и 0,36 мл рабочего раствора. После перемешивания смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин при постоянном покачивании. Реакцию останавливают добавлением 0,2 мл 1%-ного α -токоферола.

II этап. Определение продуктов ПОЛ.

В опытную пробирку прибавляли 0,2 мл 0,6 М HCl и 0,6 мл 0,06 М рабочего раствора ТБК, после перемешивания смесь инкубировали в кипящей водяной бане в течение 10 мин. Охлаждали до комнатной температуры. Для стабилизации окраски в смесь добавляли 0,2 мл 5 мМ ЭДТА. Перед спектрофотометрированием в смесь

вносили 10 мл раствора этанола с хлороформом в соотношении (7:3) (раствор состоял из 7,0 мл 96% -ного этанола и 3 мл хлороформа).

Контролями служат три пробирки, в которые добавляют в той же последовательности, как описано выше, за исключением: в первую — FeSO_4 , во вторую — супернатант, в третью — супернатант и FeSO_4 .

Измерения производят на 532 нм в следующей последовательности: вначале фотометрируют опытную пробу против первого контроля ($D_{\text{оп}}$); затем снимают светопоглощение второго контроля против третьего контроля ($D_{\text{па}}$).

Метод расчета. Определение антиокислительной активности проводят по формуле

$$\text{АОА} = \frac{D_{\text{оп}}}{D_{\text{па}}} \cdot 100, \%,$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение раствора с антиоксидантом; $D_{\text{па}}$ — светопоглощение раствора с прооксидантной активностью.

Оформление работы. Записать методику и определить значение антиокислительной активности в исследуемой ткани.

3.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

Принцип метода. Способ основан на способности хлорного железа (III) окислять антиоксиданты. При этом хлорное железо (III) восстанавливается до хлористого железа (II), количество которого определяется по интенсивности окраски при добавлении *o*-фенантролина.

Оборудование: ФЭК; центрифуга; весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы; колбы на 500 мл — 1 шт., 100 мл — 2 шт., 50 мл — 2 шт. и 100 мл — 1 шт.; пипетки на 0,2 мл — 3 шт., 1 мл — 1 шт., 5 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы. 500 мл 50%-ного этанола; 20 мл 25 мМ раствора *o*-фенантролина (4,95 мг/мл); 50 мл

12,3 мМ раствора FeCl_3 (2 мг/мл); 100 мл раствора дигидрокверцетина (вместо дигидрокверцетина можно использовать аскорбиновую кислоту) с концентрацией 0,2 мг/мл; 100 мл 0,4 М раствора HCl ; 10 мл супернатанта зерновок пшеницы или экстракта растений (экстракт растений перед исследованиями необходимо разбавлять в 100–200 раз).

Приготовление рабочих растворов. 25 мМ раствор о-фенантролина готовят, растворяя 99 мг навески в 20 мл 96% -ного этанола; 12,3 мМ раствор FeCl_3 (безводный) готовят, растворяя 100 мг навески в 50 мл 50% -ного этанола; раствор дигидрокверцетина (вместо дигидрокверцетина можно использовать аскорбиновую кислоту) готовят, растворяя 20 мг навески в 100 мл 50% -ного этанола; 0,4 М раствор HCl готовят, растворяя 3,4 мл 11,73 М раствора HCl в 96,6 мл д. в.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используют два ряда пробирок по 5 шт. в каждом. Первый ряд используется для разбавления исходного раствора дигидрокверцетина с исходной концентрацией 200 мкг/мл, как показано в таблице 3.5.

Таблица 3.5

Приготовление растворов дигидрокверцетина для построения калибровочного графика

Пробирки	Исходный раствор дигидрокверцетина, мл	Раствор 50%-ного этанола, мл	Концентрация дигидрокверцетина в пробирке, мкг/мл	Светопоглощение D , усл. ед.
1	0,5	2,0	2	
2	1,0	1,5	4	
3	1,5	1,0	6	
4	2,0	0,5	8	
5	2,5	—	10	
6	Контроль	3,0	—	

Второй ряд пробирок служит для проведения качественной реакции. После проведения разбавления из каждой пробирки первого ряда отбирают по 0,2 мл калибровочного раствора и вносят последовательно в расположенные напротив пробирки второго ряда. Затем во все пробирки второго ряда последовательно добавляют по 0,2 мл 25 мМ

раствора *о*-фенантролина, 2,4 мл 96% -ного этанола и по каплям приливают 0,2 мл 12,3 мМ раствора FeCl_3 . После перемешивания пробирки второго ряда выдерживают в темноте 10 мин (время проведения реакции). Реакцию останавливают добавлением 1 мл 0,4 М раствора HCl .

Контролем служит пробирка в которую добавляют по 0,2 мл 25 мМ раствора *о*-фенантролина, 2,6 мл 96% -ного этанола, 0,2 мл 12,3 мМ раствора FeCl_3 и 1 мл 0,4 М раствора HCl .

Измерение светопоглощения проводят при 505 нм, записывая показания в таблицу. Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая в координатах (D , C) изменения светопоглощения (ось ординат) от концентрации дигидрокверцетина (ось абсцисс).

Ход определения. В опытную пробирку последовательно вносили 0,2 мл экстракта (объем вносимого образца можно изменять в пределах 0,05–0,5 мл в зависимости от содержания антиоксидантов в исследуемой пробе), 0,2 мл 25 мМ раствора *о*-фенантролина и по каплям приливают 0,2 мл 12,3 мМ раствора FeCl_3 . Затем объем доводят до 3 мл 96% -ным этанолом. После перемешивания и пробу выдерживают в темноте 10 мин. Реакцию останавливают добавлением 1 мл 0,4 М раствора HCl .

Контролем служит пробирка, в которую добавляют по 0,2 мл 25 мМ раствора *о*-фенантролина, 2,6 мл 96% -ного этанола, 0,2 мл 12,3 мМ раствора FeCl_3 и 1 мл 0,4 М раствора HCl .

Если экстракт имеет окраску то, в отдельную пробирку вносят объем экстракта, равный взятому для определения,

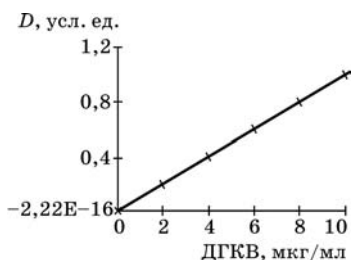


Рис. 3.1

и затем доводят общий объем пробирки до 4 мл 96% -ным этанолом.

Пример построения калибровочного графика (рис. 3.1).

Измерение светопоглощения растворов проводят при 505 нм.

Светопоглощение экстракта снимают против раст-

вора 96% -ного этанола. Определенную величину светопоглощения экстракта вычитают из светопоглощения опытной пробирки.

Метод расчета. Вычисление содержания антиоксидантов проводили по формуле

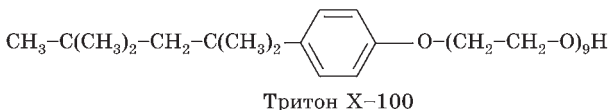
$$C_{AO} = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{P \cdot V_2}, \text{ мг/г,}$$

где C — концентрация антиоксиданта, определенная по калибровочному графику, мкг/мл; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем, взятый для экстракции, мл; V_2 — объем экстракта, вносимого в пробирку, мл; V_3 — конечный объем пробы в пробирке, мл.

Оформление работы. Записать результат аналитических исследований, описать механизм действия антиоксидантов, назвать несколько водорастворимых антиоксидантов.

3.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ

Принцип метода. В основе метода лежит способность используемого детергента тритона X-100, производного полиоксиэтиленалкилфенола, извлекать из мембранных структур нерастворимые в воде соединения. За счет формирования мицеллярных структур в тритоне X-100 могут растворяться гидрофобные соединения.



Критическая концентрация мецеллообразования для тритона X-100 250 мкМ. При использовании детергента необходимо помнить о его способности поглощать в УФ-области, что мешает спектрофотометрическому определению для соединений, поглощающих в этой области.

Принцип определения антиоксидантов такой же, как описан выше.

Оборудование: ФЭК; центрифуга; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы; колбы на 500 мл — 1 шт., 100 мл — 2 шт., 50 мл — 2 шт.; пипетки на 0,2 мл — 3 шт., 1 мл — 1 шт., 5 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы. 500 мл 50%-ного этанола с 1%-ным раствором тритона X-100 (рабочий раствор); 100 мл 50%-ного этанола; 20 мл 25 мМ раствора о-фенантролина (4,95 мг/мл); 50 мл 12,3 мМ раствора FeCl_3 (2 мг/мл); 100 мл α -токоферола (α -ТК) с концентрацией 0,2 мг/мл; 100 мл 0,4 М раствора HCl ; 10 мл супернатанта зерновок пшеницы или экстракта растений (экстракт растений перед исследованиями необходимо разбавлять в 100–200 раз).

Приготовление рабочих растворов. Рабочий раствор готовят, растворяя 260 мл 96%-ного этанола и 5 мл тритона X-100 в 235 мл дистиллированной воды, 25 мМ раствор о-фенантролина готовят, растворяя 99 мг навески в 20 мл рабочего раствора; 12,3 мМ раствор FeCl_3 (безводный) готовят, растворяя 100 мг навески в 50 мл 50%-ного этанола; раствор α -токоферола готовят, растворяя 20 мг навески в 100 мл рабочего раствора; 0,4 М раствор HCl готовят, растворяя 3,4 мл 11,73 М раствора HCl в 96,6 мл дистиллированной воды; экстракцию антиоксидантов проводят путем настаивания навески растительной на рабочем растворе в соотношении 1:5 (на 1 г ткани 5 мл рабочего раствора) в течение 24 ч.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используют два ряда пробирок по 5 шт. в каждом. Первый ряд используется для разбавления исходного раствора α -токоферола с исходной концентрацией 0,2 мг/мл, как показано в таблице 3.6. Второй ряд пробирок служит для проведения качественной реакции.

После проведения разбавления из каждой пробирки первого ряда отбирают по 0,2 мл калибровочного раствора и вносят последовательно в расположенные напротив пробирки второго ряда. Затем во все пробирки второго ряда последовательно добавляют по 0,2 мл 25 мМ раствора о-фенантролина, 3,4 мл рабочего раствора и по каплям приливают 0,2 мл 12,3 мМ раствора FeCl_3 . После переме-

Приготовление растворов α -токоферола для построения калибровочного графика

Пробирки	Исходный раствор α -токоферола, мл	Рабочий раствор, мл	Концентрация α -токоферола в пробирке, мкг/мл	Светопоглощение D , усл. ед.
1	0,5	2,0	2	
2	1,0	1,5	4	
3	1,5	1,0	6	
4	2,0	0,5	8	
5	2,5	—	10	
6	Контроль	3,0	—	

шивания пробирки второго ряда выдерживают в темноте 10 мин (время проведения реакции). Реакцию останавливают добавлением 1 мл 0,4 М раствора HCl . Контролем служит пробирка, в которую добавляют по 0,2 мл 25 мМ раствора *o*-фенантролина, 2,6 мл рабочего раствора, 0,2 мл 12,3 мМ раствора FeCl_3 и 1 мл 0,4 М раствора HCl . Измерение светопоглощения проводят при 505 нм, записывая показания в таблицу. Калибровочный график (рис. 3.2) строят на миллиметровой бумаге, откладывая в координатах (D , C) изменения светопоглощения (ось ординат) от концентрации α -токоферола (ось абсцисс).

Пример:

Ход определения. В пробирку последовательно вносили 0,2 мл экстракта (объем вносимого образца можно изменять в пределах 0,05–0,5 мл в зависимости от содержания антиоксидантов в исследуемой пробе), 0,2 мл 25 мМ раствора *o*-фенантролина и по каплям приливали 0,2 мл 12,3 мМ раствора FeCl_3 . Затем объем доводят до 3 мл рабочим раствором. После перемешивания пробу выдерживают в темноте

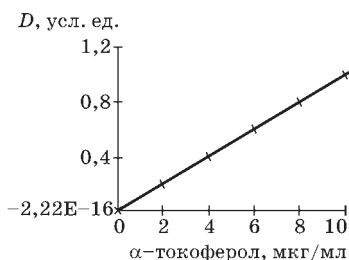


Рис. 3.2
Калибровочный график

10 мин. Реакцию останавливают добавлением 1 мл 0,4 М раствора HCl.

Контролем служит пробирка, в которую добавляют по 0,2 мл 25 мМ раствора *o*-фенантролина, 0,2 мл 12,3 мМ раствора FeCl₃, 1 мл 0,4 М раствора HCl, объем контрольной пробирки доводят до 4 мл рабочим раствором.

Если экстракт ткани имеет окраску, то в отдельную пробирку вносят объем экстракта, равный взятому для определения, и затем доводят общий объем пробирки до 4 мл рабочим раствором. Светопоглощение экстракта снимают против рабочего раствора. Определенную величину светопоглощения экстракта вычитают из поглощения опытной пробирки.

Все измерение светопоглощения проводили при 505 нм.

Метод расчета. Вычисление содержания антиоксидантов проводили по формуле

$$C_{AO} = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{P \cdot V_2}, \text{ мг/г ткани,}$$

где C — концентрация антиоксиданта, определенная по калибровочному графику, мкг/мл; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем, взятый для экстракции, мл; V_2 — объем экстракта, вносимого в пробирку, мл; V_3 — конечный объем пробы в пробирке, мл.

Оформление работы. Записать результат аналитических исследований, раскрыть роль антиоксидантов в клетках растений.

3.11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ В ГОМОГЕНАТАХ ТКАНЕЙ (ПО ГЛЕВИНДУ)

Принцип метода. Определение антиоксидантов проводят с использованием стабильного свободного радикала дифенилпикрилгидразила, который восстанавливается в реакции с антиоксидантом. Наблюдение за реакцией осуществляют по понижению светопоглощения опытного раствора при 528 нм.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; центрифуга.

Посуда: спектрофотометрические кюветы; колбы на 500 мл — 2 шт., 100 мл — 1 шт., 200 мл — 1 шт.; пипетки на 0,2 мл — 2 шт., 2 мл — 2 шт., 5 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы. 500 мл 50% этанола с 1%-ным раствором тритона X-100 (рабочий раствор); 100 мл α -токоферола с концентрацией 5 мг/мл; 500 мл 1%-ного раствора тритона X-100; 200 мл 0,025 мг/мл раствора ДФПГ; 10 мл супернатанта зерновок пшеницы.

Приготовление рабочих растворов. Рабочий раствор (РР) готовят, растворяя 260 мл 96%-ного этанола и 5 мл тритона X-100 в 235 мл дистиллированной воды; раствор α -токоферола готовят, растворяя 500 мг навески в 100 мл рабочего раствора или разбавляют исходный 5%-ный (0,1 М) раствор α -токоферола в 10 раз рабочим раствором (к 10 мл 0,1 М раствору α -токоферола прилить 90 мл рабочего раствора); экстракцию антиоксидантов проводят путем настаивания навески растительной ткани на рабочем растворе в соотношении 1:5 (на 1 г ткани 5 мл рабочего раствора) в течение 24 ч.

Раствор ДФПГ готовят, растворяя 5 мг навески в 5 мл 16,4 М (96% -ном) этанола на кипящей водяной бане в течение 5 мин, затем к смеси добавляют 195 мл 1%-ного раствора тритона X-100, нагревание продолжают еще 15–20 мин до полного растворения ДФПГ (исходный раствор ДФПГ должен иметь поглощение 0,5–0,6 усл. ед.).

Построение калибровочного графика. Установить в штатив 8 пробирок, в первые 4 пробирки последовательно вносят объемы раствора ДФПГ и раствора α -токоферола, как показано в таблице 3.7. Затем пробирки выдерживают в течение 5 мин в темноте. Измерения калибровочных растворов проводят против пробирок сравнения, в которые добавляют рабочий раствор и α -токоферол. Светопоглощение растворов измеряют на ФЭКе при 528 нм. Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая по оси ординат значения светопоглощения, а по оси абсцисс — концентрацию α -токоферола.

Ход определения. К 2 мл раствора ДФПГ добавляют 0,2 мл экстракта или супернатанта. Выдерживают в темноте 5 мин, а затем измеряют светопоглощение опытной

пробы против контроля, в котором содержится 0,2 мл экстракта и 2 мл 1 %-ного раствора тритона X-100.

Таблица 3.7

Объем растворов, используемых для построения калибровочного графика при определении антиоксидантов

№ п/п	Объем калибровочных растворов, мл		№ п/п	Объем растворов сравнения, мл		α -ТК, мг/г	Светопоглощение D , усл. ед.
	ДФПГ	α -ТК		РР	α -ТК		
1	2,45	0,05	5	2,45	0,05	0,1	
2	2,40	0,10	6	2,40	0,10	0,2	
3	2,35	0,15	7	2,35	0,15	0,3	
4	2,30	0,20	8	2,30	0,20	0,4	

Метод расчета. Вычисление содержания антиоксидантов проводили по формуле

$$C_{\text{АО}} = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{P \cdot V_2}, \text{ мг/г,}$$

где C — концентрация антиоксиданта, определенная по калибровочному графику, мкг/мл; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем, взятый для экстракции, мл; V_2 — объем экстракта или супернатанта, вносимого в пробирку, мл; V_3 — конечный объем пробы в пробирке, мл.

Оформление работы. Записать результат аналитических исследований, раскрыть роль антиоксидантов в клетках растений.

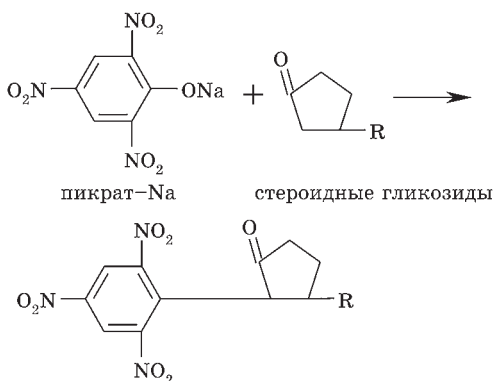
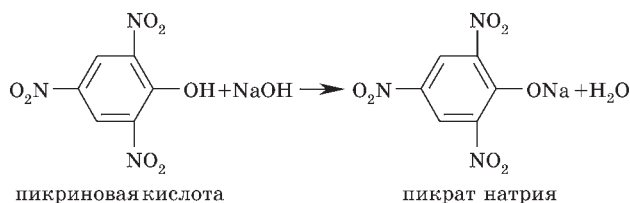
3.12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРОИДНЫХ (СЕРДЕЧНЫХ) ГЛИКОЗИДОВ

Принцип метода. Стероидные гликозиды относятся к группе функционально активных соединений, способных выполнять регуляторную функцию в растительных и животных тканях. Они накапливаются в семенах, листьях, плодах и других частях растений. Известна роль стероидных гликозидов в стимулировании процессов деления клеток, повышении их проницаемости. Кроме этого,

стероидные гликозиды могут являться антиоксидантами. Для определения их в растительных тканях используется пикриновая кислота.

Пикриновая кислота (2,4,6-тринитрофенол) образует молекулярные комплексы с ароматическими соединениями, особенно обогащенными электронами. Эти комплексы относятся к типу комплексов с переносом заряда. Пикриновая кислота используется для определения гликозидов стероидной природы, которые представляют собой соединения агликона с одним или большим числом остатков специфических сахаров. Агликоны (генины) в основе имеют пергидрофенантренциклопентан, к которому у семнадцатого углеродного атома присоединяется ненасыщенное пятичленное (реже шестичленное) лактонное кольцо.

Количественное определение сердечных гликозидов основано на реакции активного водородного атома пятичленного лактонного кольца с пикратом натрия:



Однако следует отметить, что с пикратом натрия, кроме сердечных гликозидов, могут реагировать и другие соединения, содержащие в своей структуре альдегидные, кетонные и другие функциональные группы. Основываясь на этом, W. Thomas и R. Dutcher использовали реакцию с пикратом натрия для определения углеводов. Однако в присутствии сахаров щелочной раствор пикриновой кислоты восстанавливается до пикраминовой с появлением оранжевого окрашивания. Аскорбиновая кислота также дает подобное окрашивание. Однако детальное исследование этих реакций показало, что природа реакции альдо- и кетосахаров с пикратом натрия несколько иная, чем с гликозидами. Реакция сахаров с пикратом натрия длится часами, а гликозидов — 15–20 мин, поэтому сахара практически не мешают определению сердечных гликозидов данным методом.

Оборудование: ФЭК; центрифуга; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы, колбы на 500 мл — 1 шт., 200 мл — 1 шт., 100 мл — 1 шт., 50 мл — 2 шт.; пипетки на 5,0 мл — 1 шт., 2,0 мл — 1 шт., 1,0 мл — 2 шт., 0,1 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: 500 мл 50%-ного этанола; 100 мл 43 мМ пикриновой кислоты (9,85 мг/мл); 50 мл 2,7 М NaOH (108 мг/мл); 200 мл 50%-ного этанола с 1%-ным тритоном X-100 (рабочий раствор (РР)); 40 мл 0,25 мг/мл раствора дигоксина (ДГ); 10 мл экстракта тканей растений на 50%-ном этаноле.

Приготовление рабочих растворов. Раствор 50%-ного этанола готовят, прибавляя 260 мл 96%-ного этанола к 240 мл д. в., раствор 50%-ного этанола с 1%-ным раствором тритона X-100 готовят, добавляя к 198 мл 50%-ного этанола 2 мл тритона X-100; раствор 43 мМ пикриновой кислоты готовят, растворяя 985 мг навески в 100 мл 50%-ного этанола с 1%-ным раствором тритона X-100; раствор 2,7 М NaOH готовят, растворяя 5,4 г навески в 50 мл 50%-ного этанола; раствор дигоксина готовят, растворяя 10 мг навески в 40 мл д. в.

Построение калибровочного графика. Установить в штатив 7 пробирок, в каждую из которых последовательно вносят объемы дигоксина, рабочего раствора, пикрино-

вой кислоты и NaOH, как показано в таблице 3.8. Измерения калибровочных растворов проводят против контроля, в котором содержится все то же, кроме дигоксина. Светопоглощение растворов измеряют на ФЭКе при 490 нм. Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая полученные значения в координатах (D , C).

Таблица 3.8

Объем и порядок внесения растворов в пробирки, используемые для построения калибровочного графика

№ п/п	Объем ДГ 0,25 мг/мл, мл	Объем рабочего раствора, мл	Объем 43 мМ пикриновой кислоты, мл	Объем NaOH 2,7 М, мл	ДГ в пробирке, мкг/мл	Светопоглощение D , усл. ед.
1	0,2	2,75	0,05	0,05	14,3	
2	0,4	2,55	0,05	0,05	28,6	
3	0,6	2,35	0,05	0,05	42,9	
4	0,8	2,15	0,05	0,05	57,1	
5	1,0	1,95	0,05	0,5	71,4	
6	1,2	1,75	0,05	0,5	85,6	
7	Контроль	2,95	0,05	0,5	—	

Ход определения. Подготовить 4 пробирки. В опытную пробирку последовательно добавляют 0,5–1,5 мл экстракта, 0,05 мл 0,43 мМ пикриновой кислоты, 0,5 мл 2,7 М NaOH. Конечный объем 3,5 мл доводят рабочим раствором. В качестве контроля используют растворы: К1 — в пробирку к 0,5–1,5 мл экстракта добавляют до 3,5 мл рабочий раствор; К2 — в пробирку последовательно вносят 2,95 мл рабочего раствора, 0,05 мл 0,43 мМ пикриновой кислоты, 0,5 мл 2,7 М NaOH. Все пробы спектрофотометрируют при 490 нм против рабочего раствора.

Метод расчета. Расчет поглощения опытного образца ($D_{\text{оо}}$) проводят путем вычитания светопоглощения $D_{\text{К1}}$ и $D_{\text{К2}}$ из светопоглощения опытной пробы ($D_{\text{оп}}$):

$$D_{\text{оо}} = D_{\text{оп}} - (D_{\text{К1}} + D_{\text{К2}}).$$

Затем по калибровочному графику определяют содержание сердечного гликозида в опытном образце ($D_{\text{оо}}$),

а содержание сердечных гликозидов (мг/г сухой ткани) проводят по следующей формуле.

$$CG = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_2}{P \cdot V_3},$$

где C — концентрация сердечного гликозида, определенная по калибровочному графику, мкг/мл; V_1 — общий объем экстракта растительной ткани, мл; V_2 — конечный объем пробы в пробирке, мл; V_3 — объем экстракта, взятого для определения, мл; P — навеска ткани, г.

Оформление работы. Записать результаты исследований, раскрыть роль стероидных гликозидов в ингибировании свободнорадикальных реакций.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие биогенные молекулы называются липидами?
2. Написать структурные формулы основных представителей липидов.
3. Классифицировать липиды по строению.
4. Раскрыть роль липидов в функционировании мембран клетки.
5. Какие растения больше всего накапливают липиды?
6. С помощью какого метода можно определить содержание холестерина?
7. Какие липопротеины содержатся в сыворотке крови?
8. Рассказать о перекисном окислении липидов.
9. Назовите причины появления активных форм кислорода в клетках живых организмов.
10. Рассказать о значении ПОЛ для живых организмов.
11. Раскрыть биологическую роль автоокисления.
12. Как происходит образование липидных перекисей при неферментном окислении ненасыщенных жирных кислот?
13. Назвать первичные продукты окисления ненасыщенных жирных кислот.
14. Каким образом происходит образование перекисей липидов в биологических системах?
15. Раскрыть роль Fe^{2+} в реакциях перекисного окисления.
16. Описать механизм реакций перекисного окисления липидов.
17. Какие соединения можно отнести к антиоксидантам?
18. Рассказать о механизме действия высокомолекулярных антиоксидантов.

19. В чем проявляются антирадикальная и антиоксидантная активность биогенных антиоксидантов?

20. Раскрыть действие антиоксидантов на кинетику ПОЛ.

21. Назвать соединения, влияющие на процесс ПОЛ в биологических мембранах.

22. Описать механизм действия фенольных антиоксидантов.

23. Классификация перекисных систем в клетке.

24. Охарактеризовать действие перекисей ненасыщенных жирных кислот на биологические мембраны и белки.

25. Рассказать о действии ионизирующей радиации и ультрафиолетового облучения на процессы ПОЛ.

26. Рассказать о возможности использования антиоксидантов в животноводстве.

АМИНОКИСЛОТЫ, БЕЛКИ
И ДРУГИЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ
СОЕДИНЕНИЯ

Аминокислотами являются низкомолекулярные органические соединения, относящиеся к группе карбоновых кислот ($R-\text{COOH}$), в составе которых присутствует аминогруппа ($-\text{NH}_2$). В живых организмах определяются как *L*-, так и *D*-формы. В природе встречается около 300 различных по строению аминокислот. В составе белков содержатся 27 разновидностей аминокислотных остатков, однако в синтезе белков участвуют 19 аминокислот и 1 амид (пролин). Все они относятся к α -*L*-формам аминокислот, у которых в α -положении располагается аминогруппа.

Аминокислоты выполняют в живых организмах самые разнообразные функции. Они поддерживают буферную емкость клеток, входят в состав белков и различных биологически активных соединений. Так, например, β -аланин является частью пантотеновой кислоты, которая входит в состав HS-CoA . Большая группа соединений, стимулирующих клеточное деление, называемых ауксинами, являются производными индолилуксусной кислоты, предшественником которой считают триптофан. Пролин, образующийся в результате возрастания активности гидролитических ферментов, выполняет роль низкомолекулярного осмотически активного соединения, образует в цитоплазме клеток гидрофильные коллоиды, защищая белки клеток от денатурации.

В растениях синтезируются практически все аминокислоты. Однако для животных и человека некоторые аминокислоты являются незаменимыми. Это обусловлено тем, что они не синтезируются в клетках животных. Причем их

состав для каждого вида животных индивидуален. К этой группе аминокислот относятся следующие: валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, триптофан, метионин, треонин, лизин, аргинин и гистидин. Последние два хотя и образуются в организме млекопитающих, но в недостаточном количестве.

Большинство аминокислот хорошо растворимы в полярных растворителях, в частности в воде, что обусловлено наличием в составе аминокислот карбоксильных и аминогрупп, которые способны находиться в протонированном и депротонированном состоянии в зависимости от рН среды. Состояние аминокислоты определяется величинами констант диссоциации (K_d) COOH- и NH_2 -групп, отрицательный логарифм которых равен pK_a ($-\lg K_d = pK_a$). Для большинства аминокислот pK_{a1} карбоксильных групп равно $\sim 2,0$, а pK_{a2} аминогрупп $\sim 9,0$. В изоэлектрической точке суммарный заряд аминокислоты равен нулю. Таким образом, в интервале рН от 2,0 до 9,0 почти все свободные аминокислоты будут находиться преимущественно в виде цвиттерионов с протонированной аминогруппой и диссоциированной карбоксильной группой.

Согласно строению аминокислоты, можно условно разделить на три группы: гидрофобные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, метионин, триптофан, пролин), полярные незаряженные (глицин, серин, треонин, тирозин, цистеин, аспарагин, глутамин) и заряженные (лизин, гистидин, аргинин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты).

Аминокислоты входят в состав пептидов и белков, образование которых основано на проявлении реакционной способности их карбоксильных и аминогрупп. Перераспределение электронной плотности между атомами, входящими в состав карбоксильной группы ($-\text{COOH}$), обуславливает образование на атоме кислорода избыточного отрицательного заряда, а на атоме углерода — избыточного положительного заряда. При этом атом азота аминогруппы ($-\text{NH}_2$) одной из аминокислот, проявляя нуклеофильные свойства, атакует атом углерода карбоксильной группы другой аминокислоты. В образовавшемся переходном комплексе происходит перераспределение электронной плотности, сопровождаемое

образованием дипептида и отщеплением молекулы воды. Амидная связь в дипептиде, образованная карбоксилем одной молекулы аминокислоты и аминогруппой другой, называется пептидной связью. В зависимости от числа аминокислотных остатков, входящих в молекулу пептида, различают дипептиды, трипептиды, тетрапептиды и т. д.

Белками называются высокомолекулярные соединения, в состав которых входят только α -L-аминокислоты и иминокислота — пролин. Последовательное соединение α -L-аминокислот в полипептидную цепь, связанных между собой за счет пептидной связи, согласно генетической информации, хранящейся в структуре ДНК, называется *первичной структурой* белка. При этом пептидная связь по природе является ковалентной полярной связью, которая образована между углеродом одной аминокислоты и азотом другой, обеспечивая таким образом связывание двух аминокислотных остатков между собой и проявляя стабильность первичной структуры белка ($R-NH-CO-R'$). Причем из-за неравномерности распределения заряда вдоль полипептидной цепи она неустойчива в полярной среде, что приводит к ее закручиванию в α -спираль или к образованию складчатой структуры (параллельной и антипараллельной β -структур), которые стабилизированы за счет водородных связей. Такая конформация полипептидной цепи называется *вторичной структурой* белка. Наличие гидрофобных радикалов в составе аминокислот обуславливает дальнейшее сворачивание полипептидной цепи в устойчивую глобулярную структуру, которая стабилизирована в основном за счет слабых связей (гидрофобных и гидрофильных взаимодействий, ионных и водородных связей), а также несколькими ковалентными дисульфидными ($-S-S-$) связями — *третичная* структура белка. При этом на поверхность отдельных белковых глобул могут выходить гидрофобные радикалы аминокислотных остатков, которые способны сформировать из двух и более субъединиц (мономерных полипептидных цепей, имеющих третичную структуру) единое структурное образование, обладающее функциональной активностью и стабилизированное за счет слабых нековалентных связей, которая называется *четвертичной структурой* белка.

Белки способны набухать, поглощая воду, обладают оптической активностью, могут проявлять движение под действием электрического поля, поглощают УФ-излучение при 280 нм. Последнее обусловлено светопоглощительной способностью ароматических аминокислот — триптофана и тирозина.

Растворимость белков определяется природой тех групп, которые располагаются на поверхности белковой глобулы. Растворимость белков в воде возрастает при добавлении небольших концентраций солей (Na_2SO_4 , MgSO_4 , NaCl и др.). Эти соли в малых концентрациях увеличивают степень диссоциации ионизированных групп белка, что создает условия для экранирования заряженных групп белковых молекул, уменьшая белок-белковые взаимодействия. Высокие концентрации солей способствуют осаждению белков из водных растворов. Растворимость белков зависит от pH растворителя, его состава и температуры среды. В присутствии органических растворителей (ацетон, хлороформ, этилацетат и др.), понижается растворимость белков, сопровождаемая выпадением их в осадок. Понижение температуры среды так же способствует осаждению белков. Причем чем ниже температура среды, тем больше белков выпадет в осадок.

Имея на поверхности белковой молекулы заряженные аминокислотные остатки, белки могут приобретать положительный или отрицательный заряд, а также иметь нулевой заряд. Это наблюдается в случае равенства положительно и отрицательно заряженных групп, расположенных на поверхности белковой глобулы. Такое состояние определяется величиной pI и зависит от pH среды. В изоэлектрической точке суммарный заряд белков равен нулю. При этом они утрачивают способность к перемещению в электрическом поле. В изоэлектрической точке белки мало устойчивы в растворе и легко выпадают в осадок, что обычно обусловлено перераспределением зарядов на поверхности белка, приводящих к изменению его пространственной структуры. Диссоциирующие на поверхности белковой глобулы функциональные группы способны связывать различные ионы металлов, что обуславливает избирательное их поведение в среде. Так, например, ионы кальция способствуют

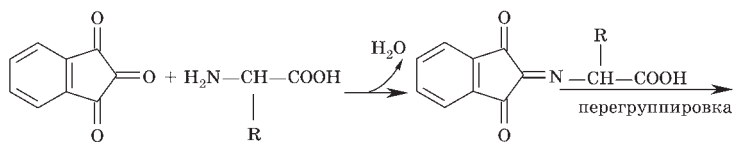
формированию ассоциированных ансамблей белков в молоке, которые образуют устойчивые белковые мицеллы, основу структуры которых составляют казеины, являющиеся белками молока.

Различают несколько форм белков: нативная, денатурированная, модифицированная и рекомбинантная. Нативной или природной формой считается белок, синтезированный в клетке живого организма и обладающий функциональной активностью или способный ее приобрести в случае необходимости. В результате действия химических или физических факторов (ионы тяжелых металлов, органические растворители, кислоты, щелочи, температура, ионизирующее излучение и др.) белки денатурируют, что сопровождается изменением их физико-химических свойств и утратой функциональной активности. Процесс денатурации представляет собой внутримолекулярное изменение пространственного расположения по отношению друг к другу отдельных пептидных фрагментов в белковой макромолекуле без разрыва ковалентных связей.

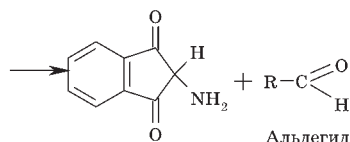
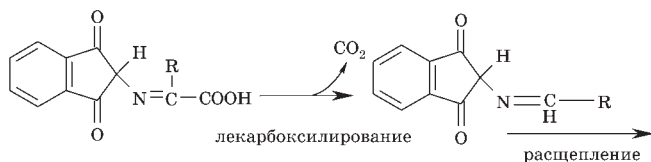
Условно белки можно разделить на две группы: простые и сложные. Простыми называются белки, в основе структуры которых полипептидная цепь, состоящая из аминокислотных остатков. В состав сложных белков, кроме полипептидной цепи, могут входить углеводы (гликопротеиды), липиды (липопротеиды), нуклеиновые кислоты (нуклеопротеиды) или различные неорганические и низкомолекулярные органические соединения (остатки фосфорной кислоты, ионы металлов, гем, флавиномононуклеотид, флавинадениндинуклеотид, липоевая кислота, тиаминпирозинфосфат и др.).

4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ НИНГИДРИНА

Принцип метода. Нингидрин взаимодействует с NH_2 -группой аминокислоты с образованием основания Шиффа, которое затем претерпевает перегруппировку, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминодикетогидринден.



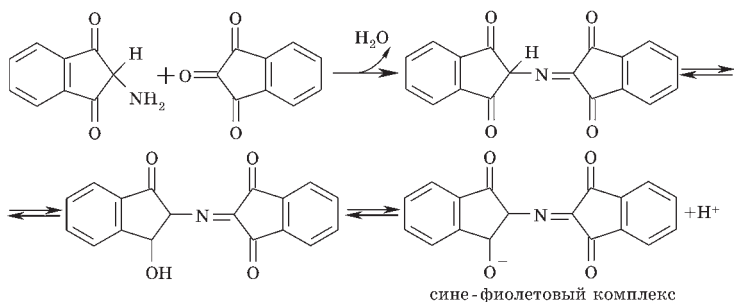
основание Шиффа



Дикетоглидринден

Альдегид

Последний конденсируется с еще одной молекулой нингидрина, и образовавшееся соединение, енолизируясь, переходит в сложное соединение муриксидного строения, придающее раствору сине-фиолетовый цвет.



сине-фиолетовый комплекс

Оборудование: водяная баня; центрифуга; аналитические весы; механическая мельница; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетки на 2,0 мл — 3 шт., на 1,0 мл — 1 шт.; пробирки — 4 шт.

Материалы и реактивы: зерновки пшеницы; альбумин; глицин; нингидрин.

Приготовление растворов. 0,1% -ный раствор глицина и 1% -ный раствор альбумина готовят, растворяя навески в д. в. 0,2% -ный раствор нингидрина готовят, растворяя навеску в 96% -ном этаноле или ацетоне.

Для получения супернатанта берут 5 г зерновок пшеницы, измельчают на механической мельнице и затем 2 г помола растворяют в д. в. в соотношении 1:3 (на 1 г помола пшеницы 3 мл д. в.). После перемешивания гомогенат центрифугируют 15 мин при 7000g.

Ход работы. В 4 пробирки последовательно вливают 2,0 мл д. в., 2,0 мл 1% -ного раствора альбумина, 2,0 мл 0,1% -ного раствора глицина и 2,0 мл супернатанта. Затем в каждую пробирку добавляют по 0,5 мл раствора нингидрина, как показано в таблице 4.1. После перемешивания растворов пробирки помещают на 2 мин в кипящую водяную баню. Наблюдают за изменением цвета и интенсивности окраски. Данные записать в таблицу 4.1.

Таблица 4.1

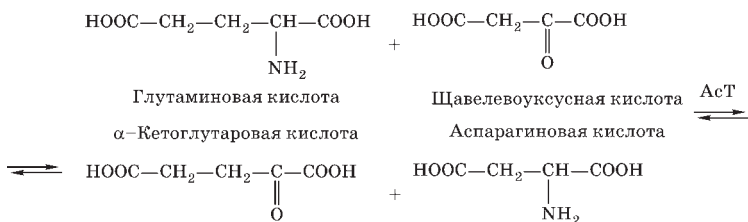
Растворы, используемые для качественной оценки присутствия аминокислот

№ пробирки	Образец	Объем образца, мл	Объем реагента, мл	Наблюдаемая окраска
1	Вода	2,0	0,5	
2	Альбумин	2,0	0,5	
3	Глицин	2,0	0,5	
4	Супернатант	2,0	0,5	

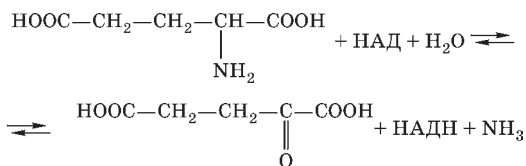
Оформление работы. Наблюдать за изменением окраски в каждой пробирке, отметить особенности протекания реакции.

4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Глутаминовая кислота относится к группе дикарбоновых аминокислот, участвует в ферментативных реакциях трансаминирования, катализируемых аминотрансферазами.



Кроме того, глутаминовая кислота служит субстратом глутаматдегидрогеназы, катализирующей превращение глутамата в α -кетоглутаровую кислоту. Реакция протекает в присутствии НАД.



Равновесие реакции сдвинуто влево, однако при условии связывания образовавшегося α -кетоглутарата гидразином, при избытке НАД и протекании реакции в щелочной среде глутамат количественно окисляется до α -кетоглутарата. При этом количество окисленного глутамата эквимолярно количеству НАДН.

Принцип метода. В основе метода лежит ферментативная реакция, катализируемая глутаматдегидрогеназой, протекающей в присутствии гидразина. В реакции участвует НАД, восстанавливающийся в НАДН, накопление которого регистрируется при 340 нм ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: спектрофотометр; рН-метр; центрифуга.

Посуда: колбы на 500 мл — 2 шт., на 100 мл — 3 шт.; пипетки на 0,2 мл — 3 шт., на 1,0 мл — 1 шт., на 2,0 мл — 1 шт., 5,0 мл — 3 шт.; центрифужные пробирки.

Материалы и реактивы: 0,6 М раствор хлорной кислоты (HClO_4); 2,0 М раствор фосфатов калия; глицин-гидразиновый буфера, рН 9,0; 30,0 мМ НАД^+ ; суспензия фермента (10 мг белка на мл).

Приготовление растворов. Раствор HClO_4 готовят перед использованием путем разбавления концентрированной

хлорной кислоты; раствор фосфатов калия готовят, растворяя 21,1 г K_3PO_4 и 18,3 г K_2HPO_4 в 100 мл бидистиллированной воды; глицин-гидразиновый буфер готовят путем смешивания растворов 0,5 М глицина (37,55 мг/мл) и 0,4 М гидразина (12,8 мг/мл) до pH 9,0 на pH-метре; НАД готовят перед анализом, растворяя навеску в бидистилляте (20 мг/мл); суспензию с глутаматдегидрогеназой (10 мг белка на мл) при необходимости разводят 0,15 М раствором Na_2SO_4 .

Ход определения.

Осаждение белков. В центрифужную пробирку вносят 1,0 мл 0,6 М $HClO_4$ и 1,0 г замороженной, измельченной растительной ткани. Пробу перемешивают и добавляют хлорную кислоту до соотношения 4:1 (4 мл кислоты на 1 г ткани), оставляя на 10 мин для осаждения белков. После этого пробу центрифугируют в течение 10 мин при $3 \cdot 10^3 g$ и 3,0 мл супернатанта переносят в чистую центрифужную пробирку. Для удаления избытка хлорной кислоты в пробирку вносят 1,8 мл 2,0 М раствора фосфатов калия. Пробу тщательно перемешивают и оставляют на 10 мин в ледяной бане. Затем центрифугируют в течение 10 мин при $3 \cdot 10^3 g$. Супернатант после нагревания до комнатной температуры используют в анализе.

Ферментативная реакция. В спектрофотометрическую кювету вносят 3,0 мл глицин-глицинового буфера, 0,2 мл супернатанта и 0,2 мл раствора НАД. После перемешивания измеряют исходное значение светопоглощения (D_1) при 340 нм. Затем добавляют 0,05 мл препарата фермента, перемешивают и через 30 мин измеряют конечное светопоглощение (D_2). В качестве контроля используют кювету, в которую вместо супернатанта вносят 0,2 мл бидистиллята. Измеряют исходное светопоглощение контроля (D_3) и конечное светопоглощение через 30 мин после добавления фермента (D_4).

Метод расчета. Содержание глутаминовой кислоты в пробе (мкмоль на 1 г сухой массы) вычисляют по формуле

$$C = \frac{38,4 \cdot \Delta D \cdot V}{\varepsilon},$$

где $\Delta D = (D_2 - D_1) - (D_4 - D_3)$ — изменение светопоглощения в кювете; V — конечный объем пробы в кювете, мл;

38,4 — коэффициент разбавления пробы по отношению к 1 г ткани; ε — коэффициент молярного светопоглощения НАДН при 340 нм ($6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Оформление работы. Записать результаты опыта, описать механизмы образования глутаминовой кислоты в клетках растений и возможности ее накопления в растительных тканях.

4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип метода. В УФ спектре белков проявляется максимум поглощения при 278 нм, что обусловлено наличием в их структуре триптофана ($\varepsilon = 5550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и тирозина ($\varepsilon = 1300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Поэтому при наличии сведений о первичной структуре белка и количестве в его составе остатков триптофана и тирозина концентрацию белка можно рассчитать, используя следующую формулу для определения коэффициента молярного поглощения при 278 нм:

$$\varepsilon_0 = n_1\varepsilon_1 + n_2\varepsilon_2,$$

где n_1 — количество остатков триптофана; ε_1 — коэффициент молярного поглощения триптофана; n_2 — количество остатков тирозина; ε_2 — коэффициент молярного поглощения тирозина.

Так, для аопероксидазы, в первичной структуре которой содержится только один остаток триптофана и 16 остатков тирозина, коэффициент молярного поглощения при 278 нм будет равен $26\,350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 1 шт., на 5,0 мл — 2 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: пероксидаза с $RZ = 1,0$ и $RZ = 3,0$; соляная кислота, метилэтилкетон.

Приготовление растворов. Раствор пероксидазы (0,4 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в. Прописываем спектр фермента при 700–250 нм против д. в. ($\varepsilon_{403} = 102 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Раствор соляной кислоты готовят, растворяя исходную HCl в д. в.

Ход работы. В две пробирки вносили по 3,0 мл 10 мкМ раствора пероксидазы с $RZ = 1,0$ и $RZ = 3,0$ соответственно и после этого в каждую пробирку добавляли по 0,05 мл 0,1 М раствора соляной кислоты до pH 2,5–3,0. Затем в пробирки добавляли по 3,0 мл метилэтилкетона. После встряхивания гем пероксидазы должен перейти в растворитель, и этот слой осторожно удаляем. Раствор апопероксидазы переносим в кювету и прописываем спектр его поглощения при 500–250 нм. Отсутствие максимума поглощения при 403 нм свидетельствует о полном извлечении гема из пероксидазы, а наличие максимума поглощения при 278 нм соответствует поглощению остатков триптофана и тирозина в первичной структуре апо-белка. Результаты исследования записываем в таблицу 4.2.

Таблица 4.2

Величины поглощения пероксидазы и апопероксидазы

№ пробирок	Пероксидаза				Апопероксидаза		
	концентрация, мкМ	D_{403} , усл. ед.	D_{278} , усл. ед.	$RZ = D_{403}/D_{278}$	D_{403} , усл. ед.	D_{278} , усл. ед.	концентрация, мкМ
1							
2							

Метод расчета. Концентрацию апопероксидазы (мкмоль/л) определяют по следующей формуле:

$$C = \frac{D_{278}}{(n_2 \varepsilon_2 - n_2 \varepsilon_2)}.$$

Степень чистоты препарата определяют по следующей формуле:

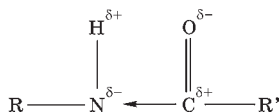
$$A, \% = \frac{D_{\text{белка}}}{D_0} \cdot 100,$$

где $D_{\text{белка}}$ — поглощение белка ($\varepsilon_{\text{белка}} = n_1 \varepsilon_1 + n_2 \varepsilon_2$); D_0 — поглощение при 278 нм ($D_0 = D_{\text{белка}} + D_{\text{примеси}}$).

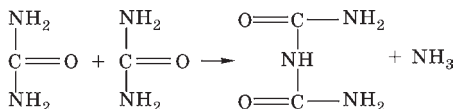
Оформление работы. Записать методику проведения опыта и рассчитать концентрацию апобелка в исследуемой пробе.

4.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА ПО БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИИ

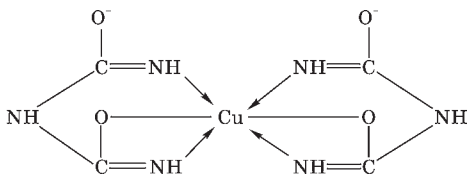
Принцип метода. Белки реагируют в щелочной среде с сернокислой медью с образованием соединений, окрашенных в фиолетовый цвет (биуретовая реакция). Эта реакция обуславливается наличием пептидной группировки:



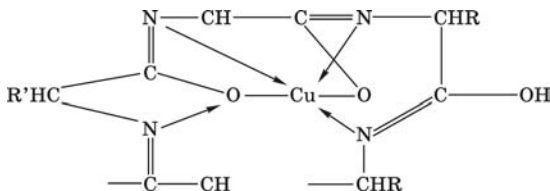
Биурет образуется при нагревании мочевины с отщеплением от нее аммиака.



В щелочной среде биурет претерпевает полную енолизацию, а в присутствии ионов меди (II) получается окрашенное производное комплексной соли, координационные связи в которой образованы за счет неподеленных электронных пар азота аминных групп.



Аналогично построено комплексное соединение меди с пептидными группами белка или полипептида.



Комплексы меди с белками образуют окрашенные соединения, имеющие максимумы поглощения при 540–580 и 615–670 нм. С помощью биуретовой реакции можно определять концентрацию белка в пробе 10^{-5} – 10^{-4} М.

Оборудование: ФЭК; центрифуга; аналитические весы.

Посуда: пробирки — 10 шт.; пипетки на 0,1 мл — 2 шт., 1 мл — 2 шт. и 5 мл — 1 шт.; мерные колбы на 200 мл — 1 шт., 1 л — 1 шт.

Материалы и реактивы: супернатант растительной ткани; 10% -ный раствор альбумина; рабочий раствор биуретового реактива; 0,9% -ный раствор NaCl (физиологический раствор).

Приготовление растворов: 10% -ный раствор альбумина готовят из исходного 40% -ного раствора альбумина, растворяя его в соответствующем количестве физиологического раствора, который должен содержать в 1 мл 0,1 г белка.

Биуретовый реактив. 9 г сегнетовой соли ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) переносят в мерную колбу емкостью 200 мл и растворяют в 80 мл 0,2 М раствора едкого натра. Затем в нее переносят 3 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 1 г KJ. Содержимое колбы тщательно перемешивают и доводят объем 0,2 М раствором едкого натра до метки. Реактив стоек. Хранят в посуде из темного стекла не более двух недель.

Рабочий раствор биуретового реактива. 200 мл биуретового реактива смешивают с 800 мл раствора иодистого калия, который готовят, растворяя 4 г KJ в 800 мл д. в. Раствор стоек.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используют два ряда пробирок по 4 шт. в каждом и одну пробирку для контроля. Первый ряд пробирок необходим для разбавления исходного 10% -ного раствора альбумина, как показано в таблице 4.3. Второй ряд пробирок служит для проведения качественной реакции. После проведения разбавления из каждой пробирки первого ряда отбирают по 0,1 мл калибровочного раствора и вносят последовательно в расположенные напротив пробирки второго ряда. Затем во все пробирки второго ряда последовательно добавляют по 5,0 мл рабочего биуретового реактива. После перемешивания пробирки второго ряда

оставляют на 30–60 мин для проведения реакции, а затем измеряют светопоглощение растворов на ФЭКе при 540–560 нм (зеленый светофильтр).

В качестве контроля используют раствор рабочего биуретового реактива, к 5,0 мл которого прибавляют 0,1 мл 0,9%-ного раствора NaCl. Полученные величины светопоглощения записывают в таблицу 4.3. Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая полученные данные в координатах (D , C).

Таблица 4.3

Приготовление рабочих калибровочных растворов альбумина

Пробирки	Раствор альбумина, мл	Раствор NaCl, мл	Концентрация белка, мг/мл	Светопоглощение D , усл. ед.
1	0,2	0,3	40	
2	0,3	0,2	60	
3	0,4	0,1	80	
4	0,5	—	100	

Опытная проба. К 5,0 мл рабочего биуретового реактива прибавляют 0,1 мл супернатанта, перемешивают, избегая образования пены. Через 30–60 мин измеряют оптическую плотность на ФЭКе в кювете шириной 1 см при длине волны 540–560 нм (зеленый светофильтр) против контроля, который готовят путем прибавления к 5,0 мл рабочего биуретового реактива 0,1 мл 0,9%-ного раствора NaCl и выдерживают аналогично опытной пробе.

Метод расчета. Концентрацию белка (мг/мл) в опытной пробе ($C_{\text{опыт}}$) определяют по калибровочному графику или по формуле

$$C_{\text{опыт}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}}}{D_{\text{ст}}},$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытной пробы; $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение стандартного раствора белка; $C_{\text{ст}}$ — концентрация белка в стандартном растворе, мг/мл.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации белка.

4.5. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА (ПО ЛОУРИ)

Принцип метода. Метод Лоури основан на изменении интенсивности окраски раствора, в котором одновременно протекают две реакции на белок: биуретовая реакция и реакция Фолина с тирозиновым и цистеиновым радикалами белковой молекулы. Последняя характеризуется протеканием реакций восстановления смеси фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета. При этом в реакции восстановления принимают участие комплексные соединения меди, возникающие при взаимодействии полипептидной цепочки белка со щелочным раствором сульфата меди. Вторая реакция менее специфична, но зато более чувствительна. Метод Лоури позволяет определять концентрацию белка даже в разбавленных растворах в пределах 10^{-7} – 10^{-6} М.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; аналитические весы; центрифуга.

Посуда: круглодонная колба с обратным холодильником; 2 колбы на 100 мл; цилиндр на 50 мл; пипетки на 1 мл — 3 шт. и 5 мл — 2 шт.

Материалы и реактивы: супернатант растительной ткани; раствор А (2%-ный карбонат натрия в 0,1 М гидроксиде натрия); раствор В (0,5%-ный $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе цитрата натрия); реактив Фолина, раствор С; 10%-ный альбумин (100 мг/мл); 0,9%-ный раствор NaCl .

Приготовление рабочих растворов. *Раствор А* готовят, растворяя последовательно в 94 мл дистиллированной воды 4 г NaOH и 2 г Na_2CO_3 ; *раствор В* готовят так же, последовательно растворяя в 98,5 мл дистиллированной воды 1 г виннокислого натрия ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) и 0,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Реактив Фолина готовят в круглодонной колбе на 1 л с обратным холодильником, куда последовательно добавляют 700 мл дистиллированной воды, 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты и 100 мл концентрированной HCl (плотность 1,18). После добавления нескольких кипятыльничков (для предотвращения

выплескивания раствора при кипячении) смесь кипятят непрерывно в течение 10–12 ч. Затем добавляют 150 г Li_2SO_4 , 50 мл дистиллированной воды и несколько капель брома. После этого кипятят содержимое колбы в течение 15 мин без обратного холодильника для удаления избытка брома. Раствор охлаждают и после доведения объема до 1 л фильтруют через стеклянный фильтр. Реактив имеет желтую окраску. Хранят реактив Фолина в темной стеклянной посуде. Перед употреблением реактив Фолина разбавляют дистиллированной водой до кислотности, соответствующей 1 М раствору HCl .

Раствор С готовят перед проведением определения, смешивая 49 мл раствора *А* с 1 мл раствора *В*.

Калибровочный раствор альбумина готовят путем разбавления исходного 100 мг/мл раствора дистиллированной водой до концентрации 100 мкг/мл.

0,9%-ный раствор NaCl готовят, растворяя 900 мг соли в 99,1 мл дистиллированной воды.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используют два ряда пробирок по 5 шт. в каждом и одну пробирку для контроля. Первый ряд используется для разбавления калибровочного раствора альбумина, тогда как второй ряд пробирок служит для проведения качественной реакции. Для этого в пробирки первого ряда последовательно вносим вначале по 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 мл раствора альбумина (100 мкг/мл), а затем по 4,0, 3,0, 2,0, 1,0, 0 мл *0,9%-ного раствора NaCl* соответственно. При этом концентрация альбумина в пробирках будет равна соответственно 20, 40, 60, 80 и 100 мкг/мл. После перемешивания из каждой пробирки первого ряда отбирают по 1,0 мл калибровочного раствора альбумина и вносят последовательно в расположенные напротив пробирки второго ряда. Затем во все пробирки второго ряда последовательно добавляют 4 мл раствора *С*. После перемешивания пробирки оставляют на 10 мин при комнатной температуре, а затем быстро прибавляют в каждую пробирку по 0,4 мл реактива Фолина. После повторного перемешивания калибровочные пробирки оставляют на 30–90 мин для развития окраски. Светопоглощение пробы измеряют на ФЭЖе при 750 нм. В качестве контроля используют пробирку, в которую

вместо раствора альбумина добавляли 1,0 мл 0,9% -ного раствора NaCl. Полученные величины светопоглощения записывают в таблицу 4.4. Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая полученные данные в координатах (D , C).

Таблица 4.4

Приготовление рабочих калибровочных растворов альбумина

Пробирки	Раствор альбумина, мл	Раствор NaCl, мл	Концентрация белка, мкг/мл	Светопоглощение D , усл. ед.
1				
2				
3				
4				
5				

Ход определения. Опыт с супернатантом. В пробирку вносят 1 мл исследуемого белкового раствора (супернатанта), к которому добавляют 4 мл раствора C . После встряхивания смесь в пробирке оставляют на 10 мин при комнатной температуре, а затем быстро прибавляют 0,4 мл реактива Фолина. После перемешивания пробу оставляют на 30–90 мин для развития окраски. Светопоглощение пробы измеряют на ФЭКе при 750 нм. В качестве контроля используют пробирку, в которую вместо раствора супернатанта добавляли 1,0 мл 0,9% -ного раствора NaCl.

Метод расчета. Концентрацию белка в исследуемой пробе определяют по калибровочной кривой.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации белка в исследуемой пробе.

4.6. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА (ПО БРЭДФОРДУ)

Принцип метода. Раствор Брэдфорда в присутствии белка меняет свой коричневый цвет на синий.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; аналитические весы; центрифуга.

Посуда: цилиндр на 100 мл; мерные колбы на 1 л — 1 шт. и на 100 мл — 2 шт.; пипетки на 1 мл — 3 шт.

Материалы и реактивы: супернатант растительной ткани; 100 мг кумасси G-250, 50 мл 96% -ного этилового спирта, 100 мл ортофосфорной кислоты; 10 мл 10% -ного альбумина (100 мг/мл); 0,9% -ный раствор NaCl.

Приготовление рабочих растворов. Реагент Брэдфорда готовят, растворяя 100 мг кумасси G-250 в 50 мл 96% -ного этилового спирта, с добавлением к этому раствору 100 мл ортофосфорной кислоты в мерной колбе на 1 л; после перемешивания объем колбы доводят до 1 л дистиллированной водой; готовый реактив, который должен иметь коричневый цвет, необходимо профильтровать через бумажный фильтр.

Калибровочный раствор альбумина готовят путем разбавления исходного 100 мг/мл раствора белка до концентрации 10 мкг/мл, используя 0,9% -ный раствор NaCl.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используют два ряда пробирок по 5 шт. в каждом и одну пробирку для контроля. Первый ряд используется для разбавления калибровочного раствора альбумина, тогда как второй ряд пробирок служит для проведения качественной реакции. Для этого в пробирки первого ряда последовательно вносим вначале по 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 мл раствора альбумина (10 мкг/мл), а затем по 4,0, 3,0, 2,0, 1,0, 0 мл дистиллированной воды соответственно. При этом концентрация альбумина в пробирках будет равна соответственно 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 10,0 мкг/мл. После перемешивания из каждой пробирки первого ряда отбирают по 1,0 мл калибровочного раствора альбумина и вносят последовательно в расположенные напротив пробирки второго ряда. Затем во все пробирки второго ряда последовательно добавляют по 1,0 мл реагента Брэдфорда. После перемешивания пробирки оставляют на 5–30 мин при комнатной температуре для развития окраски. Светопоглощение пробы измеряют на ФЭКе при 595 нм. В качестве контроля используют пробу, в которую вместо раствора альбумина добавляли 1,0 мл 0,9% -ного раствора NaCl. Полученные величины светопоглощения записывают в таблицу 4.5. Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая полученные данные в координатах (*D*, *C*).

Приготовление рабочих калибровочных растворов альбумина

Пробирки	Раствор альбумина, мл	Раствор NaCl, мл	Концентрация белка, мкг/мл	Светопоглощение D, усл. ед.
1				
2				
3				
4				
5				

Ход определения. В опытную пробирку вносят 0,1 мл супернатанта, 0,9 мл д. в. После перемешивания добавляют 1,0 мл реагента Брэдфорда. После перемешивания пробирку оставляют на 5–30 мин при комнатной температуре для развития окраски. Светопоглощение пробы измеряют на ФЭКе при 595 нм. В качестве контроля используют пробу, в которую вместо раствора альбумина добавляли 1,0 мл 0,9% -ного раствора NaCl.

Метод расчета. Концентрацию белка в пробе определяют по калибровочному графику.

Внимание! Реагент Брэдфорда очень чувствителен к белку (1–2 мкг/мл), поэтому все работы должны проводиться в чистых помещениях. Необходимо перед проведением работ тщательно вымыть посуду и кюветы. Кюветы после каждого измерения желательно мыть 96%-ным спиртом, так как кумасси может сорбироваться на стекле, завышая показания эксперимента. В случае, если раствор посинеет, то его необходимо заменить на новый.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации белка в исследуемой пробе.

4.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЕМОГЛОБИНА КРОВИ ГЕМОГЛОБИНЦИАНИДНЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Гемоглобин — это гемсодержащий белок, участвующий в переносе кислорода. Он является основным компонентом эритроцитов, обеспечивающих транспорт

кислорода из легких в ткани. В структуре гемоглобина четыре субъединицы (две α - и две β -субъединицы), каждая из которых содержит гем с железом (II). Восстановленная форма железа (Fe^{2+}) гема координирует с четырьмя атомами азота пиррольных колец протопорфирина IX. Гем обеспечивает обратимое связывание кислорода, тогда как белковая часть гемоглобина выполняет роль регулятора этого процесса, предотвращая окисление железа. В мономерной форме субъединица гемоглобина обладает пероксидазной активностью.

В данной работе определение гемоглобина основано на реакции его окисления железосинеродистым калием ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) до метгемоглобина, который образует с ацетонциангидрином окрашенный гемиглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству гемоглобина.

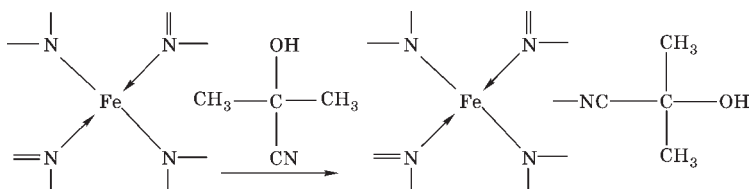


Схема образования окрашенного комплекса гемоглобинцианида

Оборудование: фотоэлектроколориметр; гемоглобинометр или спектрофотометр.

Посуда: пипетки мерные на 0,1 — 1 шт. и на 5 мл — 2 шт.; пробирки — 5 шт.; колба мерная на 1 л.

Материалы и реактивы: трансформирующий раствор; стандартный раствор гемиглобинцианида. Концентрация гемоглобина в стандартном растворе производства фирмы Reanal (Венгрия) 59,75 мг%, что соответствует при разведении крови в 251 раз концентрации гемоглобина в крови — 15г%. Этот стандартный раствор соответствует международному эталонному раствору гемиглобинцианида. Стандартный раствор хранят в холодильнике при $+4^\circ\text{C}$, в защищенном от света месте (предохранять от замораживания).

Приготовление растворов. Трансформирующий раствор готовят, последовательно добавляя в колбу на 1 л 0,47 г ацетонциангидрина, 2 г калия железосинеродистого, 1 г

натрия двууглекислого и объем колбы доводят дистиллированной водой до метки. Раствор стабилен при хранении в посуде из темного стекла при комнатной температуре в течение нескольких месяцев. При появлении осадка или при обесцвечивании раствор не пригоден для употребления.

Стандартный раствор гемиглобинцианида применяется в неразбавленном виде.

Построение калибровочного графика. Предварительно готовят 4 пробирки, в которые последовательно вносят согласно таблице 4.6 стандартный и трансформирующий растворы.

Т а б л и ц а 4.6

Приготовление калибровочных растворов для определения содержания гемоглобина в крови

Пробирки	Стандартный раствор, мл	Трансформирующий раствор, мл	Концентрация гемоглобина <i>C</i>		Светооглощение <i>D</i> , усл. ед.
			г%	г/л	
1	—	3,0	Контрольная		
2	1,0	2,0	5	50	
3	2,0	1,0	10	100	
4	3,0	—	15	150	

После перемешивания калибровочные растворы колориметрируют против контрольной пробы в кювете шириной 0,5 см при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр). На основании полученных данных строят на миллиметровой бумаге калибровочный график в координатах (*D*, *C*).

Ход работы. 0,02 мл крови приливают к 5,0 мл трансформирующего раствора в пробирке (разбавление в 251 раз) и хорошо перемешивают. Через 10 мин измеряют на ФЭКе при интервале длин волн 500–560 нм (зеленый светофильтр) в кювете шириной 0,5 см против контрольной пробы (трансформирующего раствора).

Методы расчета. Рассчитывают содержание гемоглобина (*C*_{Нб}, г%) по калибровочному графику или по формуле

$$C_{\text{Нб}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}}}{D_{\text{ст}}},$$

где $D_{\text{оп}}$ — поглощение опытной пробы; $D_{\text{ст}}$ — поглощение стандартного раствора гемоглобинцианида; $C_{\text{ст}}$ — концентрация гемоглобинцианида в стандартном растворе, г%.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации гемоглобина в исследуемой пробе.

4.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА (ПО Д. ДРАБКИНУ)

Принцип метода. К раствору гемоглобина добавляют трансформирующий раствор, содержащий железосинеродистый калий, цианид калия и бикарбонат натрия. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ окисляет все формы гемоглобина в метгемоглобин, который образует с цианидом окрашенный в красно-коричневый цвет прозрачный раствор гемоглобинцианида, имеющего максимум светопоглощения при 540 нм ($\varepsilon = 11 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Данный метод позволяет определять содержание гемоглобина в растворе в пределах 50–200 мг/мл. Цианид калия является высокотоксичным соединением, поэтому его рекомендуют заменить ацетонциангидрином.

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы.

Посуда: колба на 1 л; пипетки на 0,1 мл — 1 шт., на 5 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: гемоглобин; $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, NaHCO_3 , ацетонциангидрин.

Приготовление растворов. Раствор гемоглобина в д. в. Трансформирующий раствор готовят, растворяя 2,0 г $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1,0 г NaHCO_3 , 0,47 г ацетонциангидрина в 1 л д. в.

Ход работы. 0,05 мл раствора гемоглобина приливают к 5,0 мл трансформирующего раствора в пробирке и хорошо перемешивают. Через 10 мин измеряют на спектрофотометре при 540 нм в кювете шириной 1,0 см против контрольной пробы с трансформирующим раствором.

Метод расчета. Концентрацию гемоглобина (C_{Hb} , мкмоль/л или мкМ) определяют по следующей формуле:

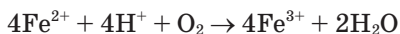
$$C_{\text{Hb}} = \frac{dD \cdot V_1}{\varepsilon \cdot l \cdot V_2},$$

где dD — светопоглощение раствора гемоглобина при 540 нм, усл.ед.; ε — коэффициент молярного поглощения ($\varepsilon_{403} = 11 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$); l — ширина кюветы, см; V_1 — общий объем в пробирке, мл; V_2 — объем вносимой пробы, мл.

Оформление работы. Записать методику, прописать спектр поглощения раствора оксигемоглобина, определить максимумы поглощения, рассчитать концентрацию гемоглобина в растворе.

4.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА (ФЕРРООКСИДАЗЫ) В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Принцип метода. Феррооксидаза (КФ 1.16.3.1) катализирует реакции окисления полифенолов и полиаминов в плазме крови.



Фермент относится к группе медьсодержащих гликопротеинов. В составе феррооксидазы содержится до 95% общего количества ионов меди плазмы крови. Имеет молекулярную массу, равную 130–138 кДа, содержит 6 доменов. С одной молекулой фермента связывается до 6 ионов меди. Действуя как феррооксидаза, церулоплазмин выполняет важнейшую роль в регуляции ионного состояния железа — окислении Fe^{2+} в Fe^{3+} . Это делает возможным включение железа в трансферрин без образования токсических продуктов железа. Поэтому церулоплазмин участвует в механизмах транспорта и метаболизма железа в организме животных. Кроме того, церулоплазмин может действовать как прооксидант или как антиоксидант в зависимости от наличия других факторов. Синтезируется церулоплазмин преимущественно паренхиматозными клетками печени и в меньшей степени макрофагами и лимфоцитами. Вначале происходит синтез пептидной цепи, а затем в состав белка включаются ионы меди от внутриклеточной АТФазы.

Определение активности церулоплазмина основано на реакции окисления *n*-фенилендиамина, которая останавливается фтористым натрием. Активность фермента

регистрируют при 530 нм. Содержание церулоплазмينا в плазме крови может быть в пределах 20–40 мг%.

Оборудование: ФЭК; рН-метр; аналитические весы; термостат; холодильник; штатив.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт.; пипетки на 0,1 мл — 1 шт., на 1,0 мл — 1 шт., на 2,0 мл — 1 шт., на 10,0 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: плазма крови; 27,63 мМ раствор *n*-фенилендиамина солянокислого; 0,714 М раствор NaF; 0,4 М раствор CH₃COONa; 0,4 М раствор CH₃COOH.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,4 М растворы CH₃COONa и CH₃COOH на рН-метре до рН 5,5.

Растворы *n*-фенилендиамина (5 мг/мл) и NaF (30 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в.

Ход работы. В две пробирки (опыт и контроль) последовательно вносят реактивы, как показано в таблице 4.7.

Таблица 4.7

Реактивы и порядок их внесения в пробирки при определении церулоплазмينا в плазме крови

Реактивы	Пробирки	
	опыт	контроль
Плазма крови, мл	0,1	0,1
Раствор NaF, мл	—	2,0
Буфер, мл	8,0	8,0
Раствор <i>n</i> -фенилендиамина, мл	1,0	1,0

После перемешивания содержимого пробирок их помещают на 60 мин в термостат при +37°C. После инкубации в опытную пробирку добавляют 2,0 мл раствора NaF. Содержимое пробирок перемешивают и переносят в холодильник на 30 мин при +4°C.

Светопоглощение опытной пробы измеряют на ФЭКе при 530 нм против контроля.

Метод расчета. Содержание церулоплазмينا в плазме крови (мг%) определяют по следующей формуле:

$$C_{\text{опыт}} = D_{\text{оп}} \cdot 87,5,$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытной пробы, усл. ед.; 87,5 — коэффициент пересчета.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение содержания церулоплазмينا в исследуемой плазме крови.

4.10. МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДОВ ИЗ ТИМУСА ТЕЛЕНКА

Принцип метода. Выделение пептидов из тимуса производят после измельчения, гомогенизации ткани и автолиза. Затем белки осаждают охлажденным ацетоном и сульфатом аммония. После растворения белкового осадка проводят его фракционирование на колонке с сефадексом G-50 и обессоливание на колонке с сефадексом G-15. Очищенная фракция пептидов после лиофилизации хранится при -20°C . Данный метод позволяет из 900 г тимуса получить 150 мг пептидов.

Оборудование: центрифуга; термостат; водяная баня; pH-метр; весы аналитические; спектрофотометр с проточной кюветой или Uvicord (LKB, Швеция); коллектор фракций; лиофильная сушка; прибор для ультрафильтрации белков.

Посуда: колбы на 500 мл — 9 шт.; хроматографические колонки (2,5×100 см) и (2,5×30 см); пипетка на 5 мл; стаканы на 500 мл.

Материалы и реактивы: тимус; марля или фильтр; фильтровальная бумага; ацетон, 0,01 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0; 0,01 М *трис*-HCl буфере, pH 8,0; 0,01 М *трис*-HCl буфере, pH 8,0, содержащий 0,15 М NaCl; 10% -ный раствор уксусной кислоты; насыщенный раствор сульфата аммония; порошок $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; сефадекс G-50 и G-15;

Приготовление растворов. Фосфатный буферный раствор готовится из исходных 0,01 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на pH-метре до pH 7,0.

Раствор буфера *трис*-HCl готовят, смешивая 0,01 М растворы триса и HCl на pH-метре до pH 8,0.

Раствор NaCl (8,8 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,01 М *трис*-HCl буфере, pH 8,0.

Подготовка сефадекса. Сухой сефадекс суспендируют в 200-кратном объеме д. в. и оставляют при 23°C на 48 ч для полного набухания. Набухание можно ускорить, проводя его на кипящей водяной бане в течение 5 ч.

Заполнение колонки сефадексом и нанесение образца. Колонку устанавливают строго вертикально, закрывают нижний кран, заливают 1/3 ее объема д. в. На дно колонки укладывают кружок фильтровальной бумаги, по размеру точно соответствующий внутреннему диаметру колонки. Через воронку наливают в колонку густую, тщательно взмученную смесь используемого сефадекса, который должен стекать по стенке колонки без пузырьков воздуха. После внесения первой порции геля необходимо дождаться его оседания на дно колонки, после чего открывают нижний кран и продолжают наполнение колонки, постепенно подливая следующие порции сефадекса. После того как колонка заполнится до нужной высоты, нижний кран закрывают и дают осесть сефадексу. При этом верхний слой сефадекса должен иметь гладкую горизонтальную поверхность. Для уменьшения взмучивания верхнего слоя при внесении в колонку образца над ним укладывают кружок фильтровальной бумаги. Колонку закрывают и подключают к резервуару с элюирующим раствором. После промывки колонки закрывают нижний кран, отсоединяют резервуар с элюентом, жидкость с поверхности сефадекса осторожно удаляют и при помощи пипетки осторожно вносят образец. Открыв нижний кран, дают впитаться образцу, затем добавляют небольшую порцию элюата и колонку подключают к резервуару с элюирующим раствором.

Ход работы. Тимус (900 г) освобождают от жировой и соединительной ткани, крупных сосудов, измельчают и гомогенизируют в 0,01 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0, при 0°C. Буфер добавляется в соотношении 1:3 (на 1 г тимуса 3 мл буфера). Гомогенат (4,2 л) выдерживают при +4°C без перемешивания 18 ч. Затем центрифугируют 30 мин при 4500g (+4°C). Осадок отбрасывают, а супернатант фильтруют через 2 слоя марли.

Супернатант (2,8 л) при непрерывном перемешивании выливают в емкость, помещенную в водяную баню

с температурой 80°C на 10 мин. После этого супернатант охлаждается до +20°C водопроводной водой.

Супернатант центрифугируют в рефрижераторной центрифуге при +4°C 30 мин 15 000g. Осадок отбрасывают и измеряют объем супернатанта (2,5 л).

Затем к супернатанту добавляется охлажденный до -20°C ацетон (20 л) в соотношении 1:7 (на 1 мл супернатанта добавляют 7 мл ацетона), смесь перемешивают в течение 1–1,5 ч. После прекращения перемешивания и осаждения белков ацетон удаляют, смесь центрифугируют при +4°C 10 мин при 1700g. Осадок промывают три раза охлажденным ацетоном с центрифугированием. Порошок (120 г) высушивают на воздухе в вытяжном шкафе.

Ацетоновый порошок растворяется при 23°C в 250 мл 0,01 М *трис*-HCl буфере, pH 8,0, при перемешивании на магнитной мешалке. После растворения белка (10 г) определяют его содержание в мг/мл с помощью биуретового метода и доводят до концентрации 25 мг/мл, добавляя 150 мл 0,01 М *трис*-HCl буфере, pH 8,0.

Измеряют объем раствора и после охлаждения до 0°C добавляют при перемешивании охлажденный насыщенный раствор сульфата аммония. К 100 мл белкового раствора добавляют 33,3 мл сульфата аммония. Раствор (530 мл) перемешивают при охлаждении 60 мин, а затем центрифугируют при +4°C 30 мин при 15 000g. Осадок отбрасывается и измеряют объем супернатанта (500 мл).

С помощью 10%-ного раствора уксусной кислоты при перемешивании в ледяной бане pH раствора доводится до 4. Измеряют объем раствора (800 мл) и при перемешивании добавляют порошок сульфата аммония (14,6 г на 100 мл раствора). После этого раствор (850 мл) перемешивают 60 мин и центрифугируют при +4°C 15 мин при 3000g.

Осадок белка растворяют при 23°C в 200 мл 0,01 М *трис*-HCl буфере, pH 8,0. После измерения объема в раствор добавляют насыщенный раствор сульфата аммония (60 мл (NH₄)₂SO₄ на 40 мл раствора белка). Раствор (500 мл) перемешивают 60 мин и центрифугируют при +4°C 15 мин при 3000g. Супернатант отбрасывается, а осадок растворяется при 23°C в 300 мл 0,01 М *трис*-HCl

буфера, pH 8,0. Определяют содержание белка с помощью метода Лоури (6 г) и доводят до концентрации 10 мг/мл, добавляя 300 мл 0,01 М *трис*-HCl буфером, pH 8,0. Изменяют объем раствора (600 мл), который подвергается ультрафильтрации через плоский фильтр с перемешиванием, с промывкой трехкратным объемом 0,01 М *трис*-HCl буфера, pH 8,0, до объема над фильтром, равного 15–20% объема фильтрационной ячейки (1,6 л). Лиофилизируют 1,5 л объема фильтрата так, чтобы можно было бы его растворить в минимальном объеме 0,01 М *трис*-HCl буфера, pH 8,0. Конечный объем раствора должен содержать 2 г белка, растворенного в 50 мл, наносится на хроматографическую колонку размером 2,5×100 см, наполненную сефадексом G-50, уравновешенной 0,01 М *трис*-HCl буфера, pH 8,0. Элюцию проводят в линейном градиенте 0,01 М *трис*-HCl буфера, pH 8,0, содержащего 0–0,15 М NaCl, калиброванный стандартными белками. Собирают фракции пептидов с молекулярной массой 1000–6000 Д. При этом в 120 мл раствора, в котором должно содержаться 200 мг пептидов, лиофилизируют. Затем порошок, содержащий пептиды, растворяют в 30 мл д. в. и пропускают через хроматографическую колонку (2,5×30 см) с сефадексом G-15, уравновешенную д. в., что позволяет избавиться от избытка солей. Фракции, содержащие пептиды, объединяют, определяют содержание белка (150 мг) и лиофилизируют.

Оформление работы. Записать методику выделения пептидов, определить степень чистоты препарата. Составить схему метода выделения пептидов.

4.11. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ГЕМОГЛОБИНА

Основными переносчиками газов в крови служат эритроциты, в составе которых гемсодержащий белок — гемоглобин. Последний состоит из четырех субъединиц (двух α и двух β). Тетрамер имеет молекулярную массу 64 458 Д. Окраску гембелкам придает гем, который приобретает ее за счет наличия сопряженных двойных связей на протопорфирине. Поэтому присутствие гемоглобина обуславливает красный цвет крови.

В растворе гемоглобин может присутствовать в следующих формах: оксигемоглобин (HbO_2), дезоксигемоглобин (HbH), метгемоглобин (MetHb), гемоглобинцианид (HbCN), карбоксигемоглобин (HbCO) и др. При этом каждая форма имеет специфические максимумы поглощения как в видимом (350–700 нм), так и в ультрафиолетовом (200–350 нм) диапазоне. Так, оксигемоглобин имеет максимумы поглощения в области длин волн 576, 541 и 412 нм.

Принцип метода. Гемоглобин получают путем гемолиза эритроцитов, содержащихся в эритроцитарной массе, дистиллированной водой и их замораживания. После этого производят концентрирование гемолизата ультрафильтрацией и полученный препарат гемоглобина лиофилизируют, удаляя избыток влаги. Кристаллический гемоглобин используется в качестве пищевой добавки, предназначенной для лечения и профилактики железодефицитных состояний человека и животных.

Оборудование: центрифуга; ультрафильтрационная установка; лиофильная сушка; хроматографическая колонка; аналитические весы.

Посуда: колбы на 1 л — 2 шт.

Материалы и реактивы: кровь КРС; 0,9% -ный раствор NaCl ; сефадекс G-75 или G-100; КМ-целлюлоза.

Приготовление растворов. Раствор NaCl готовят, растворяя 9 г соли в 991 мл д. в.

Ход работы. 1 л крови КРС центрифугируют 30 мин при 6000 об/мин при 4°C. Осадок, содержащий эритроциты, разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:2 или 1:4 и замораживают при –20°C. После размораживания гемолизат центрифугируют 30 мин при 6000 об/мин. Супернатант концентрируют на ультрафильтрационной установке при 10–15°C и pH 6,8–7,2 до объема 500 мл. Затем гемоглобин лиофилизируют. В полученном препарате содержание гемоглобина должно быть не менее 80% с массовой долей железа не менее 0,2%.

Для получения высокоочищенного препарата гемоглобина проводят дополнительную очистку раствора гемогло-

бина путем 2–3 экстракций его из эритроцитарной массы. После объединения полученных гемолизатов раствор гемоглобина очищают с помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. При проведении гель-фильтрации используют G-75 или G-100, уравновешенные 0,9% -ным раствором NaCl. При проведении ионообменной хроматографии используют КМ-целлюлозу. После очистки получают гемоглобин с чистотой не менее 99% и массовой долей железа 0,3%.

Оформление работы. Записать методику очистки гемоглобина и определить чистоту препарата.

4.12. ВЫДЕЛЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Принцип метода. Фибриноген является белком, участвует в процессе свертывания крови. Имеет молекулярную массу 340 кДа. При добавлении к плазме крови NaCl до 10% -ной концентрации фибриноген выпадает в осадок, а все остальные белки остаются в растворе.

Содержание фибриногена в плазме крови составляет 2,0–4,5 г/л.

Оборудование: центрифуга; аналитические весы; штатив.

Посуда: пипетка на 5 мл; пробирки; цилиндр.

Материалы и реактивы: кровь КРС; NaCl.

Ход работы. 5 мл крови КРС центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. Плазму сливают в отдельную пробирку и определяют объем. Затем плазму переливают в центрифужную пробирку, куда добавляют кристаллы NaCl в соотношении 10:1 (на 1 мл плазмы добавляют 0,1 мг NaCl). Перемешивают соль в пробирке до полного растворения. После этого пробирку помещают на 30 мин в холодильник при +4°C. Осадок отделяют центрифугированием 15 мин при 7000g. Надосадочную жидкость сливают, а осадок высушивают и взвешивают.

Оформление работы. Записать методику проведения опыта и определить выход продукта.

4.13. ВЫДЕЛЕНИЕ ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА

Принцип метода. Яичный белок представляет собой 10%-ный раствор нескольких белков, среди которых 70% составляет альбумин. Последний можно отделить от глобулярной фракции путем 10-кратного разведения яичного белка дистиллированной водой. При этом белки глобулярной фракции выпадают в осадок, который отделяют центрифугированием.

Оборудование: центрифуга; шейкер.

Посуда: стаканы на 100 и 500 мл; цилиндр; стеклянная палочка.

Материалы и реактивы: куриное яйцо; дистиллированная вода.

Ход работы. Куриное яйцо осторожно разбивают с двух концов и выливают белки в стакан. Затем измеряют объем и приливают д. в. в соотношении 1:10 (на 1 мл яичного белка 10 мл д. в.). Раствор перемешивают и оставляют на 30 мин при 23°C, наблюдая за образованием хлопьевидного осадка глобулинов. После этого раствор центрифугируют 15 мин при 3000g. Осадок отбрасывают, а в супернатанте определяют содержание белка с помощью биуретовой реакции или метода Лоури.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта, определить концентрацию альбумина в растворе.

4.14. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ГЕМОГЛОБИНА

Принцип метода. Метод гель-хроматографии позволяет фракционировать белки, имеющие различные размеры при их прохождении через гель с определенной величиной пор. Для этого чаще всего используют в качестве носителей сефадексы (G-75, G-100 и G-200). Белки с неизвестной молекулярной массой пропускают через колонку с сефадексом, которая была предварительно откалибрована с помощью белков-маркеров с известной молекулярной массой

и объемом элюции для каждого из них. При этом объем элюции определяют с момента внесения белка на колонку до его выхода с колонки. Из графика зависимости между логарифмом молекулярной массы и объемом его элюции определяют молекулярную массу неизвестного белка. В предлагаемой работе используется гемоглобин, молекулярная масса которого, по литературным данным, равна 64 500 Д.

Оборудование: весы аналитические; рН-метр; спектрофотометр с проточной кюветой или Uvicord (LKB, Швеция); коллектор фракций, перистальтический насос.

Посуда: стакан; пипетка на 5 мл; пробирки для сбора фракций элюции — 50 шт.; хроматографическая колонка (1,5×50 см).

Материалы и реактивы: сефадекс G-100; белки с определенной молекулярной массой: рибонуклеаза (12 000), пероксидаза (40 000), сывороточный альбумин (68 000) и γ -глобулин (140 000); 0,05 М Na-фосфатный буфер, содержащий 0,05 М KCl, рН 7,0; раствор гемоглобина (10 мг/мл).

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,05 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на рН-метре до рН 7,0, с добавлением к буферу KCl (3,73 мг/мл).

Белки-маркеры (4 мг/мл) и гемоглобин (10 мг/мл) растворяли каждый в отдельности в 1 мл 0,05 М Na-фосфатном буфере.

Приготовление сефадекса G-100. Сухой сефадекс суспендируют в 200-кратном объеме д. в. и оставляют при 23°C на 48 ч для полного набухания. Набухание можно ускорить, проводя его на кипящей водяной бане в течение 5 ч.

Подготовка хроматографической колонки к работе. Хроматографическую колонку (1,5×50 см) устанавливают строго вертикально, закрывают нижний кран и наливают в нее д. в. до 1/3 объема. Затем после удаления пузырьков воздуха на дно колонки укладывают кружок фильтровальной бумаги, соответствующий по размеру внутреннему диаметру колонки. Через воронку наливают сефадекс G-100, избегая образования пузырьков воздуха. Суспензии дают осесть, и после открытия нижнего крана продолжают наполнять колонку сефадексом. Заполнив колонку до

нужной высоты, закрывают нижний кран, дают носителю осесть и на поверхность сефадекса помещают кружок фильтровальной бумаги, который позволит уменьшить взмучивание верхнего слоя носителя при внесении в колонку образца. К колонке подсоединяют резервуар с элюирующим раствором. Скорость подачи элюирующего раствора регулируется насосом.

Ход работы. Вначале через хроматографическую колонку (1,5×50 см) с сефадексом G-100 последовательно пропускают растворы соответствующих белков-маркеров (по 1 мл), а затем после завершения калибрования колонки в нее вносят 1 мл гемоглобина. Белки вносят в колонку последовательно в порядке уменьшения их молекулярной массы с интервалом, зависящим от размера колонки. Для колонки 1,5×50 см объем собираемого элюата между нанесениями отдельных образцов белков составляет 20 мл. Элюат собирают небольшими порциями в 1–3 мл, при скорости элюции в 20 мл/ч. Регистрацию объема элюата, прошедшего через колонку, начинают с момента нанесения образца на колонку. Содержание белка во фракциях определяют спектрофотометрически при 280 нм. Дополнительно измеряют поглощение растворов белков: рибонуклеазы при 230, пероксидазы при 400, цитохрома С и гемоглобина при 412 нм.

Таблица 4.8

Величины молекулярных масс белков и объемы элюции при их гель-хроматографии на сефадексе G-100

Белки	Молекулярная масс, Д	$\lg M_r$	Объем элюции, мл
Рибонуклеаза	12 000		
Пероксидаза	40 000		
Сывороточный альбумин	68 000		
γ -глобулин	140 000		
Гемоглобин			

Метод расчета. Величину молекулярной массы гемоглобина определяют из графика зависимости логарифма молекулярной массы белка ($\lg M_r$) и элюионным объемом (V , мл).

Оформление работы. Построить график зависимости величины поглощения (D , усл. ед.) фракций белков от объема (V , мл) элюата. Определить молекулярную массу гемоглобина и сравнить ее значение с данными литературы.

4.15. ИЗУЧЕНИЕ КИСЛОТНОЙ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ

Принцип метода. При добавлении кислот к растворам белка изменяется кислотность среды. Белки, нативное состояние которых в основном поддерживается в нейтральной или близко к нейтральной области рН, при повышении кислотности среды начинают изменять свою пространственную структуру, что приводит к нарушению их нативной (природной) конформации. Разворачивание глобулы белка делает доступными для воды гидрофобные остатки аминокислот, которые в нативном состоянии располагались во внутренней части структуры белка. Отдельные участки на поверхности полипептидной цепочки могут взаимодействовать между собой, что приводит к образованию крупных ассоциатов. При проведении центрифугирования или длительном отстаивании растворов денатурированных белков, в особенности при низких температурах ($0^{\circ}\dots+4^{\circ}\text{C}$), агрегированные полипептидные цепочки белков оседают на дно сосуда.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; центрифуга.

Посуда: пипетки на 5 мл — 1 шт., 2 мл — 2 шт.; мерные колбы на 100 мл — 2 шт., 50 мл — 1 шт.; центрифужные пробирки — 6 шт.

Материалы и реактивы: 100 мл 7,2%-ной и 100 мл 3,6%-ной соляной кислоты; супернатант зерновок пшеницы (гороха).

Приготовление рабочих растворов. Приготовление HCl. В две колбы емкостью по 100 мл добавляют по 10 мл концентрированной HCl. В одну из колб добавляют 40 мл, а в другую — 90 мл д. в. После перемешивания получают 7,2%-ный и 3,6%-ный растворы HCl.

Получение супернатанта. 3 г зерна пшеницы или гороха после гомогенизирования на механической мельнице растворяют в д. в. в отношении 1:2 (1 г зерновок растворяют

в 2 мл д. в.). Смесь центрифугируют. Надосадочную жидкость используют для работы.

Ход работы. В три центрифужные пробирки помещают по 1 мл супернатанта. Затем последовательно вносят в первую пробирку 3 мл 7,2%-ной HCl, во вторую — 3 мл 3,6%-ной HCl, в третью (контрольную) — 3 мл д. в. После перемешивания пробирки оставляют при -20°C на 20–30 мин в морозильной камере. Затем пробирки центрифугируют при 7000g в течение 10 мин. Отмечают образование осадка. Содержание белка в контрольной и опытных пробирках определяют по биуретовой реакции, анализируя отдельно содержание белка в каждой пробирке. Результаты опыта записывают в таблицу 4.9.

Таблица 4.9

Растворы HCl для изучения кислотной денатурации белков

Пробирки	HCl, %		Вода	Наблюдаемые изменения	Содержание белка, мг/мл
	7,2	3,6			
1	3,0	—	—		
2	—	3,0	—		
3	—	—	3,0		

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и объяснить наблюдаемые изменения в пробирках.

4.16. ИЗУЧЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ

Принцип метода. При повышении температуры происходит процесс денатурации белков, обусловленный нарушением их нативной структуры. Поэтому денатурация представляет собой внутримолекулярное изменение пространственного расположения по отношению друг к другу отдельных пептидных фрагментов в белковой макромолекуле. При этом в среде могут одновременно присутствовать как нативная (1), так и денатурированная (2) структуры белка (рис. 4.1).

Разворачивание белковой глобулы приводит к экспонированию на поверхность молекулы остатков гидрофобных

аминокислот, взаимодействие которых может приводить к образованию крупных ассоциатов денатурированных белков, о чем свидетельствует степень помутнения раствора или образование осадков.

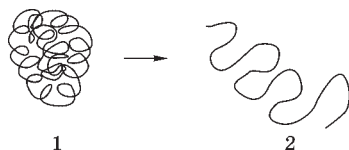


Рис. 4.1

Оборудование: центрифуга; ФЭК; водяная баня.

Посуда: термостойкий стакан на 400 мл; пипетки на 5 мл — 1 шт.; пробирки — 3 шт.

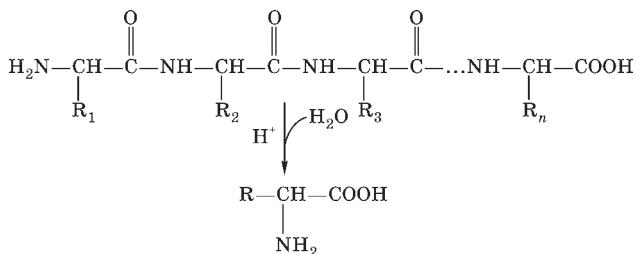
Материалы и реактивы: супернатант зерновок пшеницы или 10% -ный раствор альбумина.

Ход работы. В три пробирки отбирают по 3 мл супернатанта зерновок пшеницы или раствор альбумина. Две из них помещают в кипящую водяную баню на 15 и 30 мин. После охлаждения измеряют светопоглощение растворов на ФЭКе при красном светофильтре (605–700 нм). Затем пробы центрифугируют 15 мин при $3 \cdot 10^3$ об/мин, удаляют осадок и еще раз измеряют их светопоглощение. После этого во всех пробирках определяют содержание белка по биуретовой реакции.

Оформление работы. Отмечают изменения, происходящие в пробирках при денатурации белков.

4.17. КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ

Принцип метода. Белки в кислой среде при длительном воздействии высокой температуры денатурируют и гидролизуются до аминокислот.



Оборудование: сушильный шкаф или термостат; аналитические весы; вакуумный насос; газовая горелка; роторный испаритель; вакуум-эксикатор с NaOH.

Посуда: колбы на 100 мл — 2 шт.; пипетка на 0,1 мл — 1 шт., на 1 мл — 1 шт., на 2 мл — 1 шт.; ампула из толстостенного стекла размером 1×7 см; пробирка; стакан; круглодонная колба.

Материалы и реактивы: белок; марля; 5,7 М раствор HCl; жидкий азот или ацетон с угольной кислотой; 5% -ный раствор фенола.

Приготовление растворов. Растворы HCl и фенола готовят, растворяя соответствующие объемы и навески в д. в.

Ход работы. К 2 мг белка в небольшой пробирке добавляют 1 мл 5,7 М раствора HCl и после перемешивания смесь переносят в сухую ампулу из толстостенного стекла (1×7 см). Пробирку трижды ополаскивают 0,5 мл 5,7 М раствора HCl. В ампулу добавляют 0,1 мл 5% -ного раствора фенола. Содержимое ампулы замораживают, а затем ампулу обвязывают марлей и присоединяют к насосу, откачивают воздух. Содержимое ампулы осторожно размораживают и операцию с откачкой воздуха проводят еще раз. Ампулу запаивают под вакуумом, ставят в стакан и помещают в сушильный шкаф на 48 ч при 110°C.

Дальнейшие операции проводят в защитных очках.

По окончании гидролиза ампулу охлаждают, вскрывают, а ее содержимое переносят в небольшую круглодонную колбу и соляную кислоту упаривают досуха на роторном испарителе при 60°C. Для удаления HCl в колбу добавляют 1,5 мл д. в. и снова упаривают. Последнюю операцию повторяют дважды. Колбу хранят в вакуум-эксикаторе с NaOH.

Определить содержание белков биуретовым методом и аминокислот с помощью нингидрина до и после проведения кислотного гидролиза. Данные занести в таблицу 4.10.

Оформление работы. Записать результаты опыта, указать в таблице содержание белков и аминокислот в исследуемой пробе до и после проведения кислотного гидролиза.

Содержание белков и аминокислот в исследуемой пробе до и после кислотного гидролиза

Ингредиенты	До гидролиза	После гидролиза
Белки		
Аминокислоты		

4.18. ЩЕЛОЧНОЙ ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ

Принцип метода. Белки в щелочной среде при длительном воздействии высокой температуры денатурируют и гидролизуются до аминокислот.

Оборудование: сушильный шкаф или термостат; аналитические весы; вакуумный насос; газовая горелка; рН-метр.

Посуда: колбы на 100 мл — 2 шт., на 1 л — 1 шт.; пипетка на 1 мл — 1 шт., на 2 мл — 1 шт.; ампула из толстостенного стекла размером 1×7 см; пробирка; стакан.

Материалы и реактивы: белок; марля; жидкий азот или ацетон с угольной кислотой; лимонная кислота; NaOH; 12,11 М раствор HCl ($\rho = 1,185 \text{ г/см}^3$); 2 М раствор NaOH; 5,7 М раствор HCl; 0,4 М Na-ацетатный буферный раствор, pH 3,3.

Приготовление растворов. Растворы HCl и NaOH готовят, растворяя соответствующие объемы и навески в д. в.

Для приготовления буферного раствора в колбу на литр вносят 84 г лимонной кислоты, 16 г NaOH, 5,9 мл 12,11 М раствора HCl и д. в. до метки. pH раствора должен быть равен 3,3.

Ход работы. К 10 мг белка в небольшой пробирке добавляют 1 мл 2 М раствора NaOH и после перемешивания смесь переносят в сухую ампулу из толстостенного стекла (1×7 см). Пробирку трижды ополаскивают 0,5 мл 2 М раствора NaOH. Содержимое ампулы замораживают, а затем ампулу обвязывают марлей и присоединяют к вакуумному насосу, откачивают воздух. Содержимое ампулы осторожно размораживают и операцию с откачкой воздуха проводят еще раз. Ампулу запаивают под вакуумом, ставят в стакан и помещают в сушильный шкаф на 5 ч при 110°C.

Дальнейшие операции проводят в защитных очках.

По окончании гидролиза ампулу охлаждают, вскрывают и добавляют 1,6 мл 0,4 М Na-ацетатного буферного раствора pH 3,3 и 1 мл 5,7 М раствора HCl.

Определить содержание белков биуретовым методом и аминокислот с помощью нингидрина до и после проведения кислотного гидролиза. Данные занести в таблицу 4.11.

Таблица 4.11

Содержание белков и аминокислот в исследуемой пробе до и после щелочного гидролиза

Ингредиенты	До гидролиза	После гидролиза
Белки		
Аминокислоты		

Оформление работы. Записать результаты опыта, указать в таблице содержание белков и аминокислот в исследуемой пробе до и после проведения щелочного гидролиза.

4.19. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАТИВНОЙ И ДЕНАТУРИРОВАННЫХ ФОРМ АЛЬБУМИНА С КАЛЬЦИЕМ

Принцип метода. Под влиянием различных физических (температура, УФ- и γ -излучения) и химических (кислоты, щелочи, спирты и др.) факторов белки утрачивают свою нативную структуру, и этот процесс называется денатурацией. При этом у денатурированных форм белка изменяется функциональная активность, электрофоретическая подвижность, растворимость и т. д. Большинство белков денатурируют при температуре среды выше 50–60°C. При этой температуре происходит нарушение третичной структуры белка, сопровождаемое разворачиванием белковой глобулы, увеличением количества свободных поверхностных COOH- и SH-групп. Развернутые полипептидные цепи образуют случайные и беспорядочные структуры, слипающиеся между собой, с формированием объемных ассоциатов, что приводит к понижению их растворимости и выпадению белков в осадок. Процесс может ускоряться при понижении

температуры среды и в присутствии ионов кальция. Действие кальция проявляется в его способности образовывать множественные связи с поверхностными заряженными функциональными группами аминокислотных остатков полипептидной цепи, а пониженная температура среды способствует уменьшению подвижности образовавшихся ассоциатов в сформировавшемся коллоидном растворе. В результате агрегированные белки быстрее начинают оседать на дно сосудов. Этот процесс дополнительно ускоряется при центрифугировании и зависит от скорости центрифугирования.

Оборудование: водяная баня; секундомер; термометры (0–150°C) — 2 шт.

Посуда: пробирки — 5 шт.; колба на 100 мл — 1 шт.

Реактивы. 100 мл 10%-ного альбумин; 10,0, 1,0, 0,5, 0,1, 0,01 процентные водные растворы хлорида кальция (CaCl_2) по 20 мл.

Приготовление растворов. 10,0, 1,0, 0,5, 0,1, 0,01 процентные растворы CaCl_2 , получают путем последовательного разбавления исходного 10%-ного раствора хлорида кальция дистиллированной водой в 10, 20, 100 и 1000 раз.

4.19.1. УЧАСТИЕ КАЛЬЦИЯ В КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИИ С НАТИВНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Ход определения. В две пробирки последовательно внести по 1,5 мл 10%-ного альбумина. Затем в первую пробирку добавляют 0,3 мл 10%-ного CaCl_2 . После этого доводят объем пробирки до 5,0 мл дистиллированной водой. После перемешивания отмечают изменения в окраске растворов. Пробирки с растворами используют в следующем опыте.

4.19.2. УЧАСТИЕ КАЛЬЦИЯ В КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИИ С ДЕНАТУРИРОВАННОЙ ФОРМОЙ АЛЬБУМИНА

Ход определения. В каждую из пробирок из предыдущего опыта, опускаем термометр, а затем обе пробирки помещаем в кипящую водяную баню. Производим наблюдения за изменениями, происходящими в пробирках. Записываем в таблицу 4.12 показания времени и температуры, при которой происходят изменения цвета раствора в каждой из пробирок.

Таблица 4.12

Показатели изменения окраски растворов в пробирке 1 и 2

Пробирка 1			Пробирка 2		
время, с	$T^{\circ}\text{C}$	наблюдаемые изменения окраски растворов	время, с	$T^{\circ}\text{C}$	наблюдаемые изменения окраски растворов

4.19.3. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АЛЬБУМИНА НА ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСА С ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ

Ход определения. В штатив устанавливают 10 пробирок в два ряда по 5 шт. В пробирки первого и второго ряда, расположенные напротив, последовательно вносят по 2,5, 1,0, 0,5, 0,25 и 0,1 мл 10%-ного альбумина (табл. 4.13). В пробирки первого ряда добавляют по 0,3 мл 10%-ного CaCl_2 . Затем объем всех пробирок доводят до 5,0 мл.

Таблица 4.13

Приготовление растворов альбумина, различных концентраций

Пробирки	Раствор 10%-ного альбумина	Раствор 10%-ного CaCl_2	Дистиллированная вода	Общий объем, мл	Концентрация альбумина в пробирке, %	Показатели изменения окраски растворов
1	2,5	0,3	2,2	5,0	5,0	
2	1,0	0,3	3,7	5,0	2,5	
3	0,5	0,3	4,2	5,0	1,0	
4	0,25	0,3	4,45	5,0	0,5	
5	0,1	0,3	4,6	5,0	0,1	
6	2,5	—	2,5	5,0	5,0	
7	1,0	—	4,0	5,0	2,5	
8	0,5	—	4,5	5,0	1,0	
9	0,25	—	4,75	5,0	0,5	
10	0,1	—	4,9	5,0	0,1	

После перемешивания растворов все пробирки одновременно помещают в кипящую водяную баню на 5 мин.

Затем извлекаем из бани пробирки и охлаждаем их в холодной воде. Записываем в таблицу произошедшие изменения окраски растворов в каждой из пробирок.

4.19.4. ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДЕНАТУРИРОВАННЫХ ФОРМ АЛЬБУМИНА С КАЛЬЦИЕМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЕГО КОНЦЕНТРАЦИЯХ

Ход определения. В штатив устанавливаем 11 пробирок в два ряда (одна пробирка контрольная). В первый ряд пробирок последовательно наливаем по 5 мл 10,0, 1,0, 0,5, 0,1, 0,01 процентные растворы CaCl_2 , полученный путем разбавления исходного 10%-ного раствора хлорида кальция дистиллированной водой. Затем из каждой пробирки первого ряда отбираем по 0,5 мл раствора CaCl_2 и вносим последовательно в противоположные пробирки второго ряда. После этого во все пробирки второго ряда добавляем 1,5 мл 10%-ного альбумина. Общий объем в пробирках доводят до 5 мл, добавляя в каждую из пробирок второго ряда по 3 мл дистиллированной воды (табл. 4.14).

Таблица 4.14

Приготовление растворов хлорида кальция,
различных концентраций

Пробирки второго ряда	Хлорид кальция			Объем 10%-ного альбумина, %	Объем дист. воды, мл	Наблюдаемые изменения в окраске растворов
	исходная концент- рация, %	объем, вносимый в пробирку, мл	концент- рация раствора в пробирке, %			
1	10,0	0,5	1,0	1,5	3,0	
2	1,0	0,5	0,1	1,5	3,0	
3	0,5	0,5	0,05	1,5	3,0	
4	0,1	0,5	0,01	1,5	3,0	
5	0,01	0,5	0,001	1,5	3,0	
Контроль	—	—	—	1,5	3,5	

В контрольную пробирку вносим 1,5 мл 10%-ного альбумина и 3,5 мл дистиллированной воды. После перемешивания все пробирки второго ряда (6 шт.), помещаем в кипящую водяную баню на 5 мин. После охлаждения пробирок

в холодной воде записываем в таблицу произошедшие изменения окраски растворов в каждой из пробирок.

4.20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРИТОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Принцип метода. Нитриты, экстрагированные из растительных тканей, взаимодействуют с соединениями реактива Грисса (α -нафтиламином и сульфаниловой кислотой) в кислой среде с образованием азосоединения, обуславливающего окраску раствора в розово-красный цвет с максимумом поглощения при 536 нм.

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; гомогенизатор; водяная баня; шейкер.

Посуда: колбы на 1 л — 3 шт., на 250 мл — 2 шт., на 100 мл — 1 шт.; пипетки на 10 мл — 2 шт., на 2 мл — 1 шт., на 1 мл — 1 шт.; пробирки 8 шт.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы или клубни картофеля, α -нафтиламин, сульфаниловая кислота, 12%-ный раствор CH_3COOH , нитрит натрия (NaNO_2).

Приготовление растворов. Реактив Грисса: 1) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-ного раствора CH_3COOH ; 2) 0,1 г α -нафтиламина растворяют при нагревании в 20 мл д. в. и смешивают со 150 мл 12%-ного раствора CH_3COOH . Перед употреблением растворы 1 и 2 в равных пропорциях смешивают.

Стандартный раствор нитрита натрия готовят, растворяя 0,15 г навески в 1 л д. в. (1 мл раствора содержит 0,1 мг NO_2^-).

Рабочий стандартный раствор (РСР) нитрита натрия готовят, растворяя 50 мл стандартного раствора нитрита натрия в 1 л д. в. (1 мл раствора содержит 0,005 мг NO_2^-).

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используют 7 пробирок, в которые последовательно вносят по 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 и 1,4 мл рабочего стандартного раствора. Затем объем всех пробирок доводят до 10 мл д. в. После перемешивания в пробирки вносят по 0,5 мл реактива Грисса. Затем снова содержащее пробирок перемешивают и через 15 мин определяют

светопоглощение на ФЭКе при 536 нм. Данные записывают в таблицу 4.15.

Таблица 4.15

**Приготовление растворов нитрита натрия
для построения калибровочного графика**

№ пробирки	Объем РСР, мл	Объем д. в., мл	Содержание NO_2^- , мг	Светопоглощение D , усл. ед.
1	0,2	9,8	0,001	
2	0,4	9,6	0,002	
3	0,6	9,4	0,003	
4	0,8	9,2	0,004	
5	1,0	9,0	0,005	
6	1,2	8,8	0,006	
7	1,4	8,6	0,007	

На основании данных таблицы построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество NO_2^- (C , мг), а на оси ординат — значения светопоглощения растворов (D , усл. ед.).

Ход работы. Навеску растительного материала (10 г) измельчают и гомогенизируют. Гомогенат заливают 50 мл д. в. и выдерживают в течение 1 ч, постоянно перемешивая. Затем раствор фильтруют или центрифугируют 15 мин при 7000*g*. Фильтрат или супернатант сливают в мерную колбу на 100 мл, объем которой доводят до метки д. в. Для определения нитритов из колбы в пробирку отбирают 10 мл супернатанта (фильтрата) и добавляют 0,5 мл реактива Грисса. Опытную пробу перемешивают и через 15 мин определяют светопоглощение на ФЭКе при 536 нм.

Метод расчета. Содержание нитритов ($C_{\text{оп}}$, мг/г влажной массы) в растительной ткани определяют по формуле

$$C_{\text{оп}} = \frac{C_{\text{к}} \cdot V_1}{P \cdot V_2},$$

где $C_{\text{к}}$ — содержание нитритов, найденное по калибровочному графику, мг; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в пробирку, мл.

Оформление работы. Записать результаты опыта и объяснить значение нитритов для растений.

4.21. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Принцип метода. Вначале нитраты экстрагируются из растительных тканей, а затем они восстанавливаются до нитритов металлическим цинком в растворе уксусной кислоты. В дальнейшем уже нитриты взаимодействуют с соединениями реактива Грисса (α -нафтиламином и сульфаниловой кислотой) в кислой среде с образованием азосоединения, обуславливающего окраску раствора в розово-красный цвет с максимумом поглощения при 536 нм.

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр, гомогенизатор, водяная баня, шейкер.

Посуда: колбы на 1 л — 3 шт., на 250 мл — 2 шт., на 100 мл — 1 шт.; пипетки на 10 мл — 2 шт., на 2 мл — 1 шт., на 1 мл — 1 шт.; пробирки 8 шт.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы или клубни картофеля, α -нафтиламин, сульфаниловая кислота, 12%-ный раствор CH_3COOH , нитрат калия (KNO_3), цинковая пыль, сульфат марганца.

Приготовление растворов. Реактив Грисса: 1) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-ного раствора CH_3COOH ; 2) 0,1 г α -нафтиламина растворяют при нагревании в 20 мл д. в. и смешивают со 150 мл 12%-ного раствора CH_3COOH . Перед употреблением растворы 1 и 2 в равных пропорциях смешивают.

Стандартный раствор нитрата калия готовят, растворяя 1,63 г навески в 1 л д. в. (1 мл раствора содержит 1 мг NO_3^-).

Рабочий стандартный раствор (РСР) нитрита натрия готовят, растворяя 20 мл стандартного раствора нитрата калия в 0,1 л д. в. (1 мл раствора содержит 0,2 мг NO_3^-).

Смесь цинковой пыли с сульфатом марганца готовят в соотношении 1:100 (смесь содержит 1 г цинковой пыли и 100 г сульфата марганца).

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используют 8 пробирок, в которые

последовательно вносят по 0, 0,2, 0,3, 0,4, 1,0, 1,5, 2,0 и 3,0 мл рабочего стандартного раствора. Объем всех пробирок доводят до 6,0 мл д. в. Затем добавляют 2,0 мл 12% -ной уксусной кислоты, после перемешивания вносят на кончике скальпеля смесь цинковой пыли с сульфатом марганца. Пробирки встряхивают 30 с и затем приливают 1,0 мл реактива Грисса. Опытную пробу перемешивают и через 10 мин определяют светопоглощение на ФЭКе при 536 нм. Данные записывают в таблицу 4.16.

Таблица 4.16

**Приготовление растворов нитрита натрия
для построения калибровочного графика**

№ пробирки	Объем РСР, мл	Объем д. в., мл	Содержание NO_2^- , мг	Светопоглощение, усл. ед.
1	0,0	6,0	0,00	
2	0,2	5,8	0,04	
3	0,3	5,7	0,06	
4	0,4	5,6	0,10	
5	1,0	5,0	0,20	
6	1,5	4,5	0,30	
7	2,0	4,0	0,40	
8	3,0	3,0	0,60	

На основании данных таблицы построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество NO_3^- (С, мг), а на оси ординат — значения светопоглощения растворов (D, усл. ед.).

Ход работы. Навеску растительного материала (10 г) измельчают и гомогенизируют. Гомогенат заливают 50 мл д. в. и выдерживают в течение 1 ч, постоянно перемешивая. Затем раствор фильтруют или центрифугируют в течение 15 мин при 7000g. Фильтрат или супернатант сливают в мерную колбу на 100 мл, объем которой доводят до метки д. в. Для определения нитратов из колбы в пробирку отбирают 6 мл супернатанта (фильтрата) и добавляют 2,0 мл 12% -ной уксусной кислоты. После перемешивания в опытную пробирку вносят на кончике скальпеля смесь цинковой пыли с сульфатом марганца. Пробирку встряхивают 30 с и затем приливают 1,0 мл реактива Грисса. Опытную пробу

перемешивают и через 10 мин определяют светопоглощение на ФЭКе при 536 нм.

Метод расчета. Содержание нитратов ($C_{\text{оп}}$, мг/г влажной массы) в растительной ткани определяют по формуле

$$C_{\text{оп}} = \frac{C_{\text{к}} \cdot V_1}{P \cdot V_2},$$

где $C_{\text{к}}$ — содержание нитратов, найденное по калибровочному графику, мг; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в пробирку, мл.

Оформление работы. Записать результаты опыта и объяснить значение нитратов для растений и возможности их накопления в растительных тканях.

4.22. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВИНЫ ПО РЕАКЦИИ С ДИАЦЕТИЛМОНООКСИМОМ

Принцип метода. Определение содержания мочевины в растительных тканях основано на том, что мочевина образует с диацетилмонооксिमом в кислой среде в присутствии тиосемикарбазида и солей железа окрашенное соединение, светопоглощение которого при 500–560 нм пропорционально содержанию мочевины.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; водяная баня; центрифуга.

Посуда: колбы на 100 мл — 6 шт.; центрифужная пробирка — 1 шт.; обычные пробирки — 5 шт.; пипетки на 1 мл — 4 шт.; на 5 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; 10%-ный раствор ТХУ; 2,5%-ный раствор диацетилмонооксима; 0,25%-ный раствор тиосемикарбазида или 0,32%-ный раствор солянокислого тиосемикарбазида; основной и рабочий раствор хлорного железа, цветной реактив; 7 мМ раствор мочевины.

Приготовление рабочих растворов. 10%-ный раствор ТХУ, 2,5%-ный раствор диацетилмонооксима, 0,25%-ный раствор тиосемикарбазида или 0,32%-ный раствор

солянокислого тиосемикарбазида готовят, растворяя соответствующие навески в д. в.

Основной раствор FeCl_3 готовят, растворяя 5 г хлорного железа в 94 мл д. в., который подкисляют 1 мл концентрированной H_2SO_4 .

Для приготовления рабочего раствора FeCl_3 к 1 мл основного раствора FeCl_3 прибавляют 90 мл д. в., 8 мл концентрированной H_2SO_4 и 1 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты. Раствор может храниться в темной посуде 2 недели.

Цветной реактив готовят каждый раз перед исследованием, приливая к 30 мл рабочего раствора FeCl_3 20 мл д. в., 1 мл 2,5%-ного раствора диацетилмонооксима и 0,25 мл 0,25%-ного раствора тиосемикарбазида.

Стандартный раствор мочевины (0,42 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Супернатант проростков пшеницы готовят, измельчая и гомогенизируя проростки пшеницы, а затем гомогенат центрифугируют 15 мин при 7000g.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 0,5 мл супернатанта проростков пшеницы и 0,5 мл 10%-ного раствора ТХУ. После перемешивания пробу оставляют на 20 мин, а затем центрифугируют 15 мин при $7 \cdot 10^3 g$. В чистую пробирку отбирают 0,5 мл супернатанта и добавляют 5 мл цветного реактива. После перемешивания пробирку выдерживают в кипящей водяной бане в течение 20 мин и охлаждают до комнатной температуры.

Для проведения измерений необходимо подготовить контрольную и стандартную пробу, которые готовят как опытную пробу, но вместо супернатанта в контрольную пробу вносят 0,5 мл дистиллированной воды, а в стандартную пробу 0,5 мл 7 мМ раствора мочевины. Остальные действия производят как с опытной пробой.

Светопоглощение опытной ($D_{\text{оп}}$) и стандартной ($D_{\text{ст}}$) проб измеряют при 550 нм против контрольной пробы.

Метод расчета. Содержание мочевины в опытной пробе определяют по формуле

$$C_{\text{оп}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}}}{D_{\text{ст}}},$$

где $C_{\text{оп}}$ — содержание мочевины в супернатанте, мг/мл; $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытной пробы; $C_{\text{ст}}$ — содержание мочевины в стандарте, мг/мл; $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение стандартной пробы.

Оформление работы. Записать результаты опыта и раскрыть роль мочевины для роста и развития растений.

4.23. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ ПО МЕТОДУ МЮЛЛЕРА — ЗЕЙФЕРТА

Принцип метода. Фосфорно-вольфрамовый реактив восстанавливается мочевой кислотой с образованием окрашенных продуктов.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; центрифуга.

Посуда: колба Эрленмейера, колба на 1 л — 1 шт.; на 100 мл — 5 шт.; пипетки на 1 мл — 3 шт.; на 2 мл — 3 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; реактив Фолина; 20%-ный раствор ТХУ; основной и рабочий стандартный растворы мочевой кислоты; насыщенный раствор Na_2CO_3 ; 0,5%-ный раствор Li_2CO_3 .

Приготовление рабочих растворов. Реактив Фолина готовят, растворяя 100 г вольфрамата натрия в 750 мл дистиллированной воды в колбе Эрленмейера, и при постоянном помешивании добавляют 80 мл 85%-ный ортофосфорной кислоты. Затем содержимое колбы кипятят с обратным холодильником в течение 4–6 ч, раствор становится бесцветным. Этот раствор переливают в мерную колбу на 1 л и доводят объем раствора д. в. до метки.

Основной стандартный раствор мочевой кислоты (0,2 мг/мл) готовят в мерной колбе на 500 мл, куда вносят 100 мл мочевой кислоты, а затем приливают 25 мл 0,5%-ного раствора Li_2CO_3 и д. в. при растворении мочевой кислоты до метки. При добавлении в раствор 12,5 мл формалина он может храниться в течение месяца.

При проведении исследований используют рабочий стандартный раствор мочевой кислоты, который готовят из основного путем разбавления в 10 раз. Рабочий стандартный раствор (0,02 мг/мл) хранится в течение 2–3 сут.

Супернатант проростков пшеницы готовят, измельчая и гомогенизируя проростки пшеницы, а затем гомогенат центрифугируют 15 мин при 7000g.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 2 мл супернатанта проростков пшеницы и 2 мл 20%-ного раствора ТХУ (опытная проба). После перемешивания пробирку центрифугируют 20 мин при $7 \cdot 10^3 g$. Затем в чистую пробирку отбирают 1,5 мл супернатанта, 0,7 мл насыщенного раствора Na_2CO_3 и 1 каплю раствора Фолина.

В пробирку стандартной пробы вносят 0,5 мл рабочего стандартного раствора (0,02 мг/мл), 0,5 мл 20%-ного раствора ТХУ, 0,5 мл дистиллированной воды, 0,7 мл раствора Na_2CO_3 и 1 каплю реактива Фолина. После перемешивания пробы оставляют на 10 мин и после этого измеряют светопоглощение опытной ($D_{оп}$) и стандартной ($D_{ст}$) проб при 500–560 нм против дистиллированной воды.

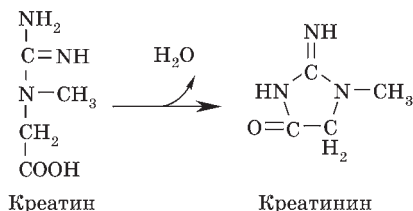
Метод расчета. Содержание мочевой кислоты в опытной пробе определяют по формуле

$$C_{оп} = \frac{D_{оп} \cdot C_{ст}}{D_{ст}}.$$

Оформление работы. Записать результаты опыта и нарисовать формулу мочевой кислоты. Объяснить, в каких метаболических процессах образуется мочева кислота.

4.24. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КРЕАТИНИНА ПО ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ ЯФФЕ

Принцип метода. Креатинин является продуктом распада креатина.



Креатинин определяется по цветной реакции Яффе, в основе которой лежит реакция креатина с пикриновой кислотой с образованием в щелочной среде окрашенных соединений. При этом интенсивность окраски пропорциональна концентрации креатинина.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; водяная баня; центрифуга.

Посуда: колбы на 100 мл — 5 шт.; пипетки на 10 мл — 2 шт.; на 5 мл — 2 шт.; на 2 мл — 1 шт.; на 1 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; 2% -ный раствор пикриновой кислоты; основной и рабочий стандартные растворы креатинина; 10% -ный раствор NaOH; 0,1 М раствор HCl.

Приготовление рабочих растворов. Раствор пикриновой кислоты готовят, растворяя 2 г навески в 98 мл горячей (70–80°C) дистиллированной воды. *Пикриновая кислота очень ядовита и взрывоопасна, поэтому следует с ней обращаться очень осторожно.*

Основной стандартный раствор креатинина (1 мг/мл) готовят на 0,1 М растворе HCl. Хранят при +4°C.

Рабочий стандартный раствор креатинина (0,01 мг/мл) готовят путем растворения основного стандартного раствора дистиллированной водой в 100 раз перед проведением исследований.

Раствор NaOH готовят, растворяя 10 г навески в 90 мл дистиллированной воды.

Супернатант проростков пшеницы готовят, измельчая и гомогенизируя проростки пшеницы, а затем гомогенат центрифугируют 15 мин при 7000g.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 2,0 мл гомогената (супернатанта) растительных тканей и 6 мл 2% -ного раствора пикриновой кислоты. После перемешивания пробу помещают на 15–20 мин в кипящую водяную баню. Затем после охлаждения центрифугируют в течение 15 мин при $7 \cdot 10^3 g$.

В чистую пробирку отбирают 4,0 мл супернатанта и добавляют 0,2 мл 10% -ного раствора NaOH. После перемешивания, если раствор мутнеет, его еще раз центрифугируют.

Осадок отбрасывают и добавляют дистиллированной воды до 10 мл. Через 10 мин измеряют поглощение. Для проведения измерений необходимо приготовить контрольную и стандартную пробы.

В пробирку с контрольной пробой вносят 3,0 мл 2%-ного раствора пикриновой кислоты, 0,2 мл 10%-ного раствора NaOH и дистиллированной воды до 10 мл.

Пробирку со стандартной пробой обрабатывают так же, как и опытную, только вместо гомогената вносят 2,0 мл рабочего стандартного раствора (0,01 мг/мл), пробу не центрифугируют.

Определить содержание креатинина в растительных тканях можно и по калибровочной кривой. Для этого необходимо приготовить 6 пробирок, в которые последовательно вносят 0,4, 0,8, 1,6, 2,4, 3,2 и 4,0 мл рабочего стандартного раствора креатинина. Затем в каждую пробирку по 3,0 мл 2%-ного раствора пикриновой кислоты, 0,2 мл 10%-ного раствора NaOH и дистиллированной воды до 10 мл. После перемешивания в пробирках будет соответствующая концентрация креатинина 0,0004, 0,0008, 0,0016, 0,0024, 0,0032 и 0,0040 мг/мл.

Светопоглощение опытной ($D_{\text{оп}}$) и стандартной ($D_{\text{ст}}$) проб измеряют при 530 нм против контрольной пробы.

Метод расчета. Содержание креатинина (мг/мл) в опытной пробе определяют по формуле

$$C_{\text{оп}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}}}{D_{\text{ст}}}.$$

Оформление работы. Записать результаты опыта, описать механизмы образования креатинина в клетках растений и возможности его накопления в растительных тканях.

4.25. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КРЕАТИНА

Принцип метода. Определение содержания креатина в биологических тканях основано на том, что он способен гидролитическим путем превращаться в креатинин. Для этого креатин нагревают при высокой температуре

в присутствии HCl . Затем, зная исходное количество креатинина в пробе и суммарное его количество, полученное за счет превращения креатина в креатинин, определяют содержание креатина в исследуемой пробе.

Ход определения. В пробирку со шлифом вносят 0,5 мл гомогената (супернатанта) и 0,5 мл 0,5 М раствора HCl . Пробирку закрывают пробкой, помещают в сушильный шкаф на 1–2 ч при 60°C , после этого раствор нейтрализуют 25%-ным NaOH , используя в качестве индикатора рН лакмусовую бумажку. Раствор с нейтральным значением рН используется в исследовании на определение креатинина методом, основанным на реакции Яффе.

Оформление работы. Записать результаты опыта, описать механизмы образования креатина в клетках растений и возможности его накопления в растительных тканях.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие биогенные молекулы называются аминокислотами?
2. Какие протеиновые аминокислоты имеют светопоглощение при 280 нм?
3. Напишите формулы аминокислот, входящих в состав белков.
4. Перечислите основные функции аминокислот.
5. Какие биогенные молекулы называются белками?
6. Дайте определение первичной, вторичной, третичной и четвертичной структур белков.
7. Записать уравнения реакций, которые лежат в основе количественного определения белков биуретовым методом и методом Лоури.
8. Какой метод (биуретовый или Лоури) более чувствителен при количественном определении белков?
9. Перечислить факторы, влияющие на растворимость белков.
10. Рассказать о механизме высаливания белков.
11. Назвать и обосновать механизм действия соединений, используемых при осаждении белков.
12. Написать схему опыта выделения пептидов из тимуса теленка.
13. Рассказать о роли пептидов в регулировании метаболических процессов.
14. Написать схемы опытов выделения и очистки гемоглобина и фибриногена.
15. Расскажите о гемсодержащих белках, участвующих в связывании кислорода.

16. Рассказать о роли гемоглобина в процессе дыхания животных.
17. Раскрыть роль фибриногена в процессе свертываемости крови.
18. Как отделить глобулины от альбуминов в растворе яичного белка?
19. Раскрыть механизм высаливания фибриногена.
20. Назвать методы, с помощью которых можно удалить из раствора белка низкомолекулярные соединения.
21. Описать процессы, протекающие при проведении диализа.
22. Раскрыть роль носителя при проведении гель-фильтрации белков.
23. Каким методом можно определить молекулярную массу гемоглобина?
24. Какие факторы влияют на стабильность белков?
25. Описать процесс денатурации белков.
26. Раскрыть роль кальция в стабилизации белков.
27. Назвать формы азота в окружающей растении среде.
28. Раскрыть роль бактерий в фиксации атмосферного азота.
29. Написать реакцию восстановления нитрата до нитрита, протекающую при участии нитратредуктазы.
30. Описать методы определения нитритов и нитратов в растительных тканях.
31. Написать структурные формулы азотсодержащих органических соединений.
32. Назвать и охарактеризовать процессы, в которых образуются мочевины и мочевая кислота.
33. Описать метаболические процессы, в которых образуются креатин и креатинин.

Основными информационными молекулами живых организмов являются нуклеиновые кислоты, представленные в виде дезоксирибонуклеиновой (ДНК) и рибонуклеиновой (РНК) кислот. В состав нуклеиновых кислот входят пять различных остатков азотистых оснований: аденин, гуанин, цитозин, тимин, урацил, имеющих соответственно буквенное обозначение А, Г, Ц, Т и У. При этом азотистыми основаниями называются низкомолекулярные азотсодержащие гетероциклические соединения, основными структурными элементами которых являются пиримидин и пурин. Соединения, в которых азотистые основания (пурины и пиримидины) связаны N-гликозидной связью с рибозой или дезоксирибозой (аденозин, гуанозин, тимидин, уридин, цитидин), называются нуклеозидами. Фосфорные эфиры нуклеозидов называются нуклеотидами. Например, адениловая кислота (АМФ), гуаниловая кислота (ГМФ), цитидиловая кислота (ЦМФ), уридиловая кислота (УМФ), тимидиловая кислота (ТМФ), а также могут называться как аденозин-5'-монофосфат, гуанозин-5'-монофосфат, цитидин-5'-монофосфат, уридин-5'-монофосфат, тимидин-5'-монофосфат. Штрихом (1', 2', 3', 4' и 5') принято отмечать атомы углерода в составе рибозы и дезоксирибозы, чтобы отличить их от атомов углерода, входящих в состав пуриновых и пиримидиновых оснований. При pH ~ 7,4 свободные нуклеотиды присутствуют в диссоциированной форме, так как рК ОН-групп остатка фосфорной кислоты равны 1,0 и 6,2.

Азотистые основания и моносахарид, входящие в состав РНК и ДНК, определяют их принадлежность. Так, в состав ДНК входят аденин, гуанин, цитозин, тимин и дезоксирибоза, а в РНК вместо тимина присутствует урацил

и дезоксирибозы — рибоза. В составе большинства нуклеиновых кислот обнаружены в небольших количествах также некоторые другие (главным образом метилированные) производные пуринов и пиримидинов (N^6 -метиладенозин, N^2 -метилгуанозин, инозин, ксантин, гипоксантин, 7-метилгуанозин и др.). В ферментативных реакциях в качестве коферментов могут участвовать нуклеотиды, в состав которых входит еще один или два остатка фосфата. Эти соединения называются нуклеозиддифосфаты (АДФ, ГДФ, УДФ, ЦДФ и ТДФ) или нуклеозидтрифосфаты (АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ и ТТФ).

Азотистые основания поглощают свет ультрафиолетовой области спектра с длиной волн 200–300 нм и максимумом около 260 нм.

Нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды — важнейшие биологически активные биополимеры, содержащиеся в каждой клетке всех организмов. Дезоксирибонуклеиновая кислота, или ДНК, локализуемая преимущественно в ядрах, митохондриях и хлоропластах клеток, и рибонуклеиновая, или РНК, находятся главным образом в цитоплазме. В структуре ДНК записана информация о строении, функционировании, поведении и времени жизни живого организма.

Нуклеиновыми кислотами являются высокомолекулярные соединения с молекулярной массой $2,5 \cdot 10^4$ – $4 \cdot 10^9$, основным строительным элементом которых служат нуклеотиды. Цепи нуклеиновых кислот содержат от нескольких десятков до многих тысяч нуклеотидных остатков, расположенных линейно в определенной последовательности, уникальной для данной нуклеиновой кислоты. При этом как РНК, так и ДНК представлены огромным множеством соединений. Индивидуальная линейная последовательность нуклеотидов определяет *первичную структуру* нуклеиновой кислоты, которая образована за счет последовательного связывания нуклеотидов, соединенных между собой за счет фосфодиэфирных связей. В образовании межнауклеотидной связи участвуют гидроксильные группы в 3'- и 5'-положениях остатков углеводов. *Вторичная структура* нуклеиновой кислоты возникает в результате сближения определенных пар азотистых оснований, а именно: три поперечные

водородные связи формируются между гуанином и цитозином ($G \equiv C$) и две — между аденином и тиминном ($A = T$) или ($A = U$) по принципу комплементарности, а также гидрофобных взаимодействий между ними.

Устойчивость структуры ДНК приобретает путем комплементарного и антипараллельного связывания между собой двух полинуклеотидных цепей с помощью водородных связей, образуя правовинтовую спираль вокруг общей оси. ДНК может находиться в *A*-, *B*- и *Z*-формах. Конфигурация двойной спирали ДНК меняется в зависимости от количества воды и ионной силы окружающей среды. У *A*-формы наблюдается некоторое смещение пар оснований от оси молекулы к периферии. *A*- и *B*-формы представляют собой правозакрученную двойную спираль, тогда как *Z*-форма ДНК имеет левозакрученную конфигурацию. Различия в структурах ДНК обуславливают индивидуальность функционирования полинуклеотида. Так, *A*-форма ДНК способна выполнять роль матрицы в процессе транскрипции, а *B*-форма — роль матрицы в процессе репликации.

Таким образом, ДНК представляет собой правильно ориентированную в пространстве спираль, образованную за счет комплементарного расположения двух полинуклеотидных цепей, закрученных друг относительно друга и вокруг общей оси. Диаметр спирали равен 1,8 нм, а длина витка спирали составляет 3,4 нм. Один виток спирали представлен 10 нуклеотидными остатками. Спираль — правозакрученная, а полинуклеотидные цепи в ней антипараллельны. То есть в одной полинуклеотидной цепи фосфодиэфирные связи имеют направление $3' \rightarrow 5'$, а в другой противоположное — $5' \rightarrow 3'$. При этом на каждом из концов молекулы ДНК будут располагаться $5'$ -конец одной и $3'$ -конец другой полинуклеотидной цепи. Углеводно-фосфатные последовательности обращены наружу, а азотистые основания во внутрь структуры ДНК. При этом определенное пространственное расположение двух полинуклеотидных цепей ДНК, комплементарно связанных между собой за счет водородных связей, приобретающих устойчивую структуру, стабилизированную нековалентными связями с белками (гистонами), формирует *третичную структуру ДНК*.

Неоднородность структуры ДНК определяется наличием в ее составе генов, каждый ген имеет два участка: регуляторный и структурный. В состав регуляторного участка входят ген-регулятор, ген-оператор, ген-промотор. При этом ген-регулятор является участком в структуре ДНК, регулирующим активность структурных генов (экспрессию), содержащим и передающим информацию о белке-репрессоре, который выполняет посреднические функции в регулировании активности гена. Белок-репрессор имеет сродство к гену-оператору и обратимо связывается с ним в комплекс, образование которого блокирует процесс синтеза пре-РНК (ядерной РНК). То есть функция белка-репрессора заключается в том, что он регулирует активность структурных генов, ответственных за синтез пре-РНК. При этом на поверхности белковой глобулы белка-репрессора имеется участок, в котором специфически могут связываться низкомолекулярные регуляторные молекулы-индукторы. Рядом с ген-оператором располагается ген-промотор, который служит местом связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы и участвует в регуляции синтеза пре-РНК.

Ген неоднороден по своей структуре и в его составе выделяют оперон (транскриптон), который является элементарной единицей транскрипции, ограниченный промотором и терминатором и участвующий в процессе биосинтеза молекулы пре-РНК у прокариот и эукариот. В структуре оперона различают два участка: информативный и неинформативный.

Совокупность генов, входящих в состав ДНК, называется геномом, а суммарная генетическая информация, содержащаяся в хромосомах, которая получена организмом от предыдущих поколений, — генотипом. При этом в структуре ДНК имеется участок, отделяющий один ген от другого, который называется спейсер (от *англ.* spacer — промежуток). Спейсер не кодирует белки. Участки клеточного генома, в которых закодированы обратные транскриптазы, получили название ретротранспозоны. Тогда как гены, представленные в ДНК в виде нескольких копий и перемещающиеся (мигрирующие элементы ДНК) из одной части генома в другие, называются мобильными

диспергированными генами (МДГ) или транспозонами. Последовательности ДНК, усиливающие транскрипцию при взаимодействии со специфическими белками, называются энхансеры. Сумма всех генов данного вида (заключенных в хромосомах), обеспечивающая возможность выживания вида в данных условиях обитания, проявляет специфичность генофонда живого организма. В случае повреждения структуры ДНК под воздействием различных физико-химических факторов может происходить восстановление поврежденных участков, и этот процесс называется репарация.

Информация об аминокислотных остатках, включенных в первичную структуру белка, закодирована в виде триплетов в первичной структуре ДНК. При этом триплет представлен тремя последовательно соединенными между собой нуклеотидами. Современные аналитические методы позволяют найти в исследуемом биологическом материале небольшой участок генетической информации любого организма среди огромного количества других участков и многократно размножить его — метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод ПЦР основан на принципе естественной репликации ДНК, включающем расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК и комплементарное дополнение обеих. Репликация ДНК может начаться не в любой точке, а только в определенных стартовых блоках — коротких двунитевых участках. Суть метода заключается в том, что, маркировав такими блоками специфический только для данного вида (но не для других видов) участок ДНК, можно многократно воспроизвести (амплифицировать) именно этот участок.

5.1. ВЫДЕЛЕНИЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕО- ПРОТЕИН СЕЛЕЗЕНКИ

Принцип метода. Выделение дезоксирибонуклеопротейна из животных тканей основано на том, что дезоксирибонуклеопротейны нерастворимы в воде, но хорошо растворяются в щелочных и солевых растворах. При нейтрализации

щелочного раствора или при разведении водой солевых растворов дезоксирибонуклеопротеины выпадают в осадок. Обнаружить ДНК в дезоксирибонуклеопротеине можно с помощью качественной реакции на дезоксирибозу. Для этого выделенную ДНК нагревают с дифениламиновым реактивом в кислоте. При этом происходит гидролиз ДНК и освобождение дезоксирибозы, которая дает с дифениловым реактивом синее окрашивание.

Оборудование: аналитические весы; гомогенизатор; водяная баня.

Посуда: пипетки на 0,1 мл — 1 шт., на 1 мл — 3 шт., на 5 мл — 2 шт.; колбы на 100 мл — 4 шт., на 200 мл — 1 шт.; стакан на 100 мл и на 500 мл; воронка; стеклянная палочка; цилиндр.

Материалы и реактивы: селезенка; марля; 5%-ный раствор NaCl; 0,4%-ный раствор NaOH; 10%-ный раствор NaOH; 1%-ный раствор сульфата меди; ледяная уксусная кислота; концентрированная H_2SO_4 .

Приготовление растворов. Растворы NaCl, NaOH и сульфата меди готовят, растворяя соответствующие навески в д. в.

Дифениловый реактив: 1 г дифениламина растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и добавляют 2,75 мл концентрированной H_2SO_4 .

Ход работы. 2 г селезенки разрезают ножницами и растирают на гомогенизаторе, добавляя 5%-ный раствор NaCl в соотношении 1:30 (на 1 г ткани 30 мл 5%-ного раствора NaCl). Гомогенат фильтруют через 4 слоя марли. Затем в стакан на 500 мл наливают 250 мл д. в. и, помешивая стеклянной палочкой, медленно вливают фильтрат. При этом нерастворимый в воде дезоксирибонуклеопrotein должен выпасть в осадок. Нити дезоксирибонуклеопroteина наматывают в виде комка на стеклянную палочку. Собранный таким образом дезоксирибонуклеопrotein вынимают и переносят в пробирку с 4 мл 0,4%-ного NaOH, полностью растворяя дезоксирибонуклеопrotein в щелочи.

Для обнаружения ДНК в пробирку вносят 0,5 мл раствора ДНК, добавляют 1 мл дифенилового реактива и после перемешивания пробирку помещают на 10 мин в кипящую

водяную баню. Раствор должен окраситься в синий цвет, что обусловлено реакцией дифениламина с дезоксирибозой.

Содержание белков определяют по биуретовой реакции. К 0,5 мл раствора дезоксирибонуклеопротеина добавляют 0,5 мл 10% -ного NaOH и 0,1 мл 1% -ного раствора сульфата меди. Раствор должен окраситься в сине-фиолетовый цвет.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и результаты качественных реакций.

5.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ

Принцип метода. Щелочной гидролиз тканевых препаратов проводят без предварительного выделения нуклеиновых кислот и удаления свободных нуклеотидов. Для выделения препаратов ДНК и освобождения их от белков используют насыщенный раствор NaCl, содержащий 20% -ную уксусную кислоту. После отделения белков ДНК осаждают спиртом.

Оборудование: аналитические весы; гомогенизатор; водяная баня; штатив,

Посуда: пипетки на 1 мл — 2 шт., на 5 мл — 2 шт.; колбы на 100 мл — 4 шт.; стакан; пробирки.

Материалы и реактивы: ткань животных; 1 М раствор NaOH; насыщенный раствор NaCl, приготовленный на 20% -ной уксусной кислоте; 0,5 М раствор HClO_4 ; 96% -ный этиловый спирт; ледяная уксусная кислота.

Приготовление растворов. Насыщенный раствор хлорида натрия готовят, добавляя NaCl до насыщения к 20% -ному раствору CH_3COOH .

Все остальные растворы готовят на д. в.

Ход работы. 100 мг ткани помещают в центрифужную пробирку с 1 мл 1 М раствором NaOH и при помешивании нагревают 5 мин в кипящей водяной бане. Затем пробирку охлаждают и добавляют 0,5 мл насыщенного раствора NaCl, содержащего 20% -ную уксусную кислоту. Через 5 мин раствор центрифугируют 10 мин при 600g (4°C), удаляя выпавший в осадок белок. Супернатант сливают в стакан, а осадок растворяют при 0°C в 1 мл 1 М раствора NaOH. После

этого белок еще раз осаждают добавлением 0,5 мл насыщенного раствора NaCl, содержащего 20%-ную уксусную кислоту. Раствор центрифугируют 10 мин при 600g (4°C) и супернатанты объединяют. Затем в стакан с супернатантом приливают охлажденный до 0°C 96%-ный этиловый спирт в соотношении 1:3 (на 1 мл супернатанта добавляют 3 мл 96%-ного этилового спирта). После перемешивания раствор оставляют при 4°C на 2 ч, а затем центрифугируют 10 мин при 600g. К осадку добавляют 5 мл 0,5 М раствора HClO₄. Пробирки закрывают пробками с воздушными холодильниками и помещают на 20 мин в кипящую водяную баню. Гидролизат ДНК охлаждают и используют для аналитических исследований.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и определить наличие ДНК в опытной пробе по реакции с дифенилом. Образец сохранить для следующих опытов.

5.3. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ДНК С ПОМОЩЬЮ ДИФЕНИЛАМИНА

Принцип метода. В составе ДНК присутствует моносахарид дезоксирибоза, которая при реакции с дифениламином (C₆H₅—NH—C₆H₅) окрашивает ДНК в синий цвет, тогда как при реакции с рибозой РНК раствор приобретает зеленую окраску.

Оборудование: ФЭК; водяная баня.

Посуда: колба на 25 мл; пипетки на 1 мл — 3 шт.

Материалы и реактивы: осадок ДНК; дифениламино-
вый реактив; 1 М раствор NaOH; раствор ДНК (200 мкг/мл).

Приготовление рабочих растворов. *Дифениламино-
реактив* готовят, растворяя 1 г дифениламина в ледяной уксусной кислоте, с добавлением 2,75 мл H₂SO₄ (концентрированная); раствор NaOH (40 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Построение калибровочного графика. В 3 пробирки последовательно вносят по 1 мл раствора ДНК с различной концентрацией (50, 100 и 200 мкг/мл) и по 2 мл дифенилового реактива. После перемешивания пробирки помещают на 10 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения

измеряют светопоглощение проб на ФЭКе при 605–730 нм, против д. в. Результаты записывают в таблицу 5.1.

Таблица 5.1

Данные к построению калибровочного графика для определения содержания ДНК

Пробирки	Концентрация ДНК, мкг/мл	Светопоглощение D , усл. ед.
1	50	
2	100	
3	200	

Ход работы. Перед началом исследований небольшое количество полученной в предыдущем опыте ДНК растворяют в 1 мл 1 М NaOH, а затем добавляют равный объем дифениламинового реактива. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 15–20 мин. После охлаждения измеряют светопоглощение на ФЭКе при 605–730 нм против д. в.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта, построить калибровочный график и определить содержание ДНК в исследуемой пробе. Нарисовать фрагмент третичной структуры ДНК.

5.4. МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Принцип метода. Метод основан на том, что при добавлении к обработанной щелочью ткани насыщенного раствора натрия хлор в уксусной кислоте белки выпадают в осадок, а ДНК и другие соединения остаются в растворе. ДНК отделяют от других соединений путем осаждения ее спиртом, с последующим промыванием осадка трихлоруксусной кислотой.

Оборудование: центрифуга; водяная баня; гомогенизатор или фарфоровая ступка.

Посуда: колбы мерные на 100 мл — 4 шт.; пробирки на 5 мл — 3 шт.

Материалы и реактивы: побеги зерновок пшеницы; 1 М NaOH, 1 М NaCl в 20%-ной CH_3COOH , 96%-ный этиловый спирт, 5%-ная трихлоруксусная кислота.

Приготовление рабочих растворов. Раствор 1 М NaOH готовят, растворяя 4 г навески в 100 мл д. в.; раствор 1 М NaCl готовят, растворяя 5,85 г навески в 100 мл 20%-ного раствора уксусной кислоты.

Ход определения. Навеска растительной ткани (1–2 г) предварительно измельчается ножницами и затем растирается в ступке, прибавляя 2 мл 1 М NaOH. После этого раствор сливают в пробирку, которую ставят на кипящую водяную баню на 15 мин, периодически перемешивая ее содержимое. После охлаждения пробы для осаждения белков приливают 1 мл 1 М NaCl в 20%-ной CH_3COOH и через 5–10 мин центрифугируют в течение 5 мин при 5000g. После отделения супернатанта к нему приливают 10 мл 96%-ного этилового спирта и ставят на 1 ч в холодильник при -20°C . При этом ДНК должна выпасть в осадок, а РНК — находиться в растворе. Пробирку еще раз центрифугируют 5 мин при 5000g. Осадок ДНК промывают 5%-ной трихлоруксусной кислотой.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и определить наличие ДНК в опытной пробе по реакции с дифенилом. Образец сохранить для следующих опытов.

5.5. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК И ДНК ФЕНОЛЬНЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Под действием водонасыщенного фенола нуклеопроотеиды депротеинизируют, что позволяет при различных pH отделить ДНК от РНК. Кроме того, фенол способствует выделению нуклеиновых кислот в нативном виде, так как подавляет действие нуклеаз.

Оборудование: холодная комната, гомогенизатор, центрифуга, холодильник, ножницы.

Посуда: колба Вюрца; делительная воронка; стаканы на 500 мл — 6 шт.; колбы на 100 мл — 3 шт., на 500 мл — 2 шт.; пипетка на 5 мл — 1 шт.; стеклянная палочка; цилиндр; чашка Петри.

Материалы и реактивы: ткань (печень, мозг, селезенка и др.); фильтровальная бумага; 0,14 М раствор NaCl; фенол pH 6,0; фенол с pH 8,3; абсолютный этиловый спирт; этиловый эфир; ледяная уксусная кислота.

Приготовление растворов. Раствор 0,05 М цитрата натрия (13,0 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в. Раствор 0,14 М NaCl (8,19 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,05 М растворе цитрата натрия.

Этиловый эфир готовят к исследованиям, добавляя в 100 мл эфира 0,3–0,4 мл ледяной уксусной кислоты.

Раствор 1 М NaOH (40 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Фенол готовят, внося в колбу Вюрца 88 г фенола, 12 мл д. в., 100 мг алюминиевых стружек и 50 мг NaHCO_3 . Затем фенол перегоняют на песчаной или масляной бане, собирают фракцию, кипящую при 183°C. Перегнанный фенол помещают в делительную воронку, приливают равный объем д. в., тщательно встряхивают и оставляют на несколько часов. После расслоения жидкостей слой фенола осторожно сливают в сухую склянку, доводя до pH 6,0 или 8,3 с помощью 1 М NaOH.

Ход работы. 20 г животной ткани (печень, мозг, селезенка и др.) измельчают ножницами и гомогенизируют в 10-кратном объеме 0,14 М NaCl до однородной массы. Гомогенат фильтруют через 2 слоя марли и к фильтрату добавляют равный объем фенола pH 6,0. Смесь интенсивно встряхивают в колбе с притертой пробкой или в делительной воронке в течение 40 мин, а затем центрифугируют 30 мин при 600g (0°C). Содержимое центрифужного стакана должноделиться на 3 слоя. В верхнем слое должна содержаться РНК, в среднем — ДНК и нерастворимые в феноле белки, а в нижнем — белки, растворимые в феноле. Осторожно, с помощью пипетки или шприца, отсасывают содержимое каждого слоя в отдельные стаканы. После этого повторно обрабатывают только средний слой, к которому добавляют 5-кратный объем NaCl и фенола. Смесь интенсивно встряхивают и центрифугируют. Затем каждый слой отделяют и добавляют в соответствующий стакан. Стакан с нижним слоем, содержащий фенол, отбрасывают.

Выделение РНК. К водному раствору, содержащему РНК, добавляют для дополнительной депротеинизации

фенол рН 6,0 в соотношении 1:0,5 (на 1 мл раствора 0,5 мл фенола). Затем смесь интенсивно встряхивают 20 мин и центрифугируют 30 мин при 600g. Отделяют верхний слой, к которому добавляют трехкратный объем охлажденного до 0°C абсолютного этилового спирта и оставляют на 1 ч при 0°C. В осадке присутствует РНК, которую отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 3000g.

Осадок с РНК растворяют в небольшом объеме д. в., а затем еще раз центрифугируют 10 мин при 3000g. Препарат разливают на порции и хранят в замороженном состоянии. В полученном препарате содержатся высоко- и низкомолекулярные фракции РНК.

Выделение ДНК. К среднему слою, полученному после повторной обработки фенолом рН 6,0, добавляют водонасыщенный фенол рН 8,3 в количестве, равном первоначально взятому (на 1 г ткани 10 мл фенола). Встряхивают несколько минут, добавляют равный объем воды и перемешивают 30–40 мин не очень интенсивно (круговыми движениями). Затем препарат помещают в холодильник при 4°C на 15–18 ч и центрифугируют 30 мин при 600g (0°C). В супернатанте образуются три слоя. Верхний, водный слой, содержащий ДНК, осторожно отделяют, а промежуточный и нижний слои встряхивают повторно со 100 мл 0,14 М NaCl. После центрифугирования водный слой объединяют с полученным ранее.

ДНК из водного раствора осаждают этанолом. При этом нуклеопротеид выпадает в осадок в виде нитей. Для дальнейшей очистки ДНК переосаждают абсолютным этиловым спиртом из 0,14 М NaCl. Для этого нити ДНК наматывают на стеклянную палочку, подсушивают фильтровальной бумагой и переносят в раствор с NaCl. После растворения ДНК вновь осаждают 2–2,5 объемами абсолютного этанола, выдерживают при 4°C в течение 1 ч, а затем центрифугируют 30 мин при 600g (0°C). Осадок промывают абсолютным этиловым спиртом, этиловым эфиром и высушивают в вакуум-эксикаторе.

Оформление работы. Записать условия очистки РНК и ДНК, определить чистоту препаратов.

5.6. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ ПЕЧЕНИ (ПО ШЕРРЕРУ)

Принцип метода. При обработке гомогенатов печени водонасыщенным фенолом РНК переходит в водный слой. Для повышения выхода РНК используют додецилсульфат натрия, который еще может ингибировать, и активность рибонуклеаз, обеспечивая сохранность нуклеотида. Специфичность методики выделения РНК достигается тем, что экстракцию проводят фенолом рН 6,0 и при 60°C. В этих условиях не происходит экстракции ДНК.

Оборудование: гомогенизатор; ножницы; центрифуга; водяная баня; криотермостат.

Посуда: колбы на 500 мл — 4 шт.; колба Вюрца; делительная воронка; стаканы на 500 мл — 2 шт.; колбы на 100 мл — 1 шт., пипетка на 5 мл — 1 шт.; стеклянная палочка; цилиндр; чашка Петри.

Материалы и реактивы: печень; 0,01 М Na-ацетатный буфер, рН 5,1, содержащий 0,5% -ный додецилсульфат натрия; фенол рН 6,0; абсолютный этиловый спирт; 1 М раствор HClO_4 .

Приготовление растворов. Буферный раствор готовят из исходных 0,01 М растворов CH_3COOH и CH_3COONa путем их смешивания на рН-метре до рН 5,1, добавляя додецилсульфат натрия.

Раствор 1 М NaOH (40 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Фенол водонасыщенный, рН 6,0 готовят, как описано выше.

Ход работы. Печень (10 г) промывают от крови охлажденным буфером, измельчают ножницами, гомогенизируют на холоде с 8-кратным объемом 0,01 М Na-ацетатный буфер, рН 5,1. К суспензии добавляют равный объем фенола, закрывают колбу притертой пробкой и встряхивают 5 мин в водяной бане при 60°C. Затем колбу помещают в сосуд со льдом, и после охлаждения смесь центрифугируют 30 мин при 600g. Смесь в центрифужном стакане должна разделиться на три слоя: водный, промежуточный и фенольный. Верхний слой отделяют, в нем должна быть

РНК, а промежуточный и фенольный слои отбрасывают. К водному слою добавляют равный объем фенола и повторяют встряхивание. После центрифугирования водный слой отбирают и добавляют к нему тройной объем абсолютного этанола. Перемешивают и оставляют при 0°C на 15–18 ч.

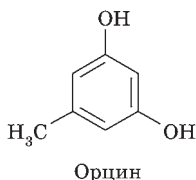
Осадок РНК отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 3000g. Осадок растворяют в небольшом объеме 0,01 М Na-ацетатного буфера (рН 5,1) и снова осаждают РНК тройным объемом охлажденного абсолютного этилового спирта. Раствор выдерживают 2 ч при –10°C или 18 ч при 0°C. Выпавший осадок отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 3000g, а затем растворяют в небольшом объеме 0,01 М Na-ацетатного буфера (рН 5,1). Препарат РНК хранят в замороженном состоянии.

Для определения содержания РНК в растворе к нему добавляют д. в. до 1,5 мл и после перемешивания вносят равный объем 1 М HClO₄. Гидролиз РНК проводят в течение 30 мин на кипящей водяной бане. Содержание РНК определяют спектрофотометрически и по реакции с орцином.

Оформление работы. Записать условия очистки РНК, определить чистоту препарата.

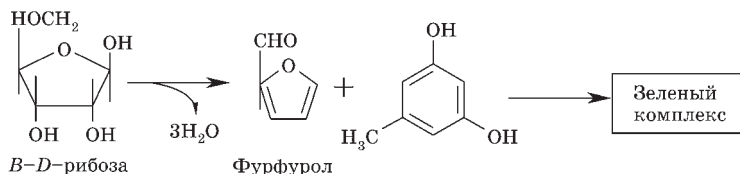
5.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ РНК С ОРЦИНОМ (ПО МЕЙБАУМ)

Принцип метода. Метод основан на реакции рибозы, входящей в состав РНК, с орцином (3,5-дигидрокситолуин, 5-метилрезорцин).



В результате гидролиза РНК в среде накапливается рибоза, которая при высокой температуре в присутствии

соляной кислоты подвергается дегидротации с образованием фурфурола. Последний дает зеленую окраску при конденсации с орцином.



Оборудование: аналитические весы; ФЭК или спектрофотометр; водяная баня.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетки на 2 мл — 3 шт.

Материалы и реактивы: раствор РНК; 38%-ная (12,5 М) HCl ($\rho = 1,190 \text{ г/см}^3$); 0,1%-ный раствор FeCl₃; 0,04 М раствор орцина; раствор РНК; 0,5 М раствор HClO₄;

Приготовление растворов. Раствор FeCl₃ готовят, растворяя 1 г навески в 83,2 мл 38%-ной HCl.

Раствор орцина (5 мг/мл) готовят, растворяя навеску безводного орцина в 0,1%-ном растворе FeCl₃.

Стандартный раствор РНК (0,1 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,5 М HClO₄, и раствор кипятят в течение 15 мин.

Построение калибровочного графика. К 2 мл раствора, содержащего от 10 до 100 мкг РНК, добавляют 2 мл раствора орцина, перемешивают и нагревают 20 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения пробы измеряют на ФЭКе светопоглощение раствора при 670 нм.

Ход работы. К 2 мл исследуемой пробы добавляют 2 мл раствора орцина, перемешивают и нагревают 20 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения пробы измеряют на ФЭКе светопоглощение раствора при 670 нм.

Метод расчета. Содержание РНК (мг/мл) определяют, используя калибровочный график, построенный по стандартному раствору РНК.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и определить содержание РНК в исследуемой пробе.

5.8. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК РИБОСОМ ИЗ ПЕЧЕНИ

Принцип метода. Экстракцию РНК из рибосом проводят методом фенольной депротеинизации в присутствии одного из ингибиторов РНКаз (гепарина, диэтилпироскарбоната или поливинилсульфата).

Оборудование: холодная комната; гомогенизатор; центрифуга; ультрацентрифуга; криотермостат; ножницы.

Посуда: колба Вюрца; делительная воронка; стаканы на 500 мл — 6 шт.; колбы на 100 мл — 3 шт., на 500 мл — 7 шт.; пипетка на 5 мл — 1 шт.; цилиндр; чашка Петри.

Материалы и реактивы: печень; 0,1 М и 0,01 М *трис*-HCl буфер, pH 7,6; $MgCl_2$; сахароза; KCl; фенол pH 6,5; хлороформ; этиловый эфир; абсолютный этиловый спирт; гепарин; 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0.

Приготовление растворов. *Трис*-HCl буферный раствор готовят из исходных 0,1 М растворов триса и HCl путем их смешивания на pH-метре до pH 7,6.

Na-ацетатный буферный раствор готовят из исходных 0,1 М растворов CH_3COOH и CH_3COONa путем их смешивания на pH-метре до pH 5,0.

Раствор 1 М NaOH (40 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Фенол водонасыщенный, pH 6,5, готовят, как описано выше.

Среда выделения 1: 0,01 М *трис*-HCl буфер (pH 7,6), 0,02 М $MgCl_2$ (1,9 мг/мл) и 0,05 М сахароза (17,2 мг/мл).

Среда выделения 2: 0,1 М *трис*-HCl буфер (pH 7,6), 0,001 М $MgCl_2$ (95,21 мкг/мл).

Смесь хлороформа с этиловым эфиром готовят в соотношении 1:1.

Получение рибосом. Навеску печени (10 г) измельчают ножницами и гомогенизируют до однородной массы с добавлением среды выделения 1 в соотношении 1:5 (на 1 г печени 5 мл среды выделения). Гомогенат центрифугируют 30 мин при 18 000g (0°C). Супернатант сливают в колбу, а осадок суспендируют в таком же объеме среды выделения и повторяют гомогенизацию. Гомогенат вновь центрифугируют

и супернатанты объединяют. Объединенный супернатант центрифугируют 90 мин при 105 000g. Осадок рибосом суспендируют в среде выделения 2, содержащей 0,1 М *трис*-HCl буфер (pH 7,6) и 0,001 М MgCl₂. Если суспензия мутная, ее центрифугируют 15 мин при 18 000g.

Ход работы. К суспензии рибосом добавляют ингибитор РНКаз гепарин из расчета 0,5 мг на 1 мл и равный объем фенола. Смесь встряхивают 30 мин и центрифугируют 30 мин при 600g (0°C). Осторожно удаляют верхний слой и добавляют к нему снова фенол в соотношении 1:0,5 (на 1 мл супернатанта 0,5 мл фенола). После интенсивного встряхивания и центрифугирования водный слой переносят в делительную воронку и добавляют равный объем смеси хлороформа с этиловым эфиром. После встряхивания и отстаивания собирают водный слой и осаждают из него РНК 3-кратным объемом охлажденного абсолютного этилового спирта. Раствор оставляют на несколько часов при -20°C. Осадок рибосомной РНК отделяют центрифугированием в течение 30 мин при 3000g (0°C), растворяют в небольшом объеме 0,1 М Na-ацетатного буфера (pH 5,0) и повторно осаждают спиртом. Осадок рибосомной РНК, полученный после центрифугирования, высушивают и хранят в этаноле при -20°C.

Оформление работы. Записать условия очистки РНК рибосом печени, определить чистоту препарата.

5.9. ГИДРОЛИЗ ДНК

Принцип метода. Под действием серной кислоты при высокой температуре белок и дезоксирибонуклеиновая кислота подвергаются гидролитическому распаду на первичные составные части. ДНК расщепляется до азотистых оснований, дезоксирибозы и фосфорной кислоты, а белок — до пептидов и аминокислот.

Оборудование: водяная баня.

Посуда: колбочка на 25 мл; цилиндр на 25 мл.

Материалы и реактивы: осадок ДНК; 5%-ная серная кислота.

Приготовление рабочих растворов. Раствор 5%-ной H₂SO₄ готовят, разбавляя концентрированную серную кис-

лоту д. в. Серную кислоту нужно очень осторожно, малыми порциями, добавлять к воде.

Ход определения. Осадок, содержащий ДНК переносят в колбочку для гидролиза и добавляют 15 мл 5%-ной серной кислоты. После закрытия колбочки пробкой ее помещают в кипящую водяную баню на 1 ч. После охлаждения, полученный гидролизат можно использовать для изучения качественного и количественного состава основных компонентов ДНК.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и описать продукты гидролиза ДНК. Написать формулы нуклеотидов. Образец сохранить для следующего опыта.

5.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (ПО А. С. СПИРИНУ)

Принцип метода. Количественное определение нуклеиновых кислот основано на экстракции их из биологического материала и удаления свободных нуклеотидов. Затем опытный образец обрабатывают горячей хлорной кислотой, что обеспечивает количественную экстракцию нуклеиновых кислот из исследуемого материала и их кислотный гидролиз до растворимых фрагментов. Поглощение гидролизатов исследуют на спектрофотометре при 270 и 290 нм.

Оборудование: гомогенизатор; спектрофотометр; центрифуга; водяная баня; холодильник.

Посуда: колбы на 100 мл — 2 шт.

Материалы и реактивы: ткань; 60%-ная (9,2 М) хлорная кислота ($\rho = 1,540 \text{ г/см}^3$); 0,2 и 0,5 М растворы HClO_4 .

Приготовление растворов. 0,2 и 0,5 М растворы HClO_4 готовят, растворяя соответствующие объемы исходной хлорной кислоты в д. в.

Ход работы. Навеску ткани (100–200 мг) измельчают ножницами и гомогенизируют до однородной массы, добавляют 10 мл охлажденного 0,2 М раствора HClO_4 . После тщательного перемешивания смесь центрифугируют 10 мин при 3000g. Супернатант отбрасывают, а осадок повторно отмывают раствором хлорной кислоты и центрифугируют.

К осадку добавляют 10 мл 0,5 М раствора HClO_4 . После перемешивания и растворения осадка раствор нагревают 30 мин на кипящей водяной бане. Гидролизаты охлаждают и центрифугируют. Осадок растворяют в 0,5 М растворе HClO_4 . Гидролизаты объединяют и измеряют светопоглощение растворов на спектрофотометре при 270 и 290 нм против раствора 0,5 М HClO_4 .

Метод расчета. Рассчитывают содержание фосфора (мкг/мл) нуклеиновых кислот в 1 мл исследуемого раствора по формуле

$$C_{\text{фн}} = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19} B,$$

где D_{270} и D_{290} — светопоглощение раствора при 270 и 290 нм, усл. ед.; 0,19 — значение, которое имеет гидролизат нуклеиновых кислот, содержащий 1 мкг нуклеинового фосфора в 1 мл раствора; B — коэффициент разбавления.

Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество нуклеиновых кислоты (мкг/мл) используют следующую формулу:

$$C_{\text{нк}} = C_{\text{фн}} \cdot 10,3,$$

где 10,3 — средний пересчетный коэффициент.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и определить общее содержание нуклеиновых кислот в исследуемой пробе.

5.11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПУРИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

Принцип метода. Серебро образует с пуриновыми основаниями ДНК в гидролизате комплексы, которые выпадают на дно пробирки в виде осадка.

Посуда: мерная колба на 100 мл; пробирки.

Материалы и реактивы: гидролизат ДНК; аммиак (концентрированный), аммиачный раствор серебра.

Приготовление рабочих растворов. 3 г нитрата серебра растворяют в 50 мл д. в., затем к этому раствору прибавляют 50 мл 10% -ного раствора аммиака.

Ход определения. В пробирку наливают 2 мл гидролизата ДНК, добавляют 5–6 капель концентрированного аммиака до щелочной реакции на лакмус. Затем приливают 0,5 мл аммиачного раствора серебра. После перемешивания образуется хлопьевидный осадок пуриновых оснований с солями серебра, который оседает на дно пробирки.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта. Написать структурные формулы азотистых оснований, входящих в состав ДНК.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие биогенные молекулы называются нуклеиновыми кислотами?

2. Рассказать о строении нуклеозидов и нуклеотидов.

3. Рассказать о роли ДНК и РНК в системе управления живыми организмами.

4. Какие методы позволяют выделять ДНК?

5. Написать схему опыта выделения ДНК из животных тканей.

6. Рассказать об особенностях метода определения ДНК с помощью дифениламина.

7. Написать схему опыта выделения ДНК из растительных тканей.

8. Рассказать об использовании водонасыщенного фенола для выделения нуклеопротеидов.

9. Описать строение и механизм действия молекул РНК.

10. Написать схему опыта выделения РНК из животных тканей.

11. Написать структурную формулу орцина и описать методику его использования для определения РНК.

12. Назвать продукты гидролиза ДНК и условия его проведения.

13. Написать структурные формулы пуриновых и пиримидиновых оснований, входящих в структуру ДНК.

ГЛАВА 6 ЭЛЕМЕНТЫ

Для нормального роста и развития живым организмам требуются различные элементы, которые входят в состав биогенных соединений. К базовым элементам организмов относятся углерод (С), водород (Н), кислород (О) и азот (N). Они составляют более 95% сухой массы растительных тканей. Остальные элементы можно условно разделить на две группы — макро- и микроэлементы. К макроэлементам относят элементы живых организмов, присутствующие в высоких концентрациях (более 1 мМ), обладающих индивидуальным действием или входящих в состав биогенных молекул. Макроэлементы в основном представлены ионами K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , а также Si и P. Микроэлементами являются элементы живых организмов, присутствующие в низких концентрациях (менее 1 мМ), проявляющие действие в составе функциональных белков или низкомолекулярных соединений (витаминов, гормонов и субстратов ферментативных реакций). К микроэлементам относятся ионы Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , F^- , Br^- , I^- , Se^{2+} , Cr^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} и др.

Преимущественным местом накопления калия служит цитоплазма растительной и животной клетки. Ионы K^+ совместно с ионами Na^+ и Cl^- поддерживают кислотно-щелочной баланс, а также регулируют осмотическое давление клеток, участвуют в создании трансмембранного потенциала. Больше всего калий накапливается в активно растущих частях растения, обеспечивая поступление в клетку различных питательных соединений. Калий обеспечивает работу аппарата, открывающего и закрывающего устьица.

Магний в основном накапливается в активно растущих частях растений. Присутствует в растительных тканях

в виде ионов Mg^{2+} . Ионы магния связываются с АТФ с образованием комплексов Mg^{2+} -АТФ, активируют ДНК- и РНК-полимеразу, полинуклеотидфосфорилазу, нуклеотидазу, рибонуклеазу, дезоксирибонуклеазу и другие ферменты нуклеинового обмена, а также гексокиназу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу и др.

Ионы Mn^{2+} входят в состав пируваткарбоксилазы и оксалацетаткарбоксилазы. Активирует аргиназу, которая катализирует реакцию образования мочевины из аргинина. Марганец участвует в катализе глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, аминоксилотрансферазы, изоцитратдегидрогеназы, фосфодиэстеразы и др.

Кальций присутствует в растительном организме в виде солей фосфорной кислоты. Накапливается кальций в митохондриях, хлоропластах и ядре. В семенах ионы кальция присутствуют в составе инозитфосфорной кислоты. Кальций участвует в формировании четвертичной структуры белков, способствует образованию мостиков в фермент-субстратных комплексах, оказывает влияние на активность аллостерических ферментов. Присутствие ионов Ca^{2+} в составе белков повышает их стабильность к высоким температурам.

Азот входит в состав аминокислот, белков, азотистых оснований, нуклеиновых кислот, витаминов, коферментов и других биогенных соединений. Растения способны усваивать азот только в виде ионов аммония и нитратов.

Фосфор в составе неорганических соединений представлен в виде остатков ортофосфорной кислоты, которые переносятся в процессе фосфорилирования и трансфосфорилирования на различные органические соединения, с образованием фосфорилированных форм биогенных соединений (АМФ, АДФ, АТФ, цАМФ, креатинфосфат, НАД, ФАД, НАДФ, HS-КоА, ТПФ, ФП и др.). Фосфор входит в состав структурной части РНК и ДНК.

Сера содержится в растительных тканях в виде анионов SO_4^{2-} . Входит в состав, серосодержащих аминокислот (метионина, цистеина), трипептида глутатиона. Сера является компонентом витаминов B_1 (тиамин) и Н (биотина), а также обнаруживается в составе HS-КоА, таурина, S-аденозилметионина. В белках сера принимает участие

в формировании SH-групп и дисульфидных ($-S-S-$) связей. Последняя стабилизирует третичную структуру белков.

Цинк присутствует в растительных тканях в виде ионов Zn^{2+} . Входит в состав ключевых ферментов метаболических процессов карбоангидразы, фосфоглицеринальдегиддегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы, тимидинкиназы, РНК- и ДНК-полимераз и др.

Молибден входит в состав ксантиноксидазы, ксантиндегидрогеназы, нитратредуктазы, нитрогеназы, сульфитоксидазы и альдегидоксидазы. Располагаясь в активном центре фермента, атом молибдена образует связь с серой, принадлежащей остатку цистеина. Кофактором молибденсодержащих ферментов служит флавиновая группа. Для растений молибден имеет наибольшую значимость в составе ферментов азотного обмена.

Железо в растительном организме находится в виде восстановленной Fe^{2+} или окисленной Fe^{3+} форме. Входит в состав железосодержащих белков и ферментов (ферритин, пероксидаза, каталаза, цитохром-с-пероксидаза, цитохромоксидаза и др.), проявляющих действие при наличии окисленной формы. Причем все гемсодержащие белки обладают пероксидазной активностью. Железо в составе протопорфирина IX принимает участие в окислительно-восстановительных реакциях фотосинтетического и окислительного фосфорилирования в составе цитохромов и ферридоксина.

Медь содержится в растительных тканях в форме иона Cu^{2+} . Особенно много ее накапливается в семенах и активно растущих частях растения. Входит в состав медьсодержащих белков и ферментов (аскорбатоксидаза, ортодифенолоксидаза, лакказа, галактозооксидаза, тиразиноксидаза, цитохромоксидаза и др.).

Кобальт входит в состав трансфераз, изомераз и дипептидазы. Ускоряет протекание ферментативной реакции с участием пируваткарбоксилазы, рибофлавинкиназы, щелочной фосфатазы, аргиназы, каталазы, альдолазы и др.

В растительных тканях кремний входит в состав полиуронидов (пектиновой и альгиновой кислот). На одну молекулу пектина цитрусовых приходится от 10 до 20 атомов кремния.

Для определения элементов предварительно проводят озоление растительных или животных тканей. Под действием высокой температуры ткани растений и животных разрушаются. При этом углерод, водород, азот и частично кислород улетучиваются и в остатке остаются лишь нелетучие соединения, основу которых составляют макро- и микроэлементы. Содержание и состав зольных элементов растительных и животных тканей зависят от вида, а также природно-климатических условий роста и развития растений и животных. Кроме того, концентрация элементов в разных тканях одного и того же растения и животного может существенно отличаться.

Качественный и количественный состав зольных элементов определяется с помощью различных видов спектроскопии. Для определения отдельных элементов разработаны методы спектрофотометрического анализа, в основе которого — взаимодействие элемента с реагентом. В результате образуется комплекс, который приобретает окраску. При этом интенсивность окраски пропорциональна концентрации элемента.

Однако в настоящее время широкое применение в исследовании элементов нашли методы эмиссионной фотометрии пламени (ЭФП) и атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС). Так, эмиссионная фотометрия пламени используется как метод количественного элементного анализа, основанного на измерении интенсивности электромагнитного излучения, испускаемого атомным паром определенного элемента в пламени. Применяется при определении щелочных элементов — лития, натрия, калия и рубидия, которые благодаря низким значениям энергии возбуждения имеют в спектрах резонансные линии в видимой области спектра. Кроме того, хорошими метрологическими характеристиками в пламени ацетилен — воздух обладают еще и щелочноземельные элементы — магний, кальций, стронций и барий. Применение ЭФП для определения других элементов признается нецелесообразным из-за высоких пределов обнаружения и наличия спектральных и химических помех.

Метод атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) используется как метод количественного элементного анализа,

основанного на измерении поглощения атомным паром монокроматического излучения, энергия кванта которого соответствует резонансному переходу в атомах определенного элемента. С помощью метода ААС можно количественно определить в растениях до 70 элементов. При этом пределы обнаружения находятся в интервале 1–100 нг/мл.

6.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ (ПО А. Т. УСОВИЧУ)

Принцип метода. При проведении мокрого озолирования, азотсодержащие биогенные молекулы окисляются. Одним из продуктов реакции является аммиак, который в дальнейшем реагирует с молекулами серной кислоты с образованием сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Для обнаружения аммиачного азота используют реактив Несслера, в присутствии которого образуется йодистый меркураммоний, придающий раствору желтую окраску. Интенсивность окраски зависит от содержания солей аммония. Измерение светопоглощения раствора производят на ФЭКе при 530 нм.

Кроме того, для предотвращения выпадения в осадок соединений кальция и магния при подщелачивании в раствор добавляют сегнетову соль ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), которая связывает ионы кальция и магния в комплексные соединения.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; аналитические весы; ножницы.

Посуда: пипетки на 1 мл — 1 шт., на 2 мл — 1 шт., на 5 мл — 3 шт., 10 мл — 2 шт.; колбы на 100 мл — 11 шт., на 1 л — 2 шт.; банка из темного стекла — 1 шт.; колба Кьельдаля на 250 мл — 1 шт.; цилиндр на 100 мл — 2 шт.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы, конц- H_2SO_4 ($\rho = 1,84$), 30% -ный раствор H_2O_2 , 25% -ный раствор сегнетовой соли, реактив Несслера, 1 М раствор NaOH , NH_4Cl , CaCl_2 , MgSO_4 , $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, HgI_2 , KI , KOH .

Приготовление растворов. *Раствор А:* 0,6 г $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 0,2 г MgSO_4 растворяют в мерной колбе на 100 мл. *Раствор Б:* 10 мл раствора А и 8 мл конц- H_2SO_4 вносят в мерную колбу на 100 мл и доливают б. в.

Реактив Несслера: 1) 10 г HgI_2 и 5 г KI растворяют в 50 мл б. в.; 2) 20 г KOH растворяют в 50 мл б. в. Растворы 1 и 2 смешивают в темной банке и хранят в темноте.

25%-ный раствор сегнетовой соли ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) готовят, растворяя 25 г навески в 75 мл б. в. 1 М раствор NaOH (40 мг/мл) готовят, растворяя навеску в б. в. Рабочий стандартный раствор NH_4Cl (0,01911 мг/мл) готовят, растворяя навеску в б. в.

Построение калибровочного графика. В 6 мерных колб по 100 мл вносят по 0, 5, 10, 20, 30 и 40 мл рабочего стандартного раствора (РСР). Затем в колбы добавляют по 1 мл раствора Б, приливают до половины объема колбы б. в. и вносят по 5 мл 25%-ного раствора сегнетовой соли. После перемешивания pH раствора доводят до нейтрального 1 М раствором NaOH , добавляют 40 мл б. в. и после перемешивания 4 мл реактива Несслера. Объем колб доводят до метки б. в. Через 15 мин на ФЭКе измеряют светопоглощение растворов при длине волны 530 нм против нулевой пробы. Данные записать в таблицу 6.1.

Таблица 6.1

Данные к построению калибровочной кривой
для определения общего азота в растительных тканях

№ колбы	Объем РСР, мл	Масса азота в 100 мл, мг	Светопоглощение D , усл. ед.
1	5	0,025	
2	10	0,05	
3	20	0,10	
4	30	0,15	
5	40	0,20	

Ход работы. Навеску растительной ткани (0,5–1,0 г) после измельчения помещают в колбу Кьельдаля на 250 мл, прибавляют 10 мл концентрированной H_2SO_4 и оставляют на ночь. Затем после разогрева содержимого колбы в нее вносят 1–2 мл 30%-ной H_2O_2 . Нагревание и остывание образца с добавлением H_2O_2 производят несколько раз до полного обесцвечивания содержимого колбы и получения прозрачного раствора.

По окончании озоления, соблюдая осторожность, в колбу добавляют б. в. и после перемешивания переносят в мерную колбу на 250 мл (К1), объем которой доводят до метки б. в. Затем из этой колбы отбирают 10 мл раствора, который вносят в мерную колбу на 100 мл (К2). Далее в колбу К2 вносят 25 мл б. в. и 5 мл 25%-ного раствора сегнетовой соли. После перемешивания pH раствора в колбе К2 доводят до нейтрального 1 М раствором NaOH. Затем добавляют 40 мл б. в. и 4 мл раствора Несслера, перемешивают и объем колбы доводят до метки б. в. и снова перемешивают. Через 15 мин на ФЭКе измеряют светопоглощение раствора при длине волны 530 нм.

Метод расчета. Содержание азота (мг/г массы) в растительной ткани рассчитывают по формуле

$$C_{\text{оп}} = \frac{C_{\text{к}} \cdot V_1}{m \cdot V_2},$$

где $C_{\text{к}}$ — масса азота, найденная по калибровочному графику, мг; V_1 — объем раствора колбы К1 после мокрого озоления, мл; V_2 — объем раствора, внесенный в колбу К2, мл; m — масса навески, г.

Оформление работы. На миллиметровой бумаге построить калибровочный график, откладывая на оси абсцисс величины массы азота ($C_{\text{к}}$, мг), а на оси ординат — светопоглощение стандартных проб (D , усл. ед.). Определить содержание азота в опытной пробе.

6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРА ВАНАДО-МОЛИБДАТНЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Метод основан на способности соединений, содержащих фосфор, образовывать в растворе с азотной кислотой комплексы с молибдат- и ванадат-ионами, имеющими желтую окраску с максимумом поглощения при 460 нм.

Содержание фосфора в растениях составляет 0,2–1,2% от сухой массы растения.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК, водяная баня, электрическая плитка.

Посуда: колбы на 50 мл — 8 шт., на 1 л — 6 шт., на 100 мл — 1 шт.; пипетка автоматическая или пипетки на 5 мл — 2 шт.; стеклянная палочка; тигель.

Материалы и реактивы: гомогенат тканей; 3,23 мМ раствор KH_2PO_4 ; 30%-ная HNO_3 ; 0,25%-ный раствор ванадиевокислого аммония; 5%-ный раствор молибденовокислого аммония, 20%-ный раствор HCl .

Приготовление растворов.

1. Раствор азотной кислоты готовят, разбавляя конц- HNO_3 б. в.

2. Раствор ванадиевокислого аммония готовят, растворяя 2,5 г ванадиевокислого аммония (NH_4VO_3) в кипящей воде, охлаждают, добавляют 20 мл конц- HNO_3 , переносят в колбу на 1 л и доводят до метки б. в.

3. Раствор молибденовокислого аммония готовят, растворяя 50 г молибденовокислого аммония ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) в горячей б. в., охлаждают, переносят в мерную колбу на 1 л и доводят б. в. до метки.

Реагирующая смесь: растворы 1, 2 и 3 смешивают в соотношении 1:1:1.

4. Раствор соляной кислоты готовят, разбавляя конц- HCl б. в.

5. Стандартный раствор готовят, растворяя 439 мг KH_2PO_4 в 1 л б. в. В 1 мл полученного раствора содержится 0,1 мг фосфора.

Приготовление опытного образца. К золе в тигле после сухого озоления добавляют 0,5–1,0 мл б. в. и 1,0 мл конц- HCl . Затем смесь прогревают на водяной бане до полного выпаривания жидкости. Сухой осадок растворяют в 1,0 мл 20%-ной HCl , перемешивая содержимое в тигле стеклянной палочкой. Солянокислый раствор золы фильтруют через бензольный фильтр и переносят в мерную колбу на 100 мл. Тигель и стеклянную палочку тщательно смывают б. в. в ту же колбу. После охлаждения колбу доливают б. в. до метки, закрывают пробкой и взбалтывают. Раствор используют для определения кальция, натрия, магния.

Ход работы. В мерную колбу на 50 мл вносят 5–20 мл опытного образца, в зависимости от содержания в нем фосфора. Добавляют 5 мл 30%-ной HNO_3 , нагревают на

электрической плитке до кипения и к горячему раствору приливают 15 мл реагирующей смеси. Охлаждают и доводят до метки б. в. После этого аналогичные действия проводят со стандартными растворами.

Светопоглощение растворов измеряют на фотоэлектрокolorиметре при 460 нм (синий светофильтр) против нулевого раствора.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика берут 7 колб на 50 мл, куда вносят: 0, 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мл стандартного раствора, что будет соответствовать 0, 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мг фосфора. Окрашивание стандартов и опытных образцов проводят одновременно.

При построении калибровочного графика по оси ординат откладывают данные светопоглощения растворов (D , усл. ед.), а по оси абсцисс — концентрацию фосфора (C , мг).

Метод расчета. Содержание фосфора (%) в опытном образце рассчитывают по следующей формуле:

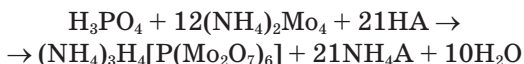
$$C_{\text{оп}} = \frac{C_{\text{к}} \cdot V_1}{m \cdot V_2} \cdot 100,$$

где $C_{\text{к}}$ — содержание фосфора, найденное по калибровочному графику, мг; m — масса навески, мг; V_1 — объем исходного раствора, мл; V_2 — объем раствора, взятого на определение, мл.

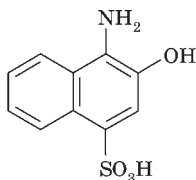
Оформление работы. Записать результаты исследований и рассчитать содержание фосфора в опытном образце.

6.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА МЕТОДОМ ФИСКЕ — СУББАРΟΥ

Принцип метода. Белки гомогената ткани осаждают трихлоруксусной кислотой. Определение неорганического фосфора основано на измерении интенсивности окраски молибденовой сини, образующейся при восстановлении фосфорномолибденовой кислоты в кислой среде. Фосфорномолибденовая кислота является продуктом реакции между фосфорной кислотой и молибденокислым аммонием. Реакция протекает в кислой среде:



В качестве восстановителя используют эйконоген (α -1,2,4-аминонафтолсульфоновая кислота), который образует с фосфорномолибденовой кислотой ярко окрашенный молибденовый синий, имеющий поглощение при 625 нм.



α -1,2,4-Аминонафтолсульфоновая кислота

Оборудование: ФЭК; аналитические весы; центрифуга; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 5 шт.; пипетки на 0,2 мл — 1 шт., на 1 мл — 3 шт., на 2 мл — 1 шт., на 5 мл — 2 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: сыворотка крови или гомогенат ткани; 10%-ный раствор ТХУ; 2,5 М раствор H_2SO_4 ($\rho = 1,15 \text{ г/см}^3$); 5%-ный раствор аммония молибденовокислого $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$; NaHSO_3 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$); Na_2SO_3 ; 5 мМ раствор KH_2PO_4 ; эйконоген (1-амино-2-нафтол-4-сульфоновая кислота).

Приготовление растворов. 5%-ный раствор аммония молибденовокислого готовят, растворяя 5 г навески в 82,6 мл 2,5 М раствора H_2SO_4 ($\rho = 1,15 \text{ г/см}^3$).

Раствор эйконогена готовят, внося в колбу на 100 мл 0,2 г эйконогена, 12,0 г NaHSO_3 и 2,4 г Na_2SO_3 . Объем раствора после растворения всех компонентов доводят до метки б. в.

Калибровочный раствор фосфата (0,68 мг/мл) готовят, растворяя навеску в б. в.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используют 4 пробирки, в которые последовательно вносят по 0,1, 0,2, 0,3 и 0,4 мл 5 мМ раствора KH_2PO_4 , а затем по 4,9, 4,8, 4,7 и 4,6 мл б. в. соответственно, как показано в таблице 6.2.

Концентрация и порядок внесения калибровочного раствора фосфата

№ пробирки	Объем раствора KH_2PO_4 , мл	Объем б. в., мл	Концентрация раствора KH_2PO_4 , мМ	Концентрация фосфата, мкмоль/мл	Концентрация фосфора, нмоль/мл	Светопоглощение D , усл. ед.
1	0,1	4,9	0,1	0,1	12,7	
2	0,2	4,8	0,2	0,2	45,4	
3	0,3	4,7	0,3	0,3	68,1	
4	0,4	4,6	0,4	0,4	90,8	

Общий объем раствора в каждой пробирке должен быть равен 5 мл. После перемешивания в каждую пробирку вносят 1 мл 5% -ного раствора аммония молибденовокислого, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл б. в. Растворы в пробирках перемешивают и оставляют на 30 мин для развития окраски, а затем измеряют светопоглощение при 625 нм против контроля в кюветах шириной 1 см. В контрольную пробирку вместо калибровочного раствора добавляют б. в.

Полученные величины светопоглощения записывают в таблицу. Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая полученные данные в координатах (D , C).

Приготовление супернатанта. К 1 мл сыворотки или гомогената ткани прибавляют 4 мл б. в. и 5 мл 10% -ного раствора трихлоруксусной кислоты. После перемешивания через 10 мин пробу центрифугируют 15 мин при 7000g. Супернатант используют в дальнейших исследованиях.

Ход работы. К 5 мл супернатанта добавляют 1 мл раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл воды. Через 30 мин исследуемую пробу фотометрируют при длине волны 625 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см против контроля. В контрольную пробу вместо супернатанта добавляют б. в.

Метод расчета. Содержание фосфата (мкмоль/г массы ткани) в исследуемой пробе рассчитывают по следующей формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{C_{\text{к}} \cdot V_1 \cdot V_3}{P \cdot V_2},$$

где $C_{\text{к}}$ — количество фосфора, найденное по калибровочному графику, нмоль/мл; V_1 — объем гомогената, мл; V_2 — объем гомогената, вносимого в пробирку при осаждении белков, мл; V_3 — конечный объем супернатанта, мл; P — масса навески, г.

Оформление работы. На миллиметровой бумаге построить калибровочный график, откладывая на оси абсцисс величины массы азота ($C_{\text{к}}$, нмоль/мл), а на оси ординат — светопоглощение стандартных проб (D , усл. ед.). Определить содержание фосфора в опытной пробе.

6.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРГАНЦА В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ ФОРМАЛЬДОКСИДНЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Метод основан на образовании ионом двухвалентного марганца с формальдоксидом в щелочной среде окрашенного в красно-бурый цвет формальдоксидата трехвалентного марганца. Содержание марганца определяют в экстрактах растительных тканей без предварительного озоления. Определению могут мешать железо и никель, присутствующие в супернатанте в высоких концентрациях.

Содержание марганца в растениях составляет 0001–0,01% (по массе) или 0,01–0,1 мг/г массы растения.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; гомогенизатор или ступка фарфоровая; центрифуга; ножницы; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетка автоматическая или пипетки на 5 мл — 3 шт.; пробирки — 2 шт.; пластиковые центрифужные пробирки — 2 шт.

Материалы и реактивы: 10 г семидневных проростков пшеницы; 10% -ный раствор NaOH; 1,82 мМ раствор MnCl_2 ; раствор формальдоксима; 30% -ный раствор трихлоруксусной кислоты; бидистиллированная вода.

Приготовление растворов.

Раствор формальдоксима готовят, растворяя 2 г хлоргидрата гидроксилamina в 50 мл б. в. с добавлением 1 мл 40% -ного формалина. Раствор готовят перед анализом.

Стандартный раствор марганца готовят, растворяя 0,229 г MnCl_2 в 1 л б. в. Содержание марганца в растворе 0,1 мг/мл.

Ход работы. 10 г растительной ткани измельчают на гомогенизаторе и затем измеряют объем гомогената, который переносят в центрифужную пробирку. Доводят объем до 10 мл, добавляя 20%-ную ТХУ. После перемешивания пробирку центрифугируют при 7000g. В чистую пробирку отбирают 8 мл супернатанта, 1 мл 10%-ного NaOH и 1 мл раствора формальдоксима. После перемешивания смесь выдерживают 20 мин и производят измерение поглощения раствора при 450 нм. Контролем служит пробирка, в которую вместо супернатанта добавляли б. в.

Калибровочный график. Для построения калибровочного графика берут 6 пробирок куда вносят: 0, 1, 2, 4, 6, 8 мл стандартного раствора, что будет соответствовать 0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 мг/л марганца. Окрашивание стандартов и опытных образцов проводят одновременно.

При построении калибровочного графика по оси ординат откладывают данные поглощения растворов (D , усл. ед.), а по оси абсцисс — концентрацию марганца (C , мг/мл).

Метод расчета. Содержание марганца (%) в опытном образце рассчитывают по следующей формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{C_{\text{к}} \cdot V_1 \cdot V_3}{m \cdot V_2} \cdot 100,$$

где $C_{\text{к}}$ — содержание марганца, найденное по калибровочному графику, мг/мл; m — масса навески, мг; V_1 — объем исходного раствора, мл; V_2 — объем раствора, после разбавления, мл; V_3 — объем раствора, взятого на определение, мл.

Оформление работы. Записать результаты исследований и рассчитать содержание марганца в опытном образце.

6.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛИЯ И НАТРИЯ НА ПЛАМЕННОМ ФОТОМЕТРЕ

Принцип метода. Пламенно-фотометрический метод определения металлов основан на эмиссии излучения атомами в пламени газовой горелки, в которую поступает аэрозоль,

состоящий из мельчайших капелек анализируемого раствора в смеси с окислителем и горючим газом. Под действием высоких температур атомы химических элементов излучают свет определенной длины волны. С помощью монохроматора можно выделить излучение, испускаемое атомами определенного элемента. Интенсивность этого излучения пропорциональна концентрации элемента в растворе. Концентрацию веществ в испытываемом растворе сравнивают с концентрацией искомых веществ в эталонных растворах.

Содержание калия в растениях составляет около 1% в расчете на сухую массу.

Оборудование: пламенный фотометр.

Посуда: колбы на 1000 мл — 20 шт., на 100 мл — 3 шт.; пипетка автоматическая или пипетки на 5 мл — 3 шт.; стаканы на 50 мл — 3 шт.

Материалы и реактивы: раствор золы; 20%-ной раствор HCl; 25,6 мМ раствор KCl; 4,3 мМ раствор NaCl бидистиллированная вода.

Приготовление растворов. Исходный стандартный раствор калия готовят, растворяя 1907 мг KCl в б. в. в мерной колбе на 1 л. В 1 мл раствора содержится 1 мг калия. Затем готовят рабочие стандартные растворы с содержанием калия 0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 30 и 40 мг/л. Для этого в мерные колбы на 1 л вносят соответственно 0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 30 и 40 мл исходного раствора, приливают в каждую колбу по 1 мл 20%-ной HCl, доводят до метки б. в. и перемешивают.

Исходный стандартный раствор натрия готовят, растворяя 254 мг NaCl в б. в. в мерной колбе на 1 л. В 1 мл раствора содержится 0,1 мг натрия. Затем готовят рабочие стандартные растворы с содержанием натрия 0,1, 0,2, 0,4, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 5,0 мг/л. Для этого в мерные колбы на 1 л вносят соответственно 1, 2, 4, 10, 20, 30, 40 и 50 мл исходного раствора, приливают в каждую колбу по 1 мл 20%-ной HCl, доводят до метки б. в. и перемешивают.

Ход работы. В мерные колбы на 100 мл переносят 5, 10 и 20 мл раствора золы, заливают до метки б. в. и перемешивают. Растворы наливают до половины в сухие химические стаканы на 50 мл и поочередно вводят в распылитель пламенного фотометра.

Построение калибровочного графика. Стандартные растворы калия и натрия фотометрируют в порядке возрастания концентрации. По окончании измерений строят калибровочный график, откладывая по оси ординат показания прибора, а по оси абсцисс — концентрацию калия и натрия, мг/мл.

Метод расчета. По калибровочному графику находят содержание элемента в 1 л испытуемого раствора. Содержание калия и натрия в пробе (%) рассчитывают по следующей формуле:

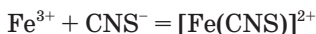
$$C_{\text{оп}} = \frac{C_{\text{к}} \cdot V_1 \cdot V_3}{m \cdot V_2} \cdot 100,$$

где $C_{\text{к}}$ — содержание элемента, найденное по калибровочному графику, мг; m — масса навески, мг; V_1 — объем исходного раствора, мл; V_2 — объем раствора, взятого на определение, мл; V_3 — объем раствора, после разбавления.

Оформление работы. Записать результаты исследований и рассчитать содержание калия и натрия в опытном образце.

6.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА РОДАНИДНЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Ионы окисленной формы железа (Fe^{3+}) взаимодействуют с роданидом калия с образованием окрашенного в красный цвет комплекса, концентрацию которого определяют спектрофотометрически при 500 нм.



Чувствительность метода 0,05 мг/л ионов железа.

Содержание железа в растениях составляет 0,08% от сухой массы.

Оборудование: тигель фарфоровый; печь муфельная; спектрофотометр или ФЭК.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт., пипетка автоматическая или пипетки на 5 мл — 3 шт.; пробирки — 3 шт.; пластиковые центрифужные пробирки — 6 шт.

Материалы и реактивы: семидневные проростки пшеницы; конц- HNO_3 , 10%-ный раствор роданистого калия (KCNS); 50%-ная азотная кислота; 30%-ная H_2O_2 ; железоаммонийные квасцы ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$); бидистиллированная вода.

Приготовление растворов.

Зольный раствор. 2–3 г проростков пшеницы, измельчают и высушивают до постоянной массы. Затем помещают в тигель и сжигают до полного озоления. Зола растворяют в 5 мл 50%-ной азотной кислоты, добавляют 20 мл б. в. и фильтруют в мерную колбу на 25 мл. Раствор доводят до метки б. в. и используют в исследованиях.

Перекристаллизация железоаммонийных квасцов. 120 г железоаммонийных квасцов растворяют при нагревании в 100 мл б. в., подкисленной 3–5 мл конц- H_2SO_4 и содержащей 1 мл перекиси водорода. После растворения квасцов раствор фильтруют и охлаждают при перемешивании. Кристаллы, имеющие аметистовый цвет, отфильтровывают и сушат.

Стандартный раствор железоаммонийных квасцов готовят, растворяя 884 мг железоаммонийных квасцов в небольшом количестве б. в. в мерной колбе на 1 л, добавляют 5 мл конц- HNO_3 и доводят объем б. в. до 1 л. Раствор содержит 0,1 мг железа в 1 мл.

Ход работы. В мерную колбу на 50 мл последовательно вносят 25 мл зольного раствора, 5 мл 50%-ной HNO_3 и 5 мл 10%-ного KCNS. После перемешивания смеси объем б. в. доводят до метки и через 5 мин измеряют поглощение при 500 нм. В качестве контроля используется раствор, в который вместо зольного раствора добавляется б. в. Аналогичные действия проводят со стандартным раствором. Для этого в колбу на 50 мл вносят 25 мл стандартного раствора железоаммонийных квасцов (2,5 мг), 5 мл 50%-ной HNO_3 , 5 мл 10%-ного KCNS и после перемешивания объем доводят до метки б. в. Через 5 мин измеряют поглощение стандартного раствора при 500 нм.

Метод расчета. Содержание железа (%) в опытном образце рассчитывают по следующей формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{к}} \cdot V_1}{m \cdot D_{\text{ст}} \cdot V_2} \cdot 100,$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытного образца, усл. ед.; $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение стандартного раствора, усл. ед.; $C_{\text{к}}$ — содержание железа в стандартном растворе, мг; m — масса навески, мг; V_1 — объем стандартного раствора, взятого на определение, мл; V_2 — объем стандартного раствора после разбавления.

Оформление работы. Записать результаты исследований и рассчитать содержание железа в опытном образце.

6.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА С ПОМОЩЬЮ 4,7-ДИФЕНИЛ-1,10-ФЕНАНТРОЛИН-3,6- ДИСУЛЬФОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Принцип метода. Реакция основана на способности иона Fe^{2+} образовывать с 4,7-дифенил-1,10-фенантролин-3,6-дисульфоновой кислотой устойчивый комплекс красного цвета, который можно фотометрировать. Определение железа проводят после осаждения белков.

Оборудование: фотоэлектроколориметр.

Посуда: пробирки — 6 шт.; пипетки на 1 мл — 4 шт., на 5 мл — 1 шт.; колбы мерные на 40 мл — 1 шт., на 100 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: сыворотка крови или супернатант; тиогликолевая кислота (реактив 1); 0,6 М трихлоруксусная кислота (реактив 2); 0,92 мМ 4-7-дифенил-1,10-фенантролин-3,6-дисульфонозная кислота; 17,9 мкМ ферроцианид калия (6,6 мкг/мл); 4 М уксуснокислый натрий (544 мг/мл).

Приготовление растворов. Эталонный раствор готовят, растворяя 6,6 мг ферроцианида калия ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) в 1 л бидистиллированной воды.

Цветной реактив готовят путем смешивания равных объемов растворов 4,7-дифенил-1,10-фенантролин-3,6-дисульфонозной кислоты и уксуснокислого натрия.

Смеси для осаждения белков. В мерную колбу емкостью 100 мл помещают 3 мл тиогликолевой кислоты (реактив 1), объем доводят до метки 0,6 М трихлоруксусной кислотой (реактив 2). Если полученный раствор помутнеет, его

фильтруют через плотный фильтр. Смесь хранят в холодном месте без доступа света. В таких условиях она остается стабильной не менее 2 месяцев.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде, перегнанной в стекле.

Ход определения. В штатив устанавливают 6 центрифужных пробирок по 3 пробирки в два ряда, обозначая их как опытная, эталонная и раствор сравнения. Затем в каждую из пробирок первого ряда вносят реактивы, согласно прописи, приведенной в таблице 6.3.

Таблица 6.3

Порядок внесения растворов в аналитические пробирки

Реактивы	Пробирки		
	раствор сравнения	эталонная проба	опытная проба
Супернатант, мл		—	1,0
Эталонный раствор, мл		1,0	
Бидистиллированная вода, мл	1,0	1,0	
Смесь для осаждения белков, мл	1,0		1,0
Светопоглощение D , усл. ед.			

Содержимое пробирок перемешивают и через 30 мин опытную пробу центрифугируют (10 мин при 3000 об/мин). После этого из пробирок первого ряда вносят по 1 мл раствора в противоположные пробирки второго ряда, также обозначенные как опытная, эталонная и раствор сравнения. Затем в пробирки второго ряда добавляют по 1 мл цветного реактива. После перемешивания измеряют поглощение проб против раствора сравнения в кювете шириной 0,5 см при 535 нм (зеленый светофильтр).

Метод расчета. Содержание железа в мкмоль/л рассчитывают по формуле

$$[C_{\text{Fe}}] = \frac{A}{B} \cdot 17,9,$$

где A — светопоглощение опытной пробы; B — светопоглощение эталонного раствора.

6.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕДИ В ГОМОГЕНАТАХ ТКАНЕЙ

Принцип метода. Ионы меди образуют с 2,9-диметил-4,7-дифенил-1,10-фенантролин-3,6-дисульфоновокислым натрием комплекс оранжевого цвета, который фотометрируют. Содержание меди в пробе определяют после осаждения белков.

Оборудование: фотоэлектроколориметр.

Посуда: пробирки; пипетки.

Материалы и реактивы: гомогенат ткани; 25 мг/мл гидроксиламин сернокислый (1,25 г), 1,2 М трихлоруксусная кислота; 4 М соляная кислота; 0,88 М 2,9-диметил-4,7-дифенил-1,10-фенантролин-3,6-дисульфоновокислый натрий; 4 М уксуснокислый натрий; 3 мМ сульфит меди (CuSO_3).

Приготовление растворов. Депротенизирующую смесь готовят, растворяя 1,25 г гидроксиламина сернокислого в 50 мл раствора, полученного путем смешивания 25 мл 1,2 М ТХУ и 25 мл 4 М HCl . Смесь хранят в холодном месте без доступа света. Раствор устойчив не менее 3 месяцев.

Калибровочный раствор 30 мкМ CuSO_3 готовят, разбавляя 1 мл исходного 3 мМ раствора сульфита меди в бидистиллированной воде в мерной колбе емкостью 100 мл (в 1 мл 0,0019 мг меди). Раствор устойчив несколько недель.

Цветной реактив готовят путем смешивания равных объемов 4,7-дифенил-1,10-фенантролин-3,6-дисульфоновой кислоты и уксуснокислого натрия.

Ход определения. В штатив помещают 6 центрифужных пробирок по 3 пробирки в ряд, обозначая их как опытная, эталонная и раствор сравнения. В каждую пробирку последовательно вносят реагенты согласно прописи, приведенной в таблице 6.4.

Содержимое пробирок перемешивают и через 30 мин опытную пробу центрифугируют (10 мин при 3000 об/мин). После этого из пробирок первого ряда вносят по 2 мл раствора в противоположные пробирки второго ряда, также обозначенные как опытная, эталонная и раствор сравнения.

Порядок внесения растворов в аналитические пробирки

Реактивы	Пробирки		
	опытная проба	эталонная проба	раствор сравнения
Супернатант, мл	2,0		
Калибровочный раствор, мл	—	2,0	
Бидистиллированная вода, мл	—		2,0
Депротенизирующая смесь, мл	2,0	2,0	2,0
Светопоглощение D , усл. ед.			

Затем в пробирки второго ряда добавляют по 2 мл цветного реактива. Растворы перемешивают и через 10–20 мин измеряют светопоглощение опытной и эталонной проб против раствора сравнения в кюветах шириной 1 см при 480 нм (зеленый светофильтр).

Метод расчета. Содержание меди (мг/г влажной массы) в опытном образце рассчитывают по следующей формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{к}} \cdot V \cdot K}{D_{\text{ст}} \cdot P},$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытного образца, усл. ед.; $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение стандартного раствора, усл. ед.; $C_{\text{к}}$ — содержание меди в калибровочном растворе, мг/мл; P — масса навески, мг; V — объем гомогената, мл; K — коэффициент разбавления.

Примечание. Определение меди необходимо проводить в совершенно чистой лабораторной посуде, предназначенной исключительно для анализа меди, используя бидистиллированную воду, не содержащую медь. Применяемую посуду рекомендуется мыть кипячением в концентрированной соляной кислоте или хромовой смеси (хромпик), тщательно сполоснуть бидистиллированной водой и хорошо просушить. Рекомендуется слить супернатант в чистую пробирку и из нее брать пипеткой нужное количество. Это предохраняет от помутнения супернатант при прямом отборе пипеткой из слоя над осадком белков. Реактивы должны храниться в темноте.

6.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕДИ В ТКАНЯХ МЕТОДОМ ШМИДТА В МОДИФИКАЦИИ А. Г. РАХМАНКУЛОВА И И. А. КОПТЕВОЙ

Принцип метода. Содержание меди в гомогенатах тканей определяют по интенсивности желтой окраски при 435–480 нм, развивающейся при взаимодействии меди с комплексообразователем — диэтилдитиокарбаматом натрия.

Оборудование: ФЭК; центрифуга; аналитические весы.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт., на 1 л — 1 шт.; пипетки на 1 мл — 3 шт., на 2 мл — 2 шт., на 5 мл — 3 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: гомогенат ткани; 20%-ный раствор ТХУ; 4%-ный раствор пирогосфата натрия; 25%-ный раствор NH_4OH ; 1%-ный раствор Na -диэтилдитиокарбамата.

Приготовление растворов. Раствор Na -диэтилдитиокарбамата готовят, растворяя 1 г навески в 99 мл б. в. при нагревании. 20%-ный раствор ТХУ и 4%-ный раствор пирогосфата натрия готовят, растворяя соответствующие навески в б. в.

Исходную стандартную пробу готовят, растворяя 0,393 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 л б. в. (в 1 мл раствора содержится 0,1 мг или 100 мкг меди). Затем 1 мл исходной стандартной пробы разбавляем еще в 100 раз и получаем стандартный раствор, содержащий 1 мкг/мл или 100 мкг/% меди.

Ход работы. Опытная проба. К 2 мл гомогената добавляют 5 мл б. в. и 3 мл 20%-ного раствора ТХУ. После перемешивания раствора через 10 мин его центрифугируют 15 мин при 7000g. К 5 мл супернатанта добавляют 1 мл 4%-ного раствора пирогосфата натрия, 0,5 мл 25%-ного раствора NH_4OH , 1 мл 1%-ного раствора Na -диэтилдитиокарбамата. Смесь интенсивно встряхивают и измеряют светопоглощение раствора на ФЭКе при 435–480 нм против контроля ($D_{\text{оп}}$). Контролем служит проба, в которую вместо гомогената добавляют б. в.

Стандартная проба. В пробирку с 2 мл стандартного раствора меди (1 мкг/мл) вносят все реактивы, что и в опытной пробе. Действие со стандартным раствором производят аналогично опытной пробе. Измерения светопоглощения проводят на ФЭКе при 435–480 нм против контроля, в который вместо стандартного раствора добавляется б. в. ($D_{ст}$).

Метод расчета. Содержание меди (мкг/г влажной массы) в исследуемом образце ткани определяют по следующей формуле:

$$C_{опыт} = \frac{C_{ст} \cdot D_{оп} \cdot V}{D_{ст} \cdot P},$$

где $D_{оп}$ — светопоглощение опытной пробы, усл. ед.; $D_{ст}$ — светопоглощение стандартного раствора меди, усл. ед.; $C_{ст}$ — концентрация меди в стандартном растворе, мкг/мл; V — объем гомогената, мл; P — навеска ткани, г.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации меди в исследуемой пробе.

6.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ГЛИОКСАЛЬ-БИС-(2-ОКСИАНИЛА)

Принцип метода. Глиоксаль-бис-(2-оксианил) (ГБО) образует с ионами кальция в щелочной среде комплекс, окрашивающий раствор в красный цвет и светопоглощающий при 530 нм.

Оборудование: ФЭК; аналитические весы; штатив; шейкер.

Посуда: колбы на 100 мл — 2 шт., на 250 мл — 1 шт., на 500 мл — 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 2 шт., на 1 мл — 2 шт., на 2 мл — 1 шт.; цилиндр.

Материалы и реактивы: сыворотка или плазма крови; 0,4 М раствор NaOH; 0,1% -ный раствор глиоксаль-бис-(2-оксианила); 0,1 М раствор HCl; метанол ($\rho = 0,7917$ г/см³), 0,9% -ный раствор NaCl; CaCO₃.

Приготовление растворов. Раствор глиоксаль-бис-(2-оксанила) готовят, растворяя 0,1 г навески в 126,3 мл метанола. Растворы NaOH (16 мг/мл) и NaCl (9 мг/мл) готовят, растворяя навески в б. в. Эталонный раствор кальция (0,1 мг/мл) готовят, растворяя 0,125 г CaCO₃ в 0,1 М растворе HCl в колбе на 500 мл.

Ход работы. В три пробирки (проба, стандарт и контроль) вносят реактивы в порядке, указанном в таблице 6.5. После добавления раствора ГБО пробирки оставляют на 30 мин, а затем добавляют 0,5 мл 0,4 М раствора NaOH.

Таблица 6.5

Реактивы и порядок их введения в пробирки при определении содержания кальция в сыворотке крови

Реактивы	Пробирки		
	проба	стандарт	контроль
Бидистиллированная вода, мл	1,00	1,00	1,00
Сыворотка, мл	0,02	—	—
0,9% -ный раствор NaCl, мл	—	0,02	0,02
Раствор ГБО, мл	2,00	2,00	2,00
После перемешивания оставляют на 30 мин			
Раствор NaOH, мл	0,50	0,50	0,50
Измерение светопоглощения растворов через 10 мин			
Светопоглощение D , усл. ед.			

После перемешивания растворов измеряют светопоглощение пробы и стандарта на ФЭКе при 500–560 нм против контроля. Данные записывают в таблицу.

Метод расчета. Содержание кальция в сыворотке крови (мг%) определяют по следующей формуле:

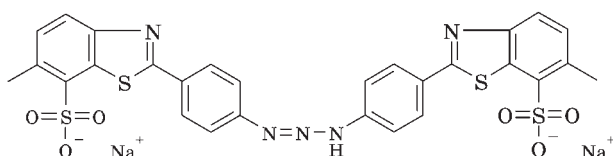
$$C_{\text{опыт}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot D_{\text{оп}}}{D_{\text{ст}}},$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытной пробы, усл. ед.; $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение стандартного раствора кальция, усл. ед.; $C_{\text{ст}}$ — концентрация кальция в стандартном растворе, мг%.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации кальция в исследуемой пробе.

6.11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАГНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ТИТАНОВОГО ЖЕЛТОГО

Принцип метода. Магний реагирует с титановым желтым в щелочной среде с образованием соединения, поглощающего при 500–560 нм.



4,4'-Бис (6-метил-2-бензотиазол) диазминобензол-2,2'-дисульфокислоты динатриевая соль (титановый желтый)

Оборудование: ФЭК; центрифуга; аналитические весы; штатив.

Посуда: колбы на 25 мл — 1 шт., на 100 мл — 7, на 1 л — 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 2 шт., на 1 мл — 5 шт., 2 мл — 3 шт., 5 мл — 3 шт.; пробирки центрифужные — 3 шт., мерные на 10 мл — 3 шт.

Материалы и реактивы: сыворотка крови; 10%-ный раствор вольфрамовокислого натрия (Na_2WO_4); 0,335 М раствор H_2SO_4 ; 1,5 М раствор NaOH ; 0,2 М раствор NaOH ; 2%-ный раствор гидроксилamina солянокислого ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$); 0,075%-ный раствор титанового желтого; 0,1%-ный раствор метилового красного; 96%-ный этиловый спирт; 0,832 мМ раствор MgSO_4 .

Приготовление растворов. Раствор титанового желтого (0,748 мг/мл) готовят, растворяя навеску в б. в.

Раствор метилового красного (1 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 96%-ном этиловом спирте.

Растворы Na_2WO_4 (100 мг/мл), NaOH (60 мг/мл), NaOH (8 мг/мл) и солянокислого гидроксилamina (20 мг/мл) готовят, растворяя навески в б. в.

Раствор H_2SO_4 готовят путем разбавления исходного 17,79 М раствора ($\rho = 0,834 \text{ г/см}^3$) серной кислоты б. в.

Стандартный раствор сернокислого магния готовят, растворяя 205 мг соли ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) в 1 л б. в. (в растворе содержится 0,02 мг/мл или 2 мг% магния).

Ход работы. В три центрифужные пробирки (опыт, стандарт и контроль) последовательно вносят реактивы, как показано в таблице 6.6.

Таблица 6.6

Реактивы и порядок их внесения в центрифужные пробирки при определении магния в сыворотке крови

Реактивы	Пробирки центрифужные		
	опыт	стандарт	контроль
Бидистиллированная вода, мл	2,0	3,0	3,0
Сыворотка, мл	1,0	—	—
Раствор вольфрамовокислого натрия, мл	1,0	1,0	1,0
Раствор H_2SO_4 , мл	1,0	1,0	1,0

После перемешивания содержимого пробирок их оставляют на 15 мин, а затем центрифугируют 10 мин при 7000g. После этого из каждой пробирки отбирают в три новые мерные пробирки по 2,5 мл супернатанта, к которым добавляют по 0,05 мл метилового красного и 0,2 М раствор NaOH до появления желтой окраски в опытной пробе.

Затем в каждую пробирку добавляют 1,0 мл 2%-ного гидроксилamina, 1 мл 0,075%-ного титанового желтого и 2,0 мл 1,5 М раствора NaOH. После перемешивания объемы во всех пробирках доводят до 10 мл б. в.

Светопоглощение опытной и стандартной пробы измеряют на ФЭКе при 500–560 нм против контроля.

Метод расчета. Содержание магния в сыворотке крови (мг%) определяют по следующей формуле:

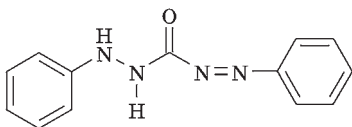
$$C_{\text{опыт}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot D_{\text{оп}}}{D_{\text{ст}}},$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытной пробы, усл. ед.; $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение стандартного раствора магния, усл. ед.; $C_{\text{ст}}$ — концентрация магния в стандартном растворе, мг%.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации магния в исследуемой пробе.

6.12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ ХЛОРА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕРКУРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Ионы хлора, присутствующие в сыворотке крови, титруют нитратом ртути, используя дифенилкарбазон (1,5-дифенилкарбазон, 2-фенилгидразид фенилазомуравьиной кислоты).



В эквивалентной точке избыток нитрата ртути образует с дифенилкарбазоном комплекс, окрашенный в синелиловый цвет.

Оборудование: ФЭК; аналитические весы; микробюретка.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт., на 1 л — 1 шт.; пипетки на 0,2 мл — 2 шт., на 2 мл — 2 шт.; химический стакан.

Материалы и реактивы: сыворотка крови; 3,59 мМ раствор азотнокислой ртути; концентрированная HNO_3 ; 96%-ный этиловый спирт; 0,01 М раствор NaCl .

Приготовление растворов. Раствор $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 мг/мл) готовят, растворяя вначале 2 г навески в 200 мл б. в., а затем добавляют 20 мл 2 М HNO_3 и доводят объем б. в. до 1 л.

Раствор дифенилкарбазона (1 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 96%-ном этиловом спирте.

Раствор HNO_3 готовят, растворяя исходную концентрированную азотную кислоту в б. в.

Стандартный раствор ионов хлора готовят, растворяя NaCl (0,5845 мг/мл) в б. в. В 1 мл содержится 0,3545 мг или 0,01 мэкв хлора.

Ход работы. Опытная проба. В химический стакан вносят 1,8 мл б. в., добавляют 0,2 мл сыворотки, 0,2 мл дифенилкарбазона и титруют 3,59 мМ раствором азотнокислой ртути до появления сине-фиолетового окрашивания.

Стандартная проба. К 2 мл стандартного раствора хлористого натрия добавляют 0,2 мл дифенилкарбазона и после перемешивания смеси титруют раствором азотнокислой ртути, как в опытной пробе.

Метод расчета. Содержание ионов хлора (мэкв/л или мг%) в сыворотке рассчитывают по следующей формуле:

$$C_{\text{опыт}} = \frac{A \cdot 100}{B}, \text{ мэкв/л; } C_{\text{опыт}} = \frac{A \cdot C_{\text{хлор}} \cdot 10}{B}, \text{ мг\%,}$$

где А — количество раствора азотнокислой ртути, израсходованной на титрование опыта, мл; В — количество раствора азотнокислой ртути, израсходованной на титрование стандартного раствора хлорида натрия, мл; $C_{\text{хлор}}$ — содержание хлора в стандартном растворе, мг%; 10 — коэффициент пересчета.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенного содержания хлора в исследуемой пробе.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Классификация элементов живых организмов.
2. Чем отличается элементный состав растительной клетки от животной?
3. Раскрыть роль кальция и магния как структурообразующих элементов клетки.
4. Рассказать об участии натрия и калия в формировании трансмембранного потенциала.
5. Рассказать о роли ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} в действии ферментов.
6. Какие методы используются для определения железа?
7. Назвать белки, в составе которых присутствуют ионы железа.
8. Назвать основные гемсодержащие белки животных и рассказать об их биологической роли.
9. Рассказать об участии ионов меди в метаболических процессах.
10. Описать механизмы действия медьсодержащих белков.

11. Назвать биогенные молекулы энергетических процессов, в состав которых входят фосфор и сера.

12. Охарактеризовать роль кальция в стабилизации белков.

13. Раскрыть механизм действия кальция в метаболических процессах животных.

14. Рассказать об участии ионов Cl^- в метаболических процессах.

В растительных тканях и микроорганизмах синтезируются биологически активные низкомолекулярные вещества, необходимые для протекания химических реакций. Изучение витаминов началось с исследований русского ученого Н. И. Лунина, который в 1880 г. в экспериментах на мышах впервые выявил роль ранее неизвестных соединений, отличающихся строением от белков, углеводов, липидов и минеральных солей, в жизнедеятельности животных. Впоследствии его выводы были подтверждены и другими исследователями. Эти соединения по предложению К. Функа в начале XX в. стали называть витаминами. Все витамины имеют буквенное обозначение. Витамины условно можно разделить на растворимые в полярных (водорастворимые: В₁, В₂, В₃, В₄, В₅, В₆, В₇, В₈, В₁₂, В₁₃, В₁₅, В_с, С, Р, РР, Н, U, N, Q) и в неполярных (жирорастворимые: А, D, Е, К) растворителях.

В живых организмах многие витамины служат предшественниками кофакторов, которые входят в состав ферментов. Витамины выполняют в живых организмах разнообразные функции и отличаются по химическому строению. Недостаток и отсутствие витаминов вызывает у животных и человека развитие симптомов гипо- или авитаминозов и иногда заканчивается гибелью организма.

В составе коферментов НАД, НАДФ присутствуют остатки витаминов В₅ (никотинамид) и РР (никотиновая кислота), участвующих в реакциях обратимого гидрирования (присоединения атомов водорода). В реакции гидрирования коферменты играют роль промежуточных переносчиков водорода, что обусловлено наличием в структуре их молекулы амида никотиновой кислоты. Богаты витамином

РР пивные дрожжи, мясо, печень, почки. В молоке содержится 0,8–1,8 мг/кг.

Витамин В₁ служит предшественником тиаминпирофосфата, образование которого катализируется тиаминпирофосфокиназой, переносящей с АТФ остаток пирофосфорной кислоты. Богатыми по содержанию тиамина являются дрожжи, зародыши и оболочки пшеницы, овса, гречихи. Витамин накапливается в основном в зеленых листьях на свету, а также при созревании плодов и семян.

Витамин В₂ является предшественником рибофлавина-5'-фосфата (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД), действие которых проявляется в окислительно-восстановительных процессах. Богаты витамином бобовые культуры. Кроме того, витамин содержится в дрожжах, молочной сыворотке, яичном белке, мясе, рыбе, печени и др.

Витамин В₃ входит в состав коэнзима А, который участвует в реакциях превращения пировиноградной кислоты, катализируемых ферментами пируватдегидрогеназного (ПДК) и α -кетоглутаратдегидрогеназного (α -КГДК) комплексов, синтезе жирных кислот — в составе ацилпереносящего белка. В₃ участвует в углеводном и липидном обменах. Витамин В₃ распространен в растениях (цветная капуста, картофель, томаты). В зерновках пшеницы содержание витамина составляет 1–2, горохе — 2–3, моркови — 0,2–0,3, капусте — 0,3–0,4 мг%. Высоко содержание витамина В₃ в печени животных, почках, мышцах, яичном желтке, икре.

Функциональная активность витамина В₆ проявляется в составе кофермента пиридоксальфосфата. Участвует в процессе активного переноса аминокислот через клеточные мембраны, в реакциях трансаминирования, декарбоксилирования, рацемизации аминокислот злаков. У животных витамин В₆ накапливается в тканях печени, сердце, почках. В молоке содержится 0,18–0,24 мг/кг.

Витамин В₁₃ участвует в образовании урацила через образование оротидина, оротидиловой кислоты, уридиловой кислоты. Кроме того, оротовая кислота влияет на обмен галактозы. У птиц и млекопитающих витамин В₁₃ синтезируется из аспарагиновой кислоты и карбамоилфосфата.

Участвует V_{13} в механизмах синтеза нуклеиновых кислот. Функционально активной формой является оротидин-5-фосфат. Стимулируя протекание анаболических процессов, витамин V_{13} ускоряет рост растений и животных.

Витамин V_{15} способен участвовать в реакциях метилирования в липидном обмене, в биосинтезе креатинфосфата. Используется при остром отравлении наркотиками, алкоголем, антибиотиками тетрациклинового ряда. Высокое содержание витамина отмечается в проростках риса. Кроме того, V_{15} содержится в дрожжах, печени, в крови животных.

Фолиевая кислота (витамин V_c) метаболически не активна, но при восстановлении способна присоединять 4 атома водорода, превращаясь в активный кофермент 5,6,7,8-тетрагидрофолиевую кислоту (ТГФК). Процесс в животных тканях протекает в две ферментативные стадии, катализируемые последовательно НАДФ-зависимыми фолатредуктазой и дигидрофолатредуктазой. Участие в ферментативных реакциях ТГФК проявляется наличием в ее структуре в положениях 5 и 10 активных атомов азота. В механизме действия трансфераз, ТГФК осуществляет перенос одноуглеродных остатков: $-\text{CH}_3$ (метильная), $-\text{CHO}$ (формильная), $-\text{CH}_2\text{OH}$ (оксиметильная), $-\text{CH}_2$ (метиленовая), $-\text{CHNH}$ (формиминогруппа), $-\text{CH} == R$ (метенильная). При биосинтезе метионина и тимина переносится метильная группа, серина — оксиметильная группа, пуриновых нуклеотидов — формильная группа. Богаты витамином V_c растения: салат, капуста, томаты, морковь, зеленый лук, шпинат, бобовые. В зерне злаков содержится 0,1–0,2, в зерне бобовых — 0,3–0,4, картофеле — 0,02, свекле — 0,015, капусте белокочанной — 0,03, шпинате — 0,12, черной смородине — 0,018 мг%.

Витамин С способен обратимо окисляться, донируя протоны и электроны, кислородом воздуха, перекисью водорода, йодом, 2,6-дихлорфенолиндофенолом, перманганатом в водной среде. Витамин С проявляет антиоксидантные свойства, является субстратом аскорбатоксидазы, пероксидазы и др. Продуктом окисления витамина С является L-дегидроаскорбиновая кислота. Богаты витамином С плоды шиповника, черной смородины, картофель, капуста.

В плодах черной смородины содержится витамина 69—255, яблоках — 1—48, клубнях картофеля — 10—40, горохе стручковом — 100—226, моркови — 3—14, землянике лесной — 17—54, плодах черной смородины — 70—400, шпинате — 20—100, щавеле — 20—90 мг%.

Витамин Н участвует в следующих каталитических процессах:

а) карбоксилировании с расщеплением АТФ, катализируемые пируваткарбоксилазой, ацетил-КоА-карбоксилазой, пропионил-КоА-карбоксилазой, метилкротоноил-КоА-карбоксилазой, гераноил-КоА-карбоксилазой;

б) транскарбоксилировании без расхода АТФ, катализируемые метилмалонил-КоА-карбоксилтрансферазой.

Витамин Н синтезируется в микроорганизмах (бактерии кишечника) и растениях (горох, соя, капуста, картофель, лук, томат, шпинат). Высокое содержание витамина Н у животных отмечается в печени, почках, молоке, желтке яиц. Содержание в молоке витамина Н может составлять 0,03—0,05 мг/кг.

Липоевая кислота служит простетической группой ферментов пируват- (ПДК) и α -кетоглутаратдегидрогеназного (α -КГДК) комплексов, участвуя в реакциях окислительного декарбоксилирования α -кетокислот (пировиноградной и α -кетоглутаровой) и переносе ацильных групп. Витамин широко распространен в растениях и микроорганизмах, в основном в связанной форме, в составе ферментативных комплексов. Наибольшее количество липоевой кислоты приходится на митохондрии и хлоропласты.

К витаминам группы Р относятся низкомолекулярные фенольные соединения, в составе которой катехины, лейкоантоцианы, флавононы, флавонолы, антоцианы, флавоны. Предшественником всех этих фенолов является шикимовая кислота. Некоторые производные витамина Р (дигидрокверцетин, кверцетин) обладают антиоксидантным действием. Р-витаминная активность выявлена в листьях и цветках растений. Однако дигидрокверцетин и кверцетин в большом количестве содержатся в древесине хвойных пород деревьев, переработка которых ведется в нашей стране в промышленных масштабах.

В составе белка родопсина присутствует витамин А (ретинол), участвующий в процессе фоторецепции. Предшественниками витамина являются каротины (α -, β -, γ -каротины). Каротины присутствуют практически во всех органах и тканях растений. Участвуют в процессе фотосинтеза, размножения растений и окислительно-восстановительных реакциях, а также выполняют роль антиоксиданта.

Антиоксидантные свойства проявляют витамины группы Е (токоферолы). Витамины отличаются друг от друга числом и расположением метильных групп в бензольном кольце. Все они нерастворимы в воде, но растворимы в неполярных растворителях. Устойчивы к нагреванию, но быстро окисляются под действием УФ-излучения. Поэтому они способны защищать от окисления полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав биомембран, жировых шариков молока. Высокое содержание витамина Е отмечается в растительных маслах (подсолнечное, хлопковое, соевое, кукурузное и др.).

В переносе ионов кальция участвует витамин D. Витамин D в организме животного может связываться со специализированным рецепторным белком. Витамин участвует в регуляции процессов всасывания ионов кальция и фосфора в кишечнике, резорбции костной ткани и реабсорбции Ca^{2+} и фосфора в почечных канальцах. Кроме того, витамин D регулирует процессы остеогенеза и ремоделирования костной ткани. Таким образом, основная функция витамина D заключается в поддержании оптимальной концентрации ионов кальция и фосфора в плазме крови. В растениях витамины группы D не синтезируются, однако они являются поставщиками 7-дигидрохолестерина.

Витамин К принимает участие в реакциях окислительного фосфорилирования, выполняя коэнзимные функции в реакциях, катализируемых филлохинонредуктазой и менадионредуктазой. Вовлечен в реакции синтеза ферментов свертывания крови (фактор II, VII, IX, X), активируя биосинтез мРНК. Выполняет роль кофактора в реакциях γ -карбоксилирования остатка глутаминовой кислоты в составе факторов свертываемости крови, катализируемые

микросомальной γ -глутамилкарбоксилазой. Богаты витамином К листья каштана, крапивы, люцерны. Среди овощей больше всего витамина К накапливается в капусте, шпинате, тыкве, зеленых томатах. Особенно богаты витамином К бобовые, в их листьях содержится 10–20 мг%.

7.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Принцип метода. В основе реакции определения аскорбиновой кислоты лежит ее способность восстанавливать железо в комплексном соединении $K_3[Fe(CN)_6]$ (феррицианид калия), превращая его в $K_4[Fe(CN)_6]$ (ферроцианид калия). В присутствии хлорного железа образуется $Fe_4[Fe(CN)_6]$ (гексацианоферрат (II) железа), окрашенный в синий цвет (берлинская лазурь).

Оборудование: центрифуга; ФЭК; рН-метр; аналитические весы.

Посуда: колбы на 50 мл — 4 шт.; на 1 л — 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 3 шт., 1 мл — 1 шт., 5 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: *супернатант* зерновок пшеницы; 0,57 мМ аскорбиновая кислота; 74 мМ хлорид железа (III); 30 мМ феррицианид калия; 0,476 М фторид натрия, 0,1 М цитратный буфер, рН 3,7.

Приготовление растворов. *Буферный раствор* готовят из исходных 0,1 М растворов цитрата и цитрата натрия путем их смешивания на рН-метре до рН 3,7. Растворы аскорбиновой кислоты (0,1 мг/мл), хлорида железа (III) (12 мг/мл), феррицианида калия (11 мг/мл) и фторида натрия (20 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в.

Построение калибровочного графика. Калибровочный график строят на основании данных светопоглощения, полученных при измерении образцов разбавленного исходного калибровочного раствора аскорбиновой кислоты. Для этого в штатив устанавливают 6 пробирок в ряд, в которые последовательно вносят следующие реактивы: 0,05 мл 30 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,05 мл 0,476 М NaF, 0,1 мл 74 мМ $FeCl_3$, и объем 0,1 М цитратного буфера рН 3,7, указанные в таблице 7.1. Реакцию инициируют введением различных объемов

исходного раствора аскорбиновой кислоты. При этом общий объем раствора равен 5 мл.

Таблица 7.1

Объемы (мл) рабочих растворов реагентов, используемых для построения калибровочного графика для определения аскорбиновой кислоты

Пробирки	Объем рабочих растворов, мл					Концентрация АК		D, усл. ед.
	$K_3[Fe(CN)_6]$	NaF	$FeCl_3$	буфер	АК	мг/мл	мг	
1	0,05	0,05	0,1	4,75	0,05	0,02	0,1	
2	0,05	0,05	0,1	4,70	0,10	0,04	0,2	
3	0,05	0,05	0,1	4,65	0,15	0,06	0,3	
4	0,05	0,05	0,1	4,60	0,20	0,08	0,4	
5	0,05	0,05	0,1	4,55	0,25	0,10	0,5	
Конт-роль	0,05	0,05	0,1	4,8	—	—	—	

После перемешивания растворов пробирки оставляют на 5 мин для проведения реакции, а затем измеряют поглощение проб на ФЭКе при $\lambda = 700$ нм. В качестве контроля используют пробу, в которую вместо раствора аскорбиновой кислоты вносят соответствующий объем дистиллированной воды.

Ход работы. В опытную пробирку последовательно вносят 0,2 мл супернатанта, 4,6 мл 0,1 М цитратного буфера pH 3,7, 0,05 мл 30 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,05 мл 0,476 М NaF, 0,1 мл 74 мМ $FeCl_3$. После перемешивания смесь выдерживают в течение 5 мин, после чего измеряют светопоглощение опытной пробы, как описано выше. В качестве контроля используют два раствора. В первую контрольную пробирку добавляют 1 мл супернатанта и 4 мл 0,1 М цитратного буфера pH 3,7 (К1 — светопоглощение супернатанта). Во вторую контрольную пробирку вносят 0,2 мл 50%-ного этанола, 4,6 мл 0,1 М цитратного буфера pH 3,7, 0,05 мл 30 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,05 мл 0,476 М NaF, 0,1 мл 74 мМ $FeCl_3$ (К2 — светопоглощение рабочих растворов).

Метод расчета. Расчет светопоглощения образца (D_{00}) проводят путем вычитания светопоглощения D_{K1} и D_{K2} из светопоглощения опытной пробы ($D_{оп}$):

$$D_{\text{оо}} = D_{\text{оп}} - (D_{\text{к1}} + D_{\text{к2}}).$$

Содержание аскорбиновой кислоты (в мг/г ткани) определяют по следующей формуле:

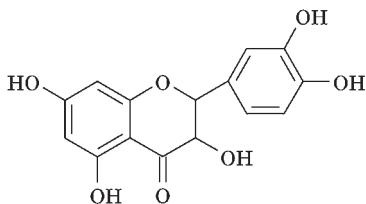
$$C_{\text{Ак}} = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_2}{P \cdot V},$$

где C — концентрация аскорбиновой кислоты, определенная по калибровочному графику, мг/мл; V_1 — общий объем гомогената растительной ткани, мл; V_2 — конечный объем пробы в пробирке, мл; P — навеска растительной ткани, г; V — объем супернатанта, взятого для определения, мл.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта, определить содержание аскорбиновой кислоты в исследуемой ткани, раскрыть роль аскорбиновой кислоты в метаболических процессах клеток растений.

7.2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА (ВИТАМИНА ГРУППЫ Р) ИЗ ЛИСТВЕННОЙ

Принцип метода. Дигидрокверцетин (таксифолин-2,3-дигидро-3,5,7-тригидрокси-2-(3,4-дигидроксифенил)-4Н-1-бензопиран-4-он) является природным антиоксидантом (биофлавоноидом), относится к витаминам группы Р.



Дигидрокверцетин

Дигидрокверцетин может быть использован в фармации, медицине, косметике, парфюмерии и пищевой промышленности в качестве биологически активной добавки.

Больше всего, до 1,5% от абсолютно сухой массы, дигидрокверцетина (ДГКВ) содержится в лиственной сибирской и даурской. По внешнему виду ДГКВ представляет

собой мелкокристаллический или аморфный порошок белого или светло-кремового цвета. Он хорошо растворим в ацетоне, метиловом и этиловом спиртах, пропиленгликоле-1,2, этилацетате. Нерастворим ДГКВ в хлороформе, серном эфире, углеводородах. Растворимость ДГКВ в воде зависит от температуры и степени очистки. Так, при 23–25°C в воде растворяется 0,1; при 40°C — 0,3; при 60°C — 1,0 и при 90°C — от 3 до 5,3%. Растворимость дигидрокверцетина при 23°C в 30%-ном растворе этилового спирта составляет 1,84, в 50 — 9,0, 70 — 16,4, а в 90 — 24,0%.

Оборудование: рубильная и дробильная машины; механическая мельница; сушильный вакуумный шкаф; центрифуга; водяная баня; холодильник, штатив.

Посуда: химический стакан на 1 л; пипетки на 1 мл — 1 шт., на 5 мл — 1 шт.; круглодонная колба; пробирки.

Материалы и реактивы: древесина лиственницы; 96%-ный и 90%-ный растворы этилового спирта; концентрированная HCl; гранулированный цинк.

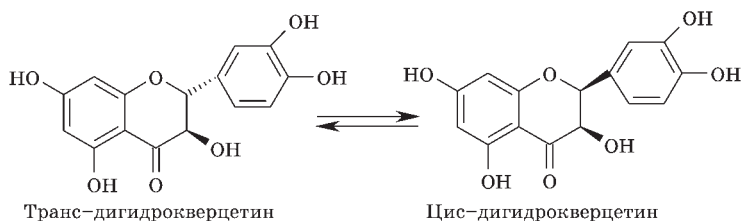
Ход работы. Древесина лиственницы очищается от коры, измельчается с помощью рубильной и дробильной машин до мелких фрагментов, а затем в течение 3 ч сушится при 60°C под вакуумом. Измельчается на механической мельнице в порошкообразную массу с размером частиц в 1 мм, заливается 90%-ным раствором этилового спирта в соотношении 1:1 и в течение 3 ч при постоянном перемешивании осуществляется экстракция ДГКВ. Затем центрифугируется 15 мин при 5000g. Осадок отбрасывают, супернатант переносят в круглодонную колбу и помещают в кипящую водяную баню, отгоняя под вакуумом этиловый спирт. Водный концентрат охлаждают при 0°C в течение 15–18 ч. Осадок промывают 90%-ным этиловым спиртом. После промывки осадок растворяют в д. в., нагревая раствор до 90°C с последующим охлаждением до 0°C. Перекристаллизацию проводят 2–3 раза, а затем препарат лиофилизируют.

Качественная реакция на флавоноиды. В пробирку вносят 0,1 г дигидрокверцетина, 5 мл 95%-ного этилового спирта, 0,5 мл концентрированной HCl и 0,05 г гранулированного цинка. После перемешивания раствор должен окраситься в малиновый цвет.

Оформление работы. Записать методику очистки дигидрокверцетина и провести качественную реакцию на его содержание в полученном образце.

7.3. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА

Принцип метода. Дигидрокверцетин (ДГКВ) относится к группе фенольных соединений, обладающих высокой антиоксидантной активностью. ДГКВ хорошо растворим в полярных растворителях и в водно-спиртовых растворах, особенно при нагревании. В растворах ДГКВ может присутствовать в *транс*- и *цис*-формах. Причем *транс*-форма флавонона более химически активна.



В воде дигидрокверцетин имеет максимум поглощения при 327 нм, а в 96% -ном растворе этилового спирта максимум поглощения проявляется уже при 290 нм. При этом переход одной изоформы в другую осуществляется через изобестическую точку при 305 нм (рис. 7.1).

При варьировании pH от 4,5 до 8,0 в спектрах дигидрокверцетина проявляются три максимума поглощения в УФ-области при 230, 290 и 327 нм. Переход одной изоформы в другую осуществляется через две изобестические точки при 265 и 305 нм (рис. 7.2).

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы.

Посуда: колбы на 25 мл — 8 шт., на 500 мл — 4 шт.; пипетки на 0,1 мл — 1 шт., на 10,0 мл — 3 шт.; пипетки.

Материалы и реактивы: кристаллический дигидрокверцетин (95–98% чистоты); 16,7 М этиловый спирт ($\rho = 0,8014 \text{ г/см}^3$); 0,1 М Na-ацетатный и 0,1 М Na-фосфатный буферные растворы; 3,6 мМ раствор дигидрокверцетина.

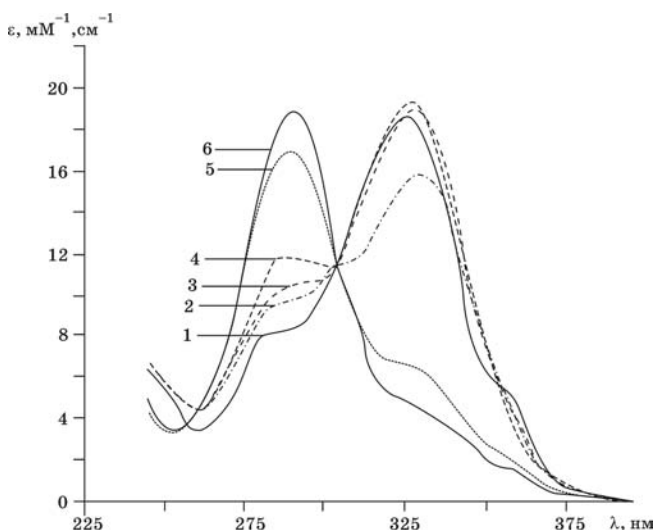


Рис. 7.1

Спектры поглощения дигидрокверцетина в зависимости от содержания в исследуемом водно-спиртовом растворе этилового спирта, М:

1 — 0; 2 — 1,7; 3 — 3,4; 4 — 5,1; 5 — 8,6; 6 — 16,4. Концентрация дигидрохверцетина — 36 мкМ.

Приготовление растворов. Растворы этилового спирта готовят, растворяя соответствующие объемы 16,7 М этилового спирта в д. в.

На-ацетатные буферные растворы (рН 4,5 5,0, 5,5 и 6,0) готовят из исходных 0,1 М водных растворов CH_3COOH и CH_3COONa , а На-фосфатные буферные растворы (рН 6,5, 7,0, 7,5 и 8,0) из исходных 0,1 М водных растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на рН-метре до желаемой величины рН.

Исходный раствор ДГКВ (1,1 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Ход работы. Для изучения влияния концентрации этанола на величины светопоглощения дигидрохверцетина необходимо взять 6 пробирок, в которые последовательно вносят определенные объемы д. в., 3,6 мМ раствора ДГКВ и 16,7 М этиловый спирт как показано в таблице 7.2.

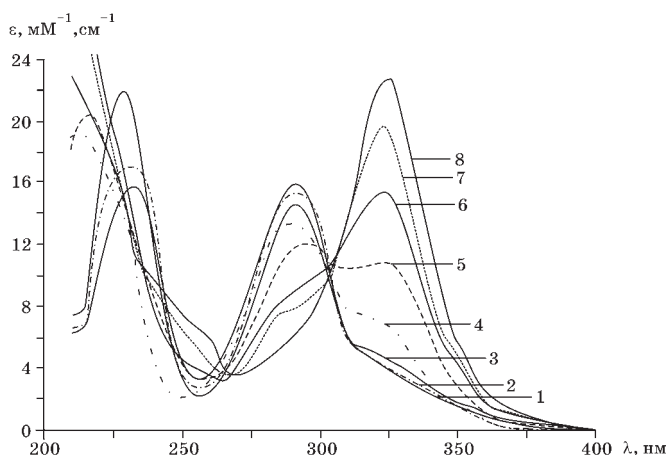


Рис. 7.2

Спектры поглощения дигидрокверцетина в различных буферных растворах в зависимости от pH:

1 — 4,5; 2 — 5,0; 3 — 5,5; 4 — 6,0; 5 — 6,5; 6 — 7,0; 7 — 7,5; 8 — 8,0. Концентрация дигидрокверцетина — 36 мкМ.

Таблица 7.2

**Величины поглощения растворов ДГКВ
в зависимости от концентрации этилового спирта**

№ пробирки	Объем д. в., мл	Объем раствора ДГКВ, мл	Объем раствора этанола, мл	Концентрация этанола, М	Светопоглощение D, усл. ед.	
					327 нм	290 нм
1	9,9	0,1	—	—		
2	8,9	0,1	1,0	1,67		
3	7,9	0,1	2,0	3,34		
4	6,9	0,1	3,0	5,01		
5	4,9	0,1	5,0	8,35		
6	—	0,1	9,9	16,53		

Для изучения влияния pH буферного раствора на величины светопоглощения дигидрокверцетина необходимо взять 8 пробирок, в которые последовательно вносят определенные объемы буфера и 3,6 мМ раствора ДГКВ, как показано в таблице 7.3.

Величины поглощения ДГКВ в зависимости от pH буферного раствора

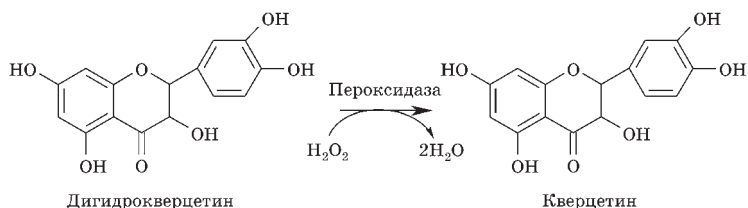
№ пробирки	pH буфера	Объем раствора буфера, мл	Объем раствора ДГКВ, мл	Светопоглощение, усл. ед.		
				230 нм	290 нм	327 нм
1	4,5	9,9	0,1			
2	5,0	9,9	0,1			
3	5,5	9,9	0,1			
4	6,0	9,9	0,1			
5	6,5	9,9	0,1			
6	7,0	9,9	0,1			
7	7,5	9,9	0,1			
8	8,0	9,9	0,1			

После перемешивания растворов электронные спектры ДГКВ записывают в области 200–400 нм в кварцевых кюветах (толщина кюветы 1 см). В сравнении использовали водно-спиртовой раствор или буфер с определенным pH.

Оформление работы. Записать спектры поглощения ДГКВ в водно-спиртовых растворах и буферных растворах с pH 4,5–8,0. Рассчитать коэффициенты молярного поглощения дигидрокверцетина и сравнить их с литературными данными.

7.4. ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ КВЕРЦЕТИНА

Принцип метода. Пероксидаза катализирует реакцию окисления дигидрокверцетина, который является медленно окисляемым субстратом фермента. Пероксидазная реакция окисления ДГКВ протекает по следующей схеме.



В процессе пероксидазного окисления в спектре поглощения дигидрокверцетина появляется максимум поглощения при 400–405 нм. Продуктом окисления ДГКВ является кверцетин, имеющий при этой длине волны молярный коэффициент поглощения, равный $14 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$, который и может быть использован при расчетах скоростей ферментативных реакций. Следует отметить, что при 405 нм поглощение дигидрокверцетина минимально и им можно было пренебречь.

Максимальная активность пероксидазы проявляется при pH 7,5 ($k_{\text{cat}} = 277,8 \text{ с}^{-1}$).

Оборудование: pH-метр; спектрофотометр; центрифуга; аналитические весы.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт. и 50 мл — 2 шт.; пипетки на 5 мл — 1 шт., на 0,1 мл — 3 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: 0,01 М Na-фосфатный буфер, pH 7,5; 0,2 мкМ раствор пероксидазы; 3 мМ дигидрокверцетин; 15,4 мМ раствор перекиси водорода.

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,01 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на pH-метре до pH 7,5.

Раствор дигидрокверцетина (0,912 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Перекись водорода, 15,4–15,8 мМ водный раствор, готовят на спектрофотометре с светопоглощением 1,12–1,15 усл. ед., при длине волны 230 нм ($\epsilon = 72,7 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

Раствор пероксидазы из корней хрена (0,16 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,1 М Na-фосфатного буфера pH 7,0. При этом концентрация пероксидазы должна быть равна 4 мкМ ($D_{403} = 0,4$ усл. ед.). Для выполнения работы требуется разбавить исходный раствор фермента в 20 раз, до 0,2 мкМ.

Ход работы. В спектрофотометрическую кювету шириной 1 см последовательно вносят 0,1 мл 3 мМ раствора дигидрокверцетина, 2,2 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера pH 7,0 и 0,1 мл 0,2 мкМ раствора пероксидазы. После перемешивания реакцию инициируют введением в кювету 0,1 мл 15,4 мМ H_2O_2 . Снова перемешивают содержимое кюветы и через каждые 15–20 с в течение 1 мин записывают показания светопоглощения на спектрофотометре при 405 нм. Данные записывают в таблицу 7.4.

**Величины светопоглощения продукта окисления дигидрокверцетина
от времени протекания реакции его пероксидазного окисления
в присутствии пероксидазы из корней хрена**

Измерения	Время t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

За единицу активности фермента принимали количество мкмоль дигидрокверцетина, окисленного за 1 мин.

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D, t), или по формуле (мкМ/мин):

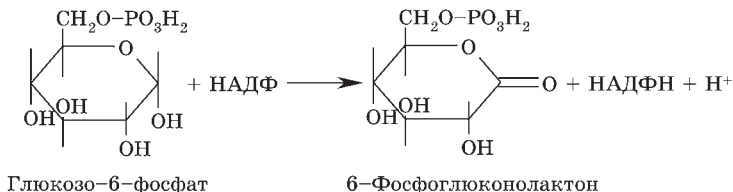
$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{\varepsilon \cdot l \cdot dt},$$

где dD — величина светопоглощения при 405 нм, усл. ед.;
 ε — коэффициент молярного светопоглощения ($14 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$);
 l — ширина кюветы, см; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Определить активность пероксидазы в реакции пероксидазного окисления дигидрохверцетина, рассчитать величины каталитических констант (V_m , $k_{\text{кат}}$).

7.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НАДФ

Принцип метода. Определение содержания НАДФ в тканях растений основано на измерении активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, которая катализирует реакции окисления глюкозо-6-фосфата до 6-фосфоглюконолактона. В качестве кофермента этой реакции участвует НАДФ, восстанавливающийся в ходе реакции до НАДФН.



Количество НАДФН определяется спектрофотометрически при 340 нм ($\varepsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; рН-метр; аналитические весы.

Посуда: колбы на 500 — 3 шт.; пипетки на 0,1 мл — 3 шт., на 1 мл — 1 шт., 5 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: 0,1 М *трис*-HCl буфер, рН 8,0; 0,05 М раствор глюкозо-6-фосфата динатриевой соли; 0,1 М MgCl_2 ; супернатант.

Приготовление рабочих растворов. Буферный раствор готовят, смешивая 0,1 М растворы триса и HCl на рН-метре до рН 8,0. Растворы 0,05 М глюкозо-6-фосфата (15,2 мг/мл), 0,1 М MgCl_2 (9,52 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Ход работы. В кювету последовательно вносили 0,1 мл супернатанта, 0,4 мл 0,1 М MgCl_2 , 2,4 мл 0,1 М *трис*-HCl буфера (рН 8,0) и 0,05 мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. После перемешивания измеряли светопоглощение раствора (D_1) при 340 нм. Затем добавляли 0,05 мл 0,05 М глюкозо-6-фосфата и измеряли возрастание светопоглощения (D_2) раствора при 340 нм до его полного прекращения (10–15 мин).

Метод расчета. Количество НАДФ (мкмоль/г массы) в исследуемой пробе вычисляют по следующей формуле:

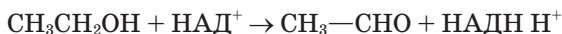
$$C_{\text{НАДФ}} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{\varepsilon \cdot l \cdot V_2 \cdot P},$$

где dD — значение светопоглощения пробы, вызванное окислением глюкозо-6-фосфата, в реакции катализируемой Г6ФДГ ($dD = D_2 - D_1$), усл. ед.; V_1 — общий объем супернатанта (С2), мл; V_2 — объем супернатанта (С2), вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; ε — коэффициент молярного светопоглощения НАДФН при 340 нм ($\varepsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$); l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и рассчитать величину НАДФ, определенную в исследуемом супернатанте.

7.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НАД

Принцип метода. Никотинамидадениндинуклеотид является коферментом многих дегидрогеназ (3-фосфоглицерат-, лактат-, изоцитрат-, сукцинат-, малат-, алкоголь-, альдегид- и других дегидрогеназ). Для определения НАД в растительных тканях предлагается использовать очищенную алкогольдегидрогеназу зерен пшеницы, катализирующую реакцию окисления этанола.



Оптимум каталитической активности фермента приходится на рН 10. Содержание кофермента в супернатанте рассчитывается по поглощению НАДН при 340 ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$), образующегося в ходе алкогольдегидрогеназной реакции.

Оборудование: спектрофотометр; рН-метр.

Посуда: спектрофотометрические кюветы шириной 1 см; пипетки на 0,1 мл — 3 шт. и на 5 мл — 1 шт.; колбы на 500 мл — 2 шт., на 100 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: 0,1 М глицин-NaOH буфера, рН 10; 36 мМ раствора НАД (24 мг/мл); 0,41 М раствора этанола; 2,5 мкМ раствора АДГ.

Приготовление рабочих растворов. Раствор НАД готовят, растворяя 239 мг в 10 мл дистиллированной воды; раствор этанола готовят путем прибавления 1 мл 96%-ного спирта к 39 мл дистиллированной воды; раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы глицина и NaOH на рН-метре до рН 10.

Ход определения. В две спектрофотометрические кюветы (контроль и опыт) вносят по 0,1 мл 0,41 М раствора этанола, 2,8 мл 0,1 М глицин-NaOH буферного раствора, рН 10,0. Затем в контрольную кювету вносят 0,1 мл дистиллированной воды, а в опытную — 0,1 мл супернатанта. Пробы перемешивают и измеряют величину поглощения опытного раствора против контроля. После этого в контрольную пробу добавляют 0,1 мл дистиллированной воды, а в опытной пробе инициируют ферментативную реакцию путем внесения 0,1 мл раствора АДГ. Пробы перемешивают

и регистрируют светопоглощение при 340 нм до полного прекращения реакции.

Метод расчета. Содержание НАД ($C_{\text{НАД}}$, мкмоль/г влажной массы) в исследуемой пробе рассчитывают по формуле

$$C_{\text{НАД}} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_2}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_3},$$

где dD — изменение поглощения пробы в ходе ферментативной реакции; V_1 — общий объем гомогената, мл; V_2 — конечный объем пробы в кювете, мл; 6,22 — коэффициент микромолярного поглощения НАДН при 340 нм; V_3 — объем гомогената, вносимый в кювету, мл; P — навеска ткани, г; l — ширина кюветы, см.

Оформление работы. Записать методику проведения опыта, определить содержание НАД в исследуемой пробе и описать роль НАД в метаболических процессах клеток растений.

7.7. ПОЛУЧЕНИЕ ВЫТЯЖКИ ПИГМЕНТОВ ИЗ ПОБЕГОВ ПШЕНИЦЫ

Принцип метода. В клетках растений протекает процесс трансформации поглощенной энергии света в химическую энергию органических и неорганических соединений, получивший название фотосинтез. В состав фотосинтетического аппарата входят пигменты, которые относятся к трем классам веществ: хлорофиллы, фикобилины и каротиноиды. Хлорофиллы хорошо растворимы в этиловом эфире, бензоле, хлороформе, ацетоне, этиловом спирте, но плохо растворимы в петролейном эфире и нерастворимы в воде. Раствор хлорофилла *a* в этиловом эфире имеет сине-зеленый цвет, хлорофилла *b* — желто-зеленый. В этиловом эфире максимумы поглощения хлорофилла *a* приходятся на диапазон длин волн 660–663 и 428–430 нм, а для хлорофилла *b* — 642–644 и 452–455 нм. К каротиноидам относят три группы соединений: каротины, ксантофиллы и каротиноидные кислоты. Каротины и ксантофиллы хорошо растворимы в хлороформе, бензоле, ацетоне. Кроме того, ксантофиллы хорошо растворимы в спиртах, тогда как каротины плохо растворимы в метиловом и этиловом спиртах.

Оборудование: гомогенизатор или ступка фарфоровая; центрифуга; ножницы; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетка автоматическая или пипетки стеклянные на 5 мл — 3 шт.; пробирки — 3 шт., пластиковые центрифужные пробирки — 6 шт.

Материалы и реактивы: 10 г семидневных проростков пшеницы; 96% этиловый спирт; ацетон; дистиллированная вода.

Ход работы. Навеску побегов пшеницы измельчить ножницами и растереть на гомогенизаторе или в фарфоровой ступке. При использовании последней в среду вносят кварцевый песок. Растирание побегов производится до получения однородной массы, к которой приливают 5 мл 96%-ного этилового спирта. Полученную спиртовую вытяжку наливают в центрифужную пробирку (П1). Аналогичные действия производят, добавляя в гомогенат ацетон (П2) и дистиллированную воду (П3). Затем пробирки центрифугируют при 7000g в течение 15–20 мин. Надосадочную жидкость сливают в химические пробирки. Дальнейшие исследования проводят с использованием спектрофотометра. В спектрофотометрическую кювету наливают последовательно содержимое пробирки и прописывают спектр экстрактов в диапазоне длин волн 350–700 нм. В качестве контроля используют соответствующий растворитель. Определяют величины максимумов поглощения пигментов (λ_{\max}) и их светопоглощение (D , усл. ед.) при данной длине волны. Результаты записывают в таблицу 7.5.

Таблица 7.5

Величины максимумов поглощения
и светопоглощение растворов пигментов

Растворитель	Максимумы поглощения, нм	Светопоглощение D , усл. ед.

Оформление работы. Записать результаты исследований и оценить растворимость пигментов в воде и органических растворителях.

7.8. РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ (ПО КРАУСУ)

Принцип метода. В спиртовой вытяжке проростков пшеницы содержатся несколько пигментов: хлорофиллы, фикобилины и каротиноиды. Причем хлорофиллы имеют зеленую окраску, а каротин и ксантофиллы — желтую. Для их разделения используется смесь бензина с водно-спиртовым раствором, в которой пигменты имеют индивидуальную растворимость.

Оборудование: гомогенизатор или ступка фарфоровая; центрифуга; ножницы; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетка автоматическая или пипетки на 5 мл — 2 шт.; пробирки — 2 шт.; пластиковые центрифужные пробирки — 4 шт.; делительная воронка.

Материалы и реактивы: 10 г семидневных проростков пшеницы или водно-спиртовая вытяжка пигментов; 96%-ный этиловый спирт, бензин, дистиллированная вода.

Ход работы. Работа выполняется в два этапа.

Этап 1. Спиртовую вытяжку пигментов из побегов пшеницы получают так, как описано выше.

Этап 2. В делительную воронку последовательно вносят 10 мл спиртовой вытяжки пигментов и 15–20 мл бензина. После взбалтывания смеси дают отстояться до появления двух четко различимых слоев. Если разделение пигментов происходит плохо, то необходимо добавить 0,2–0,5 мл воды. После разделения в верхнем слое присутствует бензин, а в нижнем — водный раствор этанола. Причем водный раствор этанола должен быть окрашен в желтый цвет из-за присутствия в нем ксантофилла и каротина, а верхний слой приобретет зеленую окраску за счет хлорофиллов. Осторожно сливаем в две пробирки нижний и верхний слои. Дальнейшие исследования проводят с использованием спектрофотометра. В спектрофотометрическую кювету наливают последовательно содержимое пробирки, прописывая спектр экстрактов в диапазоне длин волн 400–700 нм. В качестве контроля используют соответствующий растворитель. Определяют величины максимумов поглощения пигментов и сравнивают их с литературными данными.

Оформление работы. Записать результаты исследований и оценить растворимость пигментов в бензине и водно-спиртовом растворе.

7.9. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛОВ И КАРОТИНОИДОВ

Принцип метода. Хлорофиллы и каротиноиды, растворенные в ацетоне, имеют характерные максимумы поглощения. Так, максимум поглощения хлорофилла *a* в ацетоне приходится на 663, хлорофилла *b* — на 645, а каротиноидов — на 440,5 нм.

Оборудование: спектрофотометр; гомогенизатор или ступка фарфоровая; центрифуга; ножницы; штатив.

Посуда: колба на 100 мл; пипетка автоматическая или пипетка стеклянная на 5 мл; химические пробирки — 2 шт.; пластиковые центрифужные пробирки — 2 шт.; цилиндр на 25 мл.

Материалы и реактивы: 10 г семидневных проростков пшеницы; ацетон, CaCO_3 .

Ход работы. Навеску побегов пшеницы измельчить ножницами и растереть на гомогенизаторе или в фарфоровой ступке. При растирании растительной ткани в фарфоровой ступке в среду вносят кварцевый песок и 1–2 г углекислого кальция. Растирание побегов производится до получения однородной массы, к которой приливают 10 мл ацетона. Ацетон во время экстракции может испаряться, поэтому необходимо определить объем вытяжки. Полученную вытяжку наливают в центрифужную пробирку. Затем пробирку центрифугируют при 7000*g* в течение 15–20 мин. Надосадочную жидкость сливают в химическую пробирку. Дальнейшие исследования проводят с использованием спектрофотометра. В спектрофотометрическую кювету наливают содержимое пробирки и затем прописывают спектр супернатанта в диапазоне длин волн 400–700 нм. Уточняют максимумы поглощения хлорофиллов *a* и *b*. После этого определяют величины максимумов поглощения пигментов.

Метод расчета. Концентрации пигментов (мг/л) определяют по следующим формулам:

$$C_a = 9,784 \cdot D_{662} - 0,99 \cdot D_{644},$$

$$C_b = 21,426 \cdot D_{644} - 4,65 \cdot D_{662},$$

$$C_a + C_b = 5,134 \cdot D_{622} - 20,436 \cdot D_{644},$$

$$C_k = 4,695 \cdot D_{440,5} - 9,268 \cdot (C_a - C_b).$$

где D_{662} — поглощение раствора при 662 нм; D_{644} — поглощение раствора при 644 нм; $D_{440,5}$ — поглощение раствора при 440,5 нм; C_a — концентрация хлорофилла a , мг/л; C_b — концентрация хлорофилла b , мг/л; C_k — концентрация каротиноидов, мг/л.

Содержание пигментов в пробе (мг/100 г) рассчитывают по формуле

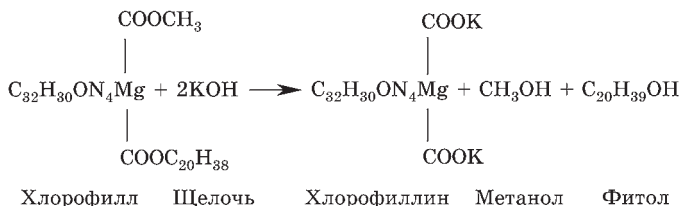
$$C_o = C \cdot V \cdot V_2 / m \cdot V_1 \cdot 10,$$

где C — концентрация пигмента, мг/л; V — объем исходной вытяжки, мл; V_1 — объем вытяжки, взятой для разбавления, мл; V_2 — объем разбавленной вытяжки, мл; m — масса навески.

Оформление работы. Записать результаты исследований и сравнить их величины. Описать строение хлорофиллов a и b .

7.10. ОМЫЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛОВ ЩЕЛОЧЬЮ

Принцип метода. При добавлении щелочи к раствору хлорофиллов инициируется следующая реакция омыления пигмента:



Соль хлорофиллиновой кислоты (хлорофиллин) имеет зеленую окраску, но отличается от хлорофилла нерастворимостью в бензине.

Оборудование: шейкер; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 2 шт.; пипетка автоматическая или пипетки на 5 мл — 3 шт., пробирка с притертой пробкой.

Материалы и реактивы: водно-спиртовая вытяжка пигментов; 20% -ный спиртовый раствор КОН (NaOH); бензин; 96% -ный этанол; дистиллированная вода.

Ход работы. В пробирку с притертой пробкой последовательно добавить 3 мл водно-спиртовой вытяжки пигментов и 0,5–1,0 мл 20% -ного спиртового раствора КОН. После перемешивания к смеси добавить равный объем бензина, а затем сильно встряхнуть и дать отстояться раствору.

Оформление работы. Зарисовать разделение слоев. Объяснить, какие пигменты присутствуют в верхнем и нижнем слоях. Записать реакцию омыления хлорофилла.

7.11. ПОЛУЧЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА

Высшие растения содержат две формы хлорофилла — *a* и *b*. Хлорофиллы представляют собой сложные эфиры дикарбоновой кислоты хлорофиллина, у которого одна карбоксильная группа этерифицирована остатком метилового спирта, а другая — остатком непредельного спирта фитола. Хлорофиллин имеет четыре пиррольных кольца, соединенных между собой метиновыми мостиками, формирующих структуру порфирина, в составе которого сопряженные двойные связи. При этом атомы азота пиррольных колец координационно связаны с ионом Mg^{2+} . В структуре порфирина имеется также циклопентановое кольцо, образованное остатком пропионовой кислоты у III пиррольного кольца, карбоксильная группа которого метилирована. Кроме того, к карбоксильной группе второго пропионовокислого остатка у IV пиррольного кольца присоединен за счет сложноэфирной связи остаток непредельного спирта фитола. В структуре порфирина имеются четыре метильные группы, расположенные у 1, 3, 5 и 8-го атомов углеродов пиррольных колец, а также винильная и этильная группы у 2-го и 4-го атомов углеродов соответственно. Хлорофиллы имеют характерные спектры

поглощения, в которых проявляются два максимума поглощения в синей и красной областях спектра. В растворе этилового эфира у хлорофилла *a* основные максимумы поглощения проявляются при 429 и 660 нм, а у хлорофилла *b* — 453 и 643 нм. При этом раствор хлорофилла *a* имеет сине-зеленую окраску, а хлорофилла *b* — желто-зеленую.

Принцип метода. Хлорофилл нерастворим в воде, поэтому для его экстракции используют органические растворители (метанол, ацетон, этанол, петролейный эфир и др.). Однако чаще всего для извлечения хлорофилла используются ацетон и этанол. Последний рекомендован по фактору приемлемости в производстве пищевых продуктов.

Оборудование: центрифуга; роторный испаритель или водяная баня; спектрофотометр; штатив; фарфоровая ступка или гомогенизатор.

Посуда: колбы на 100 мл — 2 шт.; пипетка на 5 мл; пробирки.

Материалы и реактивы: зеленые проростки пшеницы; ацетон, 96% -ный этанол.

Ход работы. *Экстракция ацетоном.* Навеску свежих проростков массой 0,5 г мелко измельчали, а затем растирали в фарфоровой ступке с 3 мл ацетона, затем в растертую массу добавляли еще 7 мл ацетона. Осадок удаляли центрифугированием или отстаиванием при + 4°C в течение 2–3 ч. Полученный экстракт, содержащий хлорофиллы, имел ярко-зеленый цвет. Для концентрирования раствора использовали роторный испаритель.

Спектры поглощения хлорофилла записывали на спектрофотометре путем сканирования длин волн с 700 до 400 нм, со скоростью 100 нм/мин. Контролем служит кювета с ацетоном.

Экстракция этанолом. Навеску растительной ткани 1 г мелко измельчали и растирали на гомогенизаторе в присутствии 5 мл 96% -ного этанола при 4°C. Затем гомогенат помещали в холодильник на 2 ч (+ 4°C) и после этого центрифугировали 15 мин при 7000g. Полученный экстракт, содержащий хлорофиллы, имел яркий изумрудно-зеленый цвет. Для концентрирования раствора использовали роторный испаритель или водяную баню.

Спектры поглощения хлорофилла записывали на спектрофотометре путем сканирования длин волн с 700 до 400 нм, со скоростью 100 нм/мин. Контролем служит кювета с 96% -ным этанолом.

Метод расчета. Содержание хлорофилла ($C_{\text{хл}}$, усл. ед./г влажной массы) определяют по следующей формуле:

$$C_{\text{хл}} = \frac{dD}{P},$$

где dD — светопоглощение раствора хлорофилла при 670 нм, усл. ед.; P — масса навески, г.

Оформление работы. Записать спектры поглощения хлорофиллов в ацетоне и этаноле, определить максимумы поглощения и сравнить величины максимумов между собой.

7.12. РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Принцип метода. В основе метода бумажной хроматографии используются абсорбционные различия пигментов, растворимых в подвижной фазе, с молекулами нерастворимого носителя. Движение пигментов по бумаге обусловлено действием капиллярных сил. При этом пигменты, нанесенные на бумагу, распределяются между двумя фазами в соответствии с их коэффициентами распределения. Скорость движения пигментов по хроматографической бумаге находится в прямой зависимости от их растворимости в подвижной фазе. Расстояние, пройденное нанесенным на бумагу пигментом в направлении движения растворителя, характеризуется величиной R_f :

$$R_f = \frac{[A_i]}{[A_0]},$$

где A_i — расстояние, пройденное растворенным пигментом, мм; A_0 — расстояние, пройденное фронтом растворителя, мм.

В стандартных условиях R_f является для данного пигмента постоянной и соответствует его коэффициенту распределения. Хроматографирование на бумаге проводят

восходящим или нисходящим способом. При восходящей хроматографии бумажная полоска в хроматографической камере располагается вертикально. При этом ее нижний конец с нанесенной смесью пигментов опускается в растворитель. Под действием капиллярных сил растворитель поднимается вверх, увлекая за собой растворенные вещества. При нисходящей хроматографии верхний конец хроматографической бумаги с нанесенной недалеко от ее края смесью пигментов помещается в лоток с растворителем. В результате действия капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает перемещаться вниз по хроматографической бумаге, в результате чего смесь разделяется.

Оборудование: хроматографическая камера размером 20×25×10 см или цилиндр; ножницы; штатив.

Посуда: колба на 100 мл, пипетка автоматическая или пипетки на 0,2 мл, пробирка.

Материалы и реактивы: хроматографическая бумага; ацетоновая вытяжка пигментов; ацетон; бензин; бензол; хлороформ; изопропиловый спирт. Из этих растворителей готовится смесь в следующем составе (в объемных единицах, мл): бензин — 50, бензол — 35, хлороформ — 10, ацетон — 4, изопропиловый спирт — 0,1.

Ход работы. Вначале на хроматографическую бумагу на расстоянии 1 и 2,5 см от одного из концов простым карандашом наносят две прямые линии, а затем вдоль второй линии наносят пипеткой ацетоновую вытяжку пигментов. Бумага с пигментами опускается в хроматографическую камеру, в которую предварительно внесли смесь растворителей. Полоска бумаги располагается в хроматографической камере таким образом, чтобы нижний конец бумаги был погружен в смесь растворителей на 1 см, а ее края не касались стенок. После этого хроматографическая камера плотно закрывается. Хроматографию проводят в течение 45 мин при комнатной температуре. Пигменты на хроматограмме располагаются в следующем порядке: хлорофиллы *b*, *a*, виолаксантин, лютеин, каротины. Хроматограмму извлекают из камеры и просушивают. Затем простым карандашом обводят зоны с соответствующими пигментами

и вырезают их ножницами. Полоски разрезают на мелкие кусочки, помещая в пробирки. В каждую пробирку наливают по 5 мл ацетона и выдерживают в течение 15–20 мин. После экстракции определяют содержание пигментов, используя спектрофотометр. Для этого в спектрофотометрическую кювету наливают содержимое пробирки и затем прописывают спектр супернатанта в диапазоне длин волн 400–700 нм. Уточняют максимумы поглощения пигментов и сверяют их с литературными данными, приведенными в таблице 7.6.

Таблица 7.6

Величины длин волн и коэффициенты молярного поглощения хлорофиллов *a* и *b*, растворенных в ацетоне

Пигмент	Длина волны, нм	Коэффициент молярного поглощения, М ⁻¹ см ⁻¹	Светопоглощение <i>D</i> , усл. ед.	Концентрация пигмента, мМ
Хлорофилл <i>a</i>	663	75,05		
	615	14,03		
	580	7,75		
	535	3,47		
	430	94,71		
	410	68,9		
Хлорофилл <i>b</i>	645	47,0		
	595	10,3		
	455	133,3		

Рассчитать концентрацию пигмента (ммоль/л) по формуле

$$C = \frac{dD}{\varepsilon \cdot l},$$

где dD — светопоглощение раствора, усл. ед.; ε — коэффициент молярного поглощения, М⁻¹см⁻¹; l — ширина кюветы, см.

Оформление работы. Записать результаты хроматографических исследований пигментов, оценить их растворимость в смеси органических растворителей и рассчитать концентрацию пигментов в растворе.

7.13. ПОЛУЧЕНИЕ ГЕМИНА С ПОМОЩЬЮ ОРГАНИЧЕСКОГО РАСТВОРИТЕЛЯ

Гем входит в состав гемсодержащих белков (гемоглобин, миоглобин, пероксидаза, каталаза и др.). Основу гема составляет протопорфирин IX, пирольные атомы азота которого координируют с атомом железа. Приставки геми- и гемо- происходят от названий железопорфириновых группировок, при этом железо (II) порфириновый комплекс называют гемом, а железо (III) порфирин — гемином. Атом железа в оксигемоглобине (HbO_2) расположен в плоскости порфиринового кольца, а в высокоспиновом дезоксигемоглобине — выступает на $0,8 \text{ \AA}$ в направлении белкового лиганда, и координационное число его равно пяти. Гем расположен внутри складки или «кармана», образуемого белковой цепью. С проксимальной стороны в цепи гемоглобина с железом гема координирован His-92, а в дистальной области расположен His-63. Наличие Val-67 и Phe-42 вблизи His-63 придает активному центру этого гембелка гидрофобный характер.

Принцип метода. Гемин нерастворим в воде, поэтому для его экстракции чаще всего используют органические растворители (ацетон, метилэтилкетон, этилацетат, хлороформ и др.).

Процесс экстракции активно протекает в кислой среде, в которой происходит частичная денатурация белков, позволяющая легко извлекать гем из структуры белка.

Оборудование: центрифуга; аналитические весы; водяная баня; делительная воронка; лиофильная сушка.

Посуда: колбы на 100 мл — 1 шт., на 1 л — 2 шт.; химический стакан на 500 мл; пипетка на 5 мл.

Материалы и реактивы: кровь КРС; 11,73 М соляная кислота, метилэтилкетон.

Ход работы. К 100 мл крови КРС добавляют равный объем д. в. и после перемешивания раствор замораживают при -20°C . После оттаивания кровь центрифугируют при 3000 об/мин. Осадок отбрасывают, а к надосадочной жидкости при постоянном перемешивании приливают по каплям 11,73 М раствор соляной кислоты до pH 2,5–3,0. Затем раствор гемоглобина переносят в делительную воронку и к нему приливают метилэтилкетон в соотношении 1:1. После

**Основные физические показатели органических растворителей
[Гордон, Форд, 1976]**

	$T_{\text{кип}}, ^\circ\text{C}$	$T_{\text{пл}}, ^\circ\text{C}$	$\rho, \text{г/см}^3$	ε	μ	η
Вода	100,0	0,0	1,00	78,5	1,84	10,1
Этанол	78,3	-114,5	0,785	24,3	1,69	10,8
Метанол	64,5	-97,5	0,791	32,6	1,70	5,45
Этилацетат	77,1	-83,6	0,900	6,02	1,78	4,41
Ацетон	56,2	-95,4	0,790	2,7	2,88	3,16
Метилэтилкетон	79,6	-86,0	0,805	18,5	2,5	36,5
Хлороформ	61,7	-63,5	1,48	4,7	1,87	5,42
Четыреххлористый углерод	76,5	-23,0	1,59	2,23	0	9,69
Глицерин	290,0	20,0	1,261	42,5	2,56	9450,0

$T_{\text{пл}}$ и $T_{\text{кип}}$ — температура плавления и кипения; ρ — плотность; ε — диэлектрическая проницаемость; μ — дипольный момент; η — вязкость.

интенсивного встряхивания гемин переходит в метилэтилкетон и этот слой жидкости осторожно отделяют.

Гемин концентрируют на водяной бане при 80°C , а затем лиофилизируют и взвешивают. Полученный гемин должен иметь темно-коричневую окраску.

Оформление работы. Записать методику проведения опыта и рассчитать процент выхода гемина.

7.14. ПОЛУЧЕНИЕ ГЕМИНА С ПОМОЩЬЮ ПЕПСИНА

Принцип метода. Для получения гемина используют кровь КРС, которая свертывается при $+4^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Сыворотку крови сливают, а кровяной сгусток продавливают через сито. К полученному раствору гемоглобина и остатков эритроцитов добавляют раствор, содержащий пепсин в растворе соляной кислоты и хлористого натрия. После гидролиза гемин извлекают из смеси ацетоном, а затем проводят диализ и лиофилизацию.

Оборудование: термостат; роторный испаритель; аналитические весы; делительная воронка; лиофильная сушка.

Посуда: колбы на 100 мл — 1 шт., на 1 л — 2 шт.; химический стакан на 500 мл; пипетка на 5 мл.

Материалы и реактивы: кровь КРС; пепсин; 36%-ная HCl; натрий хлористый; ацетон.

Приготовление растворов. Раствор соляной кислоты готовят, растворяя 8,5 мл 11,73 М раствора соляной кислоты в 991,5 мл д. в.

Раствор для гидролиза: в колбу на 1 л вносят 40 г пепсина, 10 г NaCl и объем доводят до метки 0,1 М раствором HCl.

Ход работы. 100 мл крови КРС оставляют на сутки в холодильнике при + 4°C. После этого верхний слой жидкости осторожно сливают, не повреждая образовавшегося сгустка форменных элементов крови. Сгустки крови промываются 3–4 раза дистиллированной водой при температуре 23°C, до получения промывочной воды слабо-розового цвета. После промывания сгустки продавливают через сито с ячейками в 1 мм. При этом нити фибрина должны оставаться на поверхности сита, а гемоглобин и остатки эритроцитов собираются в сосуд. Затем к полученному раствору гемоглобина с остатками эритроцитов добавляют раствор для гидролиза белков в соотношении 1:25 (на 1 мл раствора гемоглобина 25 мл раствора для гидролиза белков). После этого вся смесь помещается в термостат на 24 ч при 37°C. Затем смесь переносят в делительную воронку и к ней добавляют ацетон в соотношении 1:1. После интенсивного встряхивания гемин переходит в ацетон и этот слой жидкости осторожно отделяют.

Вначале гемин концентрируют на роторном испарителе в течение 4–5 ч, а затем помещают в диализный мешочек из целлофана и подвергают диализу в течение 24 ч против д. в. После диализа гемин лиофилизируют и взвешивают. Полученный гемин должен иметь темно-коричневую окраску.

Оформление работы. Записать методику проведения опыта и рассчитать процент выхода гемина.

7.15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЕМИНА

Принцип метода. Гемин в водных растворах практически нерастворим, поэтому для повышения его растворимости в водные растворы добавляют различные растворители. В зависимости от природы и концентрации растворителя

пигмент в водно-органических растворах может находиться как в димерной, так и мономерной форме. При использовании в качестве растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) было показано, что при 1% -ной концентрации ДМСО гемин присутствует в растворе в димерной форме. При этом спектр гемина имел размытый максимум поглощения при 395 нм. По мере возрастания концентрации ДМСО наблюдалось смещение первоначального максимума в длинноволновую область спектра и происходило возрастание поглощения с появлением максимума поглощения при 402 нм, что соответствует присутствию в растворе мономерной формы гемина, как показано в таблице 7.8.

Таблица 7.8

Величины коэффициента молярного поглощения мономерной формы гемина в зависимости от концентрации ДМСО в растворе [Первошикова, Мальцева, 2008]

№ п/п	Концентрация ДМСО в растворе, %	Светопоглощение D , усл. ед.	Коэффициент молярного поглощения ϵ , $10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
1	20,0	0,607	60,7
2	40,0	0,830	83,0
3	60,0	0,978	97,8
4	80,0	1,082	108,2

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы.

Посуда: колба на 100 мл; пипетка на 5 мл.

Материалы и реактивы: гемин; 60% -ный раствор диметилсульфоксида.

Приготовление растворов. Раствор диметилсульфоксида готовят, растворяя 60 г навески в 40 мл д. в.

Раствор гемина готовят в два этапа. Вначале готовят 1 мМ раствор гемина, растворяя навеску (0,652 мг/мл) в 60% -ном растворе ДМСО. Затем исходный 1 мМ раствор гемина разбавляют в 100 раз 60% -ным раствором ДМСО. Для исследований может использоваться 10 мкМ раствор гемина в 60% -ном ДМСО.

Ход работы. В спектрофотометрическую кювету вносят 3,0 мл 10 мкМ раствора гемина в 60% -ном ДМСО. Спектры поглощения мономерной формы гемина записывали на спектрофотометре путем сканирования длин волн с 450 до

350 нм, со скоростью 100 нм/мин. Контролем служит кювета с 60% -ным раствором ДМСО.

Метод расчета. Концентрацию гемина ($C_{\text{гемин}}$, мкмоль/л или мкМ) определяют по следующей формуле:

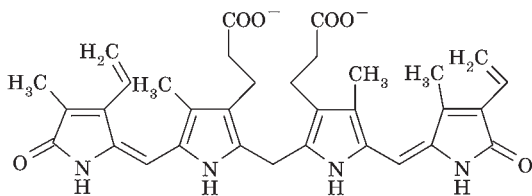
$$C_{\text{гемин}} = \frac{dD}{\varepsilon \cdot l},$$

где dD — светопоглощение раствора гемина при 402 нм, усл. ед.; ε — коэффициент молярного поглощения ($\varepsilon_{402} = 97,8 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$); l — ширина кюветы, см.

Оформление работы. Записать спектр поглощения гемина, определить максимумы поглощения, рассчитать концентрацию пигмента в 60% -ном растворе ДМСО.

7.16. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ДИАЗОРЕАКТИВА (ПО ЕНДРАССИКУ — ГРОФА)

Принцип метода. Билирубин является пигментом, имеющим красновато-желтый цвет. Билирубин образуется в организме в результате распада гемоглобина, цитохромов, миоглобина, каталазы и других гемсодержащих белков.



Билирубин

Распад осуществляется ретикулоэндотелиоцитами, которые находятся в печени, костном мозге и селезенке. В сыворотке крови определяются два вида билирубинов: нерастворимый, образующий связь с белками, и растворимый, связанный с глюкуроновой кислотой. Вместе обе формы составляют общий билирубин.

Для определения билирубина используется диазосмесь, основным компонентом которой является сульфаниловая

кислота. При взаимодействии сульфаниловой кислоты с NaNO_2 образуется диазофенилсульфоновая кислота, реагирующая со связанным с глюкуроновой кислотой билирубином сыворотки крови (прямой билирубин). При этом раствор окрашивается в розово-фиолетовый цвет с максимумом поглощения при 546 нм.

При добавлении к сыворотке крови кофеинового реактива несвязанный билирубин переходит в диссоциированное состояние, что позволяет ему реагировать со смесью диазореактивов (общий билирубин). При этом раствор так же окрашивается в розово-фиолетовый цвет. По разнице между общим и связанным билирубином находят содержание несвязанного билирубина (непрямой билирубин).

Оборудование: ФЭК; аналитические весы; водяная баня; штатив; шейкер.

Посуда: колбы на 25 мл — 1 шт., на 100 мл — 2 шт., на 1 л — 1 шт.; пипетки на 1 мл — 3 шт., на 2 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: сыворотка крови; билирубин; кофеиновый реактив; 0,9% -ный раствор NaCl ; NaNO_2 ; концентрированная HCl ($\rho = 1,19 \text{ г/см}^3$); диазосмесь; 96% -ный этиловый спирт; хлороформ.

Приготовление растворов. Для приготовления кофеинового реактива в мерную колбу на 100 мл вносят 5 г чистого кофеина, 7,5 г бензойнокислого натрия ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COONa}$), 12,5 г ацетата натрия (CH_3COONa) и при нагревании растворяют все компоненты в д. в.

Диазореактив 1 готовят в колбе на 1 л, куда вначале вносят 5 г сульфаниловой кислоты, 400 мл д. в. и 15 мл концентрированной HCl . После растворения сульфаниловой кислоты объем колбы доводят до метки д. в.

Диазореактив 2 готовят в колбе на 100 мл, куда вносят 0,5 г NaNO_2 и 99,5 мл д. в. Реактив хранится в банке из темного стекла и пригоден к использованию до появления желтой окраски раствора.

Диазосмесь готовится перед определением путем смешивания диазореактива 1 и диазореактива 2 в соотношении 10:0,3 (10 частей диазореактива 1 смешивается с 0,3 частями диазореактива 2).

Стандартный раствор билирубина готовят, растворяя вначале 10 мг билирубина в 5 мл хлороформа, а затем добавляем 20 мл 96% -ного этилового спирта. В спиртово-хлороформном растворе содержится 0,4 мг/мл (40 мг%) билирубина. Затем отбираем 0,5 мл спиртово-хлороформного раствора билирубина и добавляем 9,5 мл 0,9% -ного NaCl. В полученном стандартном растворе содержится 0,02 мг/мл (2 мг%) билирубина, что соответствует 34,2 мкМ раствору билирубина. Для определения светопоглощения билирубина в стандартном растворе необходимо отобрать в две пробирки (стандарт и контроль) реактивы, как показано в таблице 7.9.

Таблица 7.9

Растворы и порядок их внесения в пробирки при определении светопоглощения стандартного раствора билирубина

Реактивы	Стандарт	Контроль
Стандартный раствор билирубина, мл	0,50	0,50
Кофейный реактив, мл	1,75	1,75
0,9% -ный NaCl, мл	—	0,25
Диазосмесь, мл	0,25	—
Светопоглощение D , усл. ед.		

После перемешивания через 20 мин производят измерение на ФЭКе при 500–560 нм против контроля. Данные записывают в таблицу.

Ход работы. В 3 пробирки (общий билирубин, связанный билирубин и контроль) вносят реактивы, как показано в таблице 7.10.

Таблица 7.10

Растворы и порядок их внесения в пробирки при определении билирубина в сыворотке крови

Реактивы	Общий билирубин	Связанный билирубин	Контроль
Сыворотка крови, мл	0,50	0,50	0,50
Кофейный реактив, мл	1,75	—	1,75
0,9% -ный NaCl, мл	—	1,75	0,25
Диазосмесь, мл	0,25	0,25	—
Светопоглощение D , усл. ед.			

После перемешивания растворов через 5–10 мин вначале определяют светопоглощение связанного билирубина, а затем через 20 мин — общий билирубин. Измерения производят на ФЭКе при 500–560 нм против контроля. Данные записывают в таблицу.

Метод расчета. Концентрацию билирубина в сыворотке крови ($C_{\text{оп}}$, мг% или мкмоль/л) определяют по следующей формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot D_{\text{оп}}}{D_{\text{ст}}},$$

где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытного образца, усл. ед.;
 $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение стандартного раствора, усл. ед.;
 $C_{\text{ст}}$ — содержание билирубина в стандартном растворе, мг% или мкмоль/л.

Оформление работы. Записать методику и определить содержание билирубина в исследуемой сыворотке крови.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие биогенные молекулы относятся к витаминам?
2. Какими свойствами обладают витамины?
3. На чем основана классификация витаминов?
4. Перечислить витамины, растворимые в неполярных растворителях.
5. Назвать витамины, растворимые в полярных растворителях.
6. Написать формулы витаминов, растворимых в полярных растворителях и рассказать об их биологической роли.
7. Рассказать о витаминах, являющихся предшественниками кофакторов.
8. Указать особенности строения и описать механизмы действия витаминов, растворимых в неполярных растворителях.
9. Рассказать о значении аскорбиновой кислоты для живых организмов.
10. Какой метод используется для определения содержания аскорбиновой кислоты в растительных и животных тканях?
11. Написать схему опыта выделения и очистки дигидрокверцетина.
12. В чем преимущество ферментативного метода получения кверцетина?
13. Назвать витамины, которые служат предшественниками коферментов.

14. Рассказать о роли коферментов в механизме действия ферментов.

15. Какие витамины входят в состав коферментов?

16. Рассказать о роли НАД и НАДФ в механизме действия де-гидрогеназ.

17. Чем отличаются спектры поглощения восстановленных и окисленных форм НАД и НАДФ?

18. Раскрыть роль хлорофилла в процессе фотосинтеза.

19. Написать схему метода получения хлорофилла.

20. Какие методы используются для разделения и идентификации пигментов растений?

21. Написать схемы опытов получения гемина с помощью органического растворителя и пепсина, указать особенности их проведения.

22. Охарактеризовать физико-химические свойства гемина и написать его структурную формулу.

23. Продуктом распада каких биогенных молекул является билирубин?

Ферментами (энзимами) являются белки, имеющие функционально активную третичную или четвертичную структуру, обладающие каталитической активностью, способные ускорять протекание химических реакций в клетках живых организмов. В настоящее время в соответствии с типом катализируемой реакции ферменты сгруппированы в 6 классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы.

1-й класс. Оксидоредуктазы, катализируют реакции окисления и восстановления.

2-й класс. Трансферазы, катализируют реакции переноса различных групп (метильные, гидроксиметильные, формильные, карбоксильные, карбамоильные, альдегидные, ацильные, алкильные, аминные и др.) от одного субстрата (донор) к другому (акцептор).

3-й класс. Гидролазы, катализируют реакции, сопровождаемые разрывами связей в молекуле субстрата, протекающие с участием молекулы воды.

4-й класс. Лиазы, катализируют реакции разрыва C—C, C—O, C—N и других связей в субстрате без присоединения молекулы воды или окисления.

5-й класс. Изомеразы, катализируют реакции внутримолекулярного превращения (рацемизация или эпимеризация).

6-й класс. Лигазы или синтетазы, катализируют реакции синтеза, т. е. соединения двух и более молекул, используя АТФ.

От обычных функциональных белков ферменты отличаются тем, 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. При этом *субстратом* называется химическое соединение, претерпевающее изменение в ходе каталитического процесса. 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. Хотя сами регуляторы при этом не претерпевают изменений.

Все биокатализаторы являются белками, поэтому через упорядоченный синтез белков, информация о которых заложена в геноме клетки, может осуществляться управление химическими реакциями, протекающими в клетке. Суммарные энергетические затраты на синтез ферментов и поддержание их высокой активности в клетке очень значительны, поэтому ферменты, синтезируемые в клетке в очень малых количествах, должны обладать высокой каталитической активностью и специфичностью. С помощью ферментов определяется спектр биогенных молекул, которые должны быть метаболизированы в клетках, проявляется качественный и количественный состав биогенных молекул живых организмов и скорость их метаболизации.

По размерам белковая глобула фермента во много раз превышает размеры субстрата. Это, возможно, обусловлено тем, что поверхностные аминокислотные остатки апобелка картируют поверхность клетки, определяя место связывания фермента на поверхности ее мембраны. При этом связывание поверхностных групп белка с функциональными группами мембранных структур определяет не только глубину его погружения в структуру мембраны, но и силу связывания белковой глобулы с поверхностными молекулами мембраны.

В активном центре фермента могут располагаться аминокислотные остатки, содержащие различные функциональные группы, которые принимают участие в каталитическом процессе. Условно активный центр фермента можно разделить на два участка: сорбционный, функциональные группы которого отвечают за связывание субстрата в активном центре фермента, и каталитический, в котором

происходит превращение субстрата. Размер активного центра фермента определяется размером субстрата. Геометрия расположения функциональных групп активного центра соответствует природе субстрата, определяя эффективность его связывания и превращение в ходе химической реакции. Константа, характеризующая эффективность превращения субстрата в активном центре фермента, называется каталитической (k_{cat}), а константа, определяющая сродство субстрата к ферменту, — константа связывания ($K_s \approx K_m$). Величины k_{cat} и K_m , определяемые в стационарных условиях, являются константами лимитирующих стадий ферментативного процесса. Согласованное действие всех ферментов клеток растений обуславливает в совокупности метаболизм живого организма.

Ферментативные реакции чаще всего протекают с участием двух и более субстратов, одним из которых может быть кофермент (НАД, НАДФ, ФАД, КоА и др.). Поэтому при определении скорости ферментативной реакции в супернатанте необходимо, чтобы в инкубационной среде субстрат и кофактор всегда присутствовали в насыщающих концентрациях. При этом скорость ферментативной реакции будет равна максимальной (V_m) и не зависящей от концентрации субстратов. Кроме того, величины рН среды и концентрация фермента должны быть оптимальными.

Для оценки действия фермента в гомогенатах и супернатантах реакцию проводят как в отсутствие биокатализатора (v_1), так и в его присутствии (v_2). При этом v_2 является суммарной скоростью неэнзиматического и энзиматического процессов. Поэтому скорость ферментативной реакции (v_0) определяют путем вычитания из суммарной скорости (v_2) скорости неэнзиматической реакции (v_1).

Действие эффекторов (активаторов и ингибиторов) определяют с помощью оценки величин констант активирования (K_a) и ингибирования (K_i), которые в стационарных условиях исследования ферментативных реакций фактически являются равновесными константами.

Активность фермента зависит от проявления действия факторов среды и от свойств фермента. К факторам внешней среды можно отнести следующие: природа

субстрата (субстратов) и их концентрации; природа среды раствора; природа микросреды активного центра; температура, УФ-облучение, давление; рН среды; присутствие активаторов и ингибиторов; ионная сила раствора и др.

С повышением температуры активность ферментов возрастает, однако при температуре выше 40–60°C наблюдается понижение активности фермента из-за разрушения нативной структуры белка. Возрастание температуры сопровождается увеличением подвижности функциональных групп в области активного центра и изменением конформации белковой глобулы, что проявляется в денатурации фермента.

Кислотность среды может оказывать влияние на активность фермента путем изменения состояния ионизирующих групп активного центра и функциональных групп субстрата, характеризующихся определенными величинами pK . На активность фермента может также повлиять ионизация групп, входящих в состав белковой глобулы, преимущественно поверхностных аминокислотных остатков, приводящих к изменению конформации апобелка.

На поверхности белковой глобулы фермента, помимо активного центра, может дополнительно присутствовать регуляторный участок, называемый *аллостерическим центром*. В этом центре могут связываться различные низкомолекулярные вещества (эффекторы), отличающиеся по строению от субстратов. Связывание эффекторов в аллостерическом центре обуславливает конформационные перестройки белковой глобулы, что приводит к изменению активности фермента. При этом активность фермента может повышаться или понижаться. Ферменты, имеющие такой механизм регулирования активности, называются *аллостерическими ферментами*. Аллостерический тип взаимодействия проявляется в S-образном характере кривой зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата или эффектора. Такая зависимость обусловлена кооперативным механизмом, который проявляется в том, что связывание одной молекулы субстрата облегчает связывание второй молекулы субстрата, ускоряя протекание каталитической реакции.

Кроме того, в клетках могут присутствовать группы ферментов, имеющих одинаковый механизм действия, обладающих схожей субстратной специфичностью, но отличающиеся по физико-химическим свойствам — *изоферменты*. Различия между изоферментами проявляются в аминокислотном составе, сродстве к субстратам, температурном и рН-оптимумах, действии ингибиторов и активаторов.

Изоферменты можно разделить с помощью электрофореза, хроматографии, гель-фильтрации, ультрацентрифугирования. Синтез субъединиц изоферментов с четвертичной структурой находится под контролем различных генов, экспрессия которых зависит от их локализации в различных тканях растительного и животного организмов.

Варьирование изоферментного состава сопровождается повышением адаптационных возможностей растительно-го и животного организмов, позволяя им направленно изменять активность метаболических процессов, оказывая влияние на рост и деление клеток, развитие живых организмов, которые способны за счет этого выработать механизмы, обуславливающие их приспособленность к окружающей среде.

Неактивные формы ферментов (проферменты), относящихся к группе протеиназ (сериновые, тиоловые, кислые), называются *зимогенами*. Синтез зимогенов осуществляется на рибосомах эндоплазматического ретикулума особыми секреторными клетками в виде зимогенных гранул, которые после завершения процесса мигрируют к поверхности клеток и затем секретируются в окружающую среду. Достигнув места действия, они превращаются в активные формы ферментов. К группе зимогенов относятся пепсиноген, активной формой которого является пепсин (основной протеолитический фермент желудочного сока), трипсиноген — трипсин, химотрипсиноген — химотрипсин, прокарбоксипептидазы — карбоксипептидазы (ферменты поджелудочной железы) и др. Кроме того, к зимогенам относятся ферменты свертывания крови (факторы свертывания крови), компоненты и факторы системы комплемента.

Интегрированность ферментов в ассоциативные комплексы обусловлена необходимостью проявления согласованного их действия в едином метаболическом процессе, протекающем в клетках живого организма. Образование мультиферментных комплексов происходит на поверхности или в структуре клеточных мембран. При этом обратимая адсорбция ферментов может выполнять роль регулятора каталитической активности, обеспечивая компартментализацию метаболитов. Мультиферментные комплексы, адсорбированные на мембранах, обычно проявляют большую стабильность к действию денатурирующих факторов (температура, кислоты, щелочи, модификаторы и др.), чем индивидуальные формы ферментов. В действии ферментов ассоциированных комплексов обычно проявляется эстафетный механизм, который осуществляется за счет того, что метаболиты остаются вблизи поверхности комплекса, обеспечивая последовательность протекания каталитических реакций. Такой механизм реализуется в действии ферментов гликолиза, пировуат- и α -кетоглутаратдегидрогеназных комплексов, цикла трикарбоновых кислот и др. Упорядоченная сборка ферментов единого метаболического процесса создает условия для согласованного действия всех ферментов. В образовании комплекса принимает участие иницирующий формирование метаболита фермент. Так, для ферментов цикла трикарбоновых кислот таким ферментом служит сукцинатдегидрогеназа. Образование сложных ферментных комплексов, участвующих в формировании пор мембран, обуславливает их участие в активном транспорте метаболитов через мембраны. Примером таких систем могут быть Na^+ , K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза, H^+ -АТФаза и др.

Основной функцией мультиферментных комплексов является повышение эффективности действия ферментов, обуславливающее их взаимную зависимость и кооперативность действия при минимуме энергетических затрат, повышающее при этом каталитическую активность и термостабильность ферментативного комплекса с возможностью реализации регуляторных механизмов в ассоциированном комплексе.

8.1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

8.1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРОКСИДАЗЫ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИ

Принцип метода. Пероксидаза относится к окислительно-восстановительным гемсодержащим ферментам. В состав холофермента входит простетическая группа феррипротопорфирин IX (гемин), который можно обратимо отделить от белка при кислых pH. Белковая часть пероксидазы состоит из одной полипептидной цепи в 308 аминокислотных остатков. Нативный фермент имеет молекулярную массу, близкую к 44 кДа. Наличие гемина обеспечивает светопоглощение фермента в водных или буферных растворах в видимой и УФ-области. При этом водные растворы пероксидазы имеют коричневый цвет. В спектре поглощения пероксидазы присутствует характерный максимум в области Соре при 403 нм с коэффициентом молярного поглощения $102\,000\text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Чистота препарата определяется по индексу $RZ = D_{403}/D_{280}$. Для высокоочищенных препаратов пероксидазы $RZ = 3,55$.

Оборудование: спектрофотометр.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетка на 5 мл — 2 шт.

Материалы и реактивы: лиофилизированный препарат пероксидазы ($RZ = 3,0$); 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0.

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на pH-метре до pH 7,0. Раствор пероксидазы (0,4 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0.

Ход работы. В спектрофотометрическую кювету вносят 3,0 мл раствора пероксидазы. Спектры поглощения пероксидазы записывают на спектрофотометре путем сканирования длин волн с 700 до 250 нм, со скоростью 100 нм/мин. Контролем служит кювета с 0,1 М Na-фосфатным буфером, pH 7,0.

Метод расчета. Концентрацию фермента ($C_{\text{по}}$, мкмоль/л или мкМ) определяют по следующей формуле:

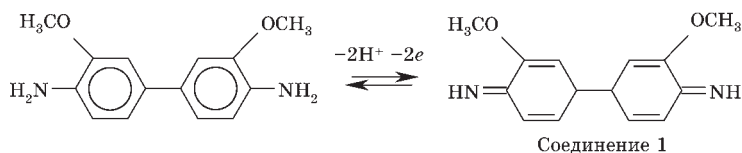
$$C_{\text{по}} = \frac{dD}{\varepsilon \cdot l},$$

где dD — светопоглощение раствора фермента при 403 нм, усл. ед.; ε — коэффициент молярного поглощения ($\varepsilon_{403} = 102 \text{ ММ}^{-1}\text{см}^{-1}$); l — ширина кюветы, см.

Оформление работы. Записать спектр поглощения пероксидазы, определить максимумы поглощения, рассчитать концентрацию фермента.

8.1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИН КАТАЛИТИЧЕСКИХ КОНСТАНТ (V_m , K_m , K_{cat}) В РЕАКЦИИ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ *o*-ДИАНИЗИДИНА

Принцип метода. Пероксидаза входит в состав антиоксидантной системы растений, катализирует реакции оксидазного и пероксидазного окисления различных органических и неорганических соединений. Субстратом пероксидазы может быть *o*-дианизидин (3,3'-диметоксибензидин), окисление которого приводит к образованию конечного продукта бис(3,3'-диметокси-4-амино)азобифенила (соединения 2), имеющего максимум поглощения при длине волны 460 нм и коэффициент молярного светопоглощения $\varepsilon_{460} = 3 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$. Это соединение образуется при конденсации двух молекул 4,4'-диимино-3,3'-диметоксибифенила (соединение 1), которое является первичным продуктом окисления *o*-дианизидина.



o-дианизидин и продукт его пероксидазного окисления

Реакция пероксидазного окисления *о*-дианизидина подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен. Изучение кинетики этой реакции позволяет определить основные величины каталитического процесса (V_m , k_{cat} , K_m) и предложить кинетическую схему реакции. По литературным данным, при pH 7,0 величины каталитических констант реакции окисления *о*-дианизидина равны $K_m = 18$ мкМ, $k_{\text{cat}} = 600 \text{ с}^{-1}$.

Оборудование: pH-метр; спектрофотометр; аналитические весы.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт. и 50 мл — 2 шт.; пипетки на 5 мл — 1 шт., 0,2 мл — 2 шт., 0,1 мл — 3 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: пероксидаза из корней хрена (ПХ, $RZ = 1,0\text{--}3,0$), 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0; 4,3 мМ раствор *о*-дианизидина (ОДН); 15,4 мМ раствор перекиси водорода.

Приготовление растворов. *Буферный раствор* готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на pH-метре до pH 7,0.

Раствор о-дианизидина (1,05 мг/мл) готовят, растворяя 52,5 мг навески в 50 мл 96%-ного этанола. Вещество хорошо растворяется при нагревании. Раствор должен быть бесцветным или слегка розовым.

Перекись водорода, 15,4–15,8 мМ водный раствор, готовят на спектрофотометре со светопоглощением 1,12–1,15 усл. ед., при длине волны 230 нм ($\epsilon = 72,7 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Раствор пероксидазы из корней хрена (0,16 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,1 М Na-фосфатного буфера pH 7,0. При этом концентрация пероксидазы должна быть равна 4 мкМ ($D_{403} = 0,4$ усл. ед.). Для выполнения работы требуется разбавить исходный раствор фермента в 1000 раз, до 4 нМ.

Ход работы. При выполнении кинетических исследований ферментативных реакций с участием двух субстратов придерживаются следующих правил. Вначале варьируется концентрация одного из субстратов, тогда как второй субстрат присутствует в инкубационной смеси в насыщающей концентрации. Затем порядок выполнения исследований меняется. При этом объем инкубируемой смеси всегда остается постоянным.

Определение V_m , K_m , k_{cat} по *о*-дианизидину.

Вначале в кювету вносят 4,3 мМ раствор *о*-дианизидина и 0,1 М Na-фосфатный буфер, объемы которых варьируют в каждом измерении, как показано в таблице.

Кроме этого, в кювету при каждом измерении добавляяют 0,1 мл 4,0 нМ раствора пероксидазы и после перемешивания реакцию инициируют введением 0,1 мл 15,4 мМ раствора H_2O_2 , а затем еще раз перемешивают содержимое кюветы и регистрируют показания светопоглощения на спектрофотометре при 460 нм в течение 1 мин. Значение начальной скорости (v_0) ферментативной реакции (усл. ед./мин) определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D , t). Данные записывают в таблицу 8.1.

Таблица 8.1

Величины объемов субстрата и буфера, вносимых в кювету при каждом измерении активности пероксидазы

Измерения	Объем ОДН, мл	Объем 0,1 М Na-фосфатного буфера, мл	v_0 , усл. ед./мин
1	0,05	2,75	
2	0,08	2,72	
3	0,12	2,68	
4	0,20	2,60	

Метод расчета. Величины начальной скорости (мкМ/мин) рассчитывают, используя следующее уравнение:

$$v_0 = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{\varepsilon \cdot l \cdot dt},$$

где dD — величина светопоглощения при 460 нм, усл. ед.; ε — коэффициент молярного светопоглощения ($30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$); V — общий объем раствора в кювете, мл; l — ширина кюветы, см; dt — время реакции, мин.

Из графика изменения начальной скорости (v_0) от концентрации субстрата (S_0) устанавливают соответствие кинетики реакции окисления *о*-дианизидина уравнению Михаэлиса — Ментен.

$$v_0 = \frac{k_{\text{cat}} \cdot E_0 \cdot S_0}{K_m + S_0}.$$

При этом кинетическая кривая должна иметь вид гиперболической функции, на которой проявляются три участка.

На начальном этапе измерений появляется участок I, который проявляется при иницировании каталитического процесса, когда скорость реакции возрастает пропорционально концентрации субстрата (S_0). При этом должны соблюдаться условия стационарности, т. е. концентрация фермент-субстратного комплекса остается постоянной (ста-

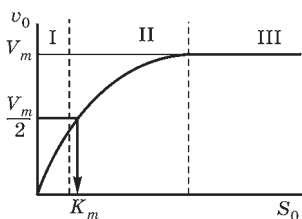


Рис. 8.1
График Михаэлиса — Ментен

ционарной) в ходе ферментативной реакции. По мере возрастания концентрации субстрата отмечается отклонение от линейности (участок II). Дальнейшее увеличение концентрации субстрата приводит к тому, что скорость реакции становится не зависящей от концентрации субстрата (участок III), т. е.

достигается состояние насыщения фермента субстратом. Однако в этих условиях начальная скорость зависит от концентрации фермента. Экспериментальные данные, располагающиеся в области участка II кинетической кривой, используются для построения графика в координатах Лайнуивера — Берка.

Уравнение Лайнуивера — Берка — это способ алгебраического преобразования уравнения Михаэлиса — Ментен с последующей линейризацией экспериментальных данных в двойных обратных величинах

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{S_0},$$

график зависимости в координатах Лайнуивера — Берка ($1/v_0$, $1/S_0$) имеет вид прямой линии, пересекающей ось абсцисс и ординат в точках $-1/K_m$ и $1/V_m$ соответственно,

анализируя который можно определить величины (V_m и K_m).

Поэтому необходимо предварительно произвести пересчет полученных экспериментальных данных в обратные величины, которые записывают в таблицу 8.2.

На основании данных таблицы нужно построить график в координатах Лайнуивера — Берка ($1/v_0$, $1/\text{ОДН}$), который должен иметь вид прямой линии, пересекающей ось абсцисс и ординат в точках $-1/K_{m(\text{каж})}$ и $1/V_m$ соответственно.

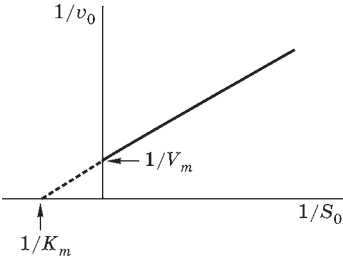


Рис. 8.2
График Лайнуивера — Берка

Таблица 8.2
Концентрации о-дианизидина и значения скоростей пероксидазной реакции окисления о-дианизидина, катализируемых пероксидазой из корней хрена. Условия опыта: рН 7,0, 0,13 нМ пероксидаза

Измерения	ОДН, мкМ	1/ОДН, мМ ⁻¹	v_0 , мкМ/мин	1/ v_0 , мин/мкМ
1	71,7	13,95		
2	114,7	8,72		
3	172,0	5,81		
4	286,7	3,48		

Значения k_{cat} определяют из уравнения

$$k_{\text{cat}} = V_m/E_0,$$

где E_0 — концентрация фермента.

Для обработки кинетических данных ферментативной реакции можно использовать уравнение Иди, которое получают путем преобразования уравнения Михаэлиса — Ментен:

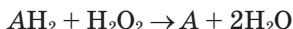
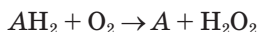
$$v_0 = V_m - K_m \frac{v_0}{S_0}.$$

При построении графика экспериментальных данных в координатах Иди (v_0 , v_0/S_0) полученная прямая линия пересекает ось ординат в точке V_m , с тангенсом угла наклона $-K_m$.

Оформление работы. Записать условия опыта, построить график в координатах Лайнуивера — Берка и определить величины V_m , K_m , k_{cat} .

8.1.3. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРОКСИДАЗЫ НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Принцип метода. Пероксидаза (ПО) катализирует реакции окисления неорганических и органических соединений с участием двух субстратов.



При насыщающих концентрациях субстратов скорость ферментативной реакции достигает максимальной величины (V_m). Это становится возможным при условии, когда субстраты присутствуют в инкубационной среде в избытке по отношению к ферменту ($S_0 \gg E_0$). При этом концентрации субстратов должны быть намного больше значения их констант Михаэлиса — Ментен ($S_0 \gg K_m$). Ферментативная реакция протекает при условии образования стабильного фермент-субстратного комплекса. В этих условиях величина начальной скорости ферментативной реакции прямо пропорциональна концентрации фермента. Оксидазным субстратом может быть аскорбиновая кислота, а пероксидазным — *o*-дианизидин.

Оборудование: рН-метр; спектрофотометр; аналитические весы.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт. и 50 мл — 2 шт.; пипетки на 5 мл — 1 шт., 0,2 мл — 2 шт., 0,1 мл — 3 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: пероксидаза из корней хрена (ПХ, $RZ = 1,0-3,0$), 0,1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0; 4,3 мМ раствор *o*-дианизидина (ОДН); 15,4 мМ раствор перекиси водорода.

Приготовление растворов. *Буферный раствор* готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на рН-метре до рН 7,0.

Раствор o-дианизидина (1,05 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 96% -ном этаноле. Вещество хорошо растворяется

при нагревании. Раствор должен быть бесцветным или слегка розовым.

Перекись водорода, 15,4–15,8 мМ водный раствор, готовят на спектрофотометре со светопоглощением 1,12–1,15 усл. ед., при длине волны 230 нм ($\varepsilon = 72,7 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Раствор пероксидазы из корней хрена (0,16 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,1 М Na-фосфатного буфера pH 7,0. При этом концентрация пероксидазы должна быть равна 4 мкМ ($D_{403} = 0,4$ усл. ед.). Для выполнения работы требуется разбавить исходный раствор фермента в 1000 раз, до 4 нМ.

Ход работы. Вначале опыта в каждую кювету вносят по 0,1 мл 4,3 мМ раствора *o*-дианизидина, а затем 0,1 М Na-фосфатный буфер и раствор пероксидазы, объемы которых варьируют в каждом измерении, как показано в таблице 8.3.

Таблица 8.3

Объемы фермента и буфера, вносимые в кювету при каждом измерении активности пероксидазы

№ опыта	Объем буфера, мл	Объем ПО, мл	ПО в кювете, нМ	V_m , усл. ед./мин	V_m , мкМ/мин
1	2,75	0,05			
2	2,70	0,10			
3	2,65	0,15			
4	2,60	0,20			

После перемешивания реакцию инициируют введением 0,1 мл 15,4 мМ раствора H_2O_2 . Затем снова перемешивают содержимое кюветы и регистрируют показания светопоглощения на спектрофотометре при 460 нм в течение 1 мин. Значение начальной скорости (v_0) ферментативной реакции (усл. ед./мин) определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D , t). Данные записывают в таблицу.

Метод расчета. Величины начальной скорости (мкМ/мин) рассчитывают, используя следующее уравнение:

$$v_0 = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{\varepsilon \cdot l \cdot dt},$$

где dD — величина светопоглощения при 460 нм, усл. ед.;
 ε — коэффициент молярного светопоглощения ($30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$);
 l — ширина кюветы, см; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Записать условия опыта. Построить график зависимости величины максимальной скорости (V_m , мкМ/мин) от концентрации пероксидазы ($C_{\text{по}}$, нМ).

8.1.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА ДОСТУПНЫХ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП В ФЕРМЕНТАХ С ПОМОЩЬЮ О-ДИАНИЗИДИНА И ВОДОРАСТВОРИМОГО КАРБОДИИМИДА

Принцип метода. Метод количественного определения карбоксильных групп в ферментах впервые был разработан Кошландом, который предложил для активации СООН-групп использовать водорастворимый карбодиимид, замещаемый в дальнейшем нуклеофилом. При активации карбоксильных групп карбодиимидами образуются неустойчивые промежуточные производные О-ацилизомочевины. В отсутствие нуклеофила эти производные либо гидролизуются водой (если СООН-группы полностью экспонированы в растворитель), либо перегруппировываются в устойчивые производные N-ацилмочевины, если они маскированы для растворителя и нуклеофила. В присутствии нуклеофила активированные СООН-группы, экспонированные в растворитель, либо гидролизуются, либо ковалентно присоединяют молекулу нуклеофила, а активированные СООН-группы, которые маскированы для растворителя и нуклеофила, претерпевают перегруппировку в N-ацилмочевину, причем последний процесс протекает во много раз медленнее, чем реакции с нуклеофилом. Таким образом, в зависимости от расположения в глобуле и условий модификации карбоксильные группы фермента либо совсем не модифицируются, если находятся вдали от поверхности молекулы и стерически недоступны, либо могут модифицироваться только карбодиимидом, либо только нуклеофилом, либо и тем и другим.

В качестве карбодиимида в данной работе предлагается использовать 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (ЭДПК), а нуклеофила — о-дианизидин (3,3-диметоксибензидин). Последний содержит две амина-

группы с рК 3,6 и 4,7, имеет максимум поглощения при 300 нм ($\epsilon = 16,5 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ в 0,05 М NaCl), не поглощает в видимой области и в данных условиях является высоко-реакционноспособным. *о*-Дианизидин целесообразно использовать при исследовании гемсодержащих белков и ферментов, у которых в спектрах при 300–320 нм наблюдается минимум поглощения ($\epsilon = 15 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$). Кроме того, у модифицированной ЭДПК и *о*-дианизидином пероксидазы отмечается возрастание светопоглощения только в УФ-области, тогда как на полосе Сорс (403 нм) изменений не наблюдается, что дает возможность с большей точностью определять степень модификации COOH-групп фермента.

Оборудование: рН-метр; спектрофотометр; хроматографическая колонка (1×30 см); коллектор фракций.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетки на 0,2 мл — 1 шт., на 1 мл — 1 шт., на 5 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: лиофилизированный препарат пероксидазы ($RZ = 3,0$); 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (ЭДПК); 0,82 мМ раствор *о*-дианизидина; 0,05 М раствор NaCl; 1 М HCl.

Приготовление растворов. Раствор *о*-дианизидина (0,2 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 96%-ном этиловом спирте при нагревании. Раствор NaCl (2,93 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в. Раствор пероксидазы (10 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,05 М NaCl. Раствор 1 М HCl готовят, разбавляя концентрированную соляную кислоту д. в.

Ход работы. В пластиковый стакан наливают 2,4 мл 0,05 М раствора NaCl, а затем вносят 58 мг ЭДПК, 0,1 мл 0,25 мМ раствора пероксидазы и 0,5 мл 8,2 мМ раствор *о*-дианизидина. После перемешивания в стакан погружают электроды от рН-метра. Реакцию проводят при температуре 23°C в течение 1,5–4,0 ч, поддерживая рН 5,0 с помощью 1 М HCl.

По окончании реакции избыток реагентов удаляли гель-фильтрацией раствора через колонку (1×30 см) с сефадексом G-25, уравновешенную 0,05 М раствором NaCl. Скорость элюции 22 мл/ч. Светопоглощение элюируемых растворов измеряют при 280 нм с помощью прибора Uvicord (LKB, Швеция) или на спектрофотометре при 403 нм, оборудованном проточной кюветой. Фракцию с наибольшей

концентрацией пероксидазы анализируют на спектрофотометре, записывая спектры светопоглощения нативной и модифицированной пероксидазы путем сканирования длин волн с 700 до 250 нм, со скоростью 100 нм/мин. Контролем служит кювета с 0,05 М NaCl.

Метод расчета. Число присоединившихся к пероксидазе остатков *o*-дианизидина (n) определяют по светопоглощению модифицированной пероксидазы при 305 нм, используя формулу

$$n = \frac{dD - [E] \cdot \epsilon}{[E] \cdot \epsilon'},$$

где dD — светопоглощение модифицированной пероксидазы при 305 нм; $[E]$ — концентрация пероксидазы, определенная по светопоглощению при 403 нм ($\epsilon_{403} = 102 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); ϵ — молярный коэффициент светопоглощения пероксидазы при 305 нм, равный $16,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; ϵ' — молярный коэффициент светопоглощения присоединенных к ферменту остатков *o*-дианизидина в 0,05 М NaCl, равный $19,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Оформление работы. Записать условия проведения модификации карбоксильных групп пероксидазы из корней хрена. Определить число доступных COOH-групп фермента, модифицирующихся водорастворимым карбодиимидом и *o*-дианизидином.

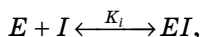
8.1.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ ТИТРОВАНИЯ АКТИВНОГО ЦЕНТРА. ВЫЯВЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫХ SH-ГРУПП ФЕРМЕНТА

Принцип метода. Соединения, содержащие ртуть в низких концентрациях, способны избирательно реагировать с SH-группами белков, и это позволяет использовать для количественного определения SH-групп в белках или ферментах монофункциональные органические соединения ртути типа R-Hg-X (n -хлормеркурибензоат, n -хлормеркурифенилсульфат, гидроксимеркурибензоат и др.).

Алкогольдегидрогеназа катализирует реакции окисления спиртов и восстановления альдегидов в присутствии соответственно окисленных и восстановленных форм НАД.

В активном центре АДГ пшеницы выявлены две SH-группы с pK 7,4 и 8,2, принимающие участие как в реакциях окисления этанола, так и при восстановлении ацетальдегида. Поэтому предложено использовать ртутьсодержащие соединения для титрования активного центра алкогольдегидрогеназы растений.

Титрование алкогольдегидрогеназы можно проводить в широком диапазоне pH: от 6 до 11. Для определения константы ингибирования предложено использовать схему:



где E — фермент; I — ингибитор; EI — фермент-ингибиторный комплекс.

При условии $[E]_0 \approx [I]_0$ с учетом баланса по ферменту $[E]_0 = [E] + [EI]$ и ингибитору $[I]_0 = [I] + [EI]$ определение K_i проводят по уравнению

$$\frac{1}{1 - \alpha} = \frac{[I]_0}{K_i \alpha} - \frac{[E]_0}{K_i},$$

где $\alpha = [EI]/[E] = v_0 - v_i/v_0$ — доля фермента, связанного с ингибитором (v_0 и v_i — скорости ферментативных реакций в отсутствие и в присутствии ингибитора).

Из графика, построенного в координатах $(1/(1 - \alpha), [I]_0/\alpha)$, можно определить концентрацию фермента ($[E]_0$) из отрезка, отсекаемого на оси абсцисс. При этом тангенс угла наклона прямой будет равен $1/K_i$. Расчет концентрации алкогольдегидрогеназы проводят с учетом существования фермента в димерной форме, т. е. на титрование одной молекулы фермента идет две молекулы ингибитора.

Оборудование: спектрофотометр; pH-метр; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы шириной 1 см; пипетки на 0,1 мл — 4 шт.; на 5 мл — 1 шт.; колба на 100 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: 100 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, pH 6,5; 10 мл 11,3 мМ раствора НАДН (8 мг/мл); 177 мл 0,1 М раствора ацетальдегида; 10 мкМ раствора *n*-хлормеркурибензоат-Na; 2,5 мкМ раствора АДГ и супернатанта зерновок пшеницы.

Приготовление рабочих растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы одно- и двухзамещенных фосфатов натрия на рН-метре до рН 6,5; раствор НАДН готовят, растворяя 80 мг в 10 мл дистиллированной воды; раствор ацетальдегида готовят путем прибавления 1 мл 17,7 М раствора ацетальдегида к 176 мл дистиллированной воды. Раствор *n*-хлормеркурибензоат-*Na* готовят в два этапа:

- 1) растворяя 37,9 мг ХМБ в 100 мл д. в.;
- 2) полученный 1 мМ раствор ХМБ разбавляют еще в 100 раз д. в.

Ход определения. В контрольную спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 2,7 мл 0,1 М *Na*-фосфатного буфера, рН 6,0, 0,1 мл 11,3 мМ раствора НАДН и 0,1 мл 2,5 мкМ фермента или супернатанта. Реакцию инициируют введением 0,1 мл 0,1 М раствора ацетальдегида. За ходом реакции следят на спектрофотометре, записывая изменения поглощения раствора при 340 нм в течение 1 мин с интервалом 15–20 с.

Титрование алкогольдегидрогеназы проводят, добавляя в инкубационную смесь вместе с субстратами по 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 и 1,0 мл ХМБ. Реакцию инициируют введением 0,1 мл 0,1 М раствора ацетальдегида.

Метод расчета. За меру активности фермента принимали количество микромолей НАДН, окисленного за 1 мин в отсутствие ХМБ (v_0) и в присутствии ХМБ (v).

Оформление работы. Построить графика в координатах ($1/(1 - \alpha)$, $[I]_0/\alpha$) и определить концентрацию фермента ($[E]_0$) из отрезка, отсекаемого на оси абсцисс.

8.1.6. ВЛИЯНИЕ рН СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ

Принцип метода. Ряд факторов среды (рН и температура), а также присутствие активаторов и ингибиторов могут оказывать влияние на активность ферментов. Пероксидаза относится к группе двухкомпонентных ферментов, в составе которых гемин, представленный протопорфирином IX в комплексе с трехвалентным железом, и полипептидная цепь. Гемин нековалентно закреплен в углублении полипептидной цепи между доменами и удерживается там за

счет гидрофобных связей и солевого мостика, образованного между остатком пропионовой кислоты гемина с одной из аминогрупп апобелка. Гемин можно обратимо отделить от белка при кислых рН. По данным ЯМР-спектроскопии, пятым аксиальным лигандом железа является имидазольная группа гистидинового остатка (Гис42) апобелка. Протонирование и депротонирование имидазола гистидина ($pK \sim 6,0$), входящего в состав активного центра фермента, оказывает влияние на каталитические свойства фермента при различных рН. Оптимум активности фермента приходится на кислые рН и зависит от природы субстрата.

Оборудование: рН-метр; ФЭК; центрифуга.

Посуда: пипетки на 10 мл — 1 шт., 5 мл — 1 шт., 0,2 мл — 1 шт., 0,1 мл — 2 шт., колбы на 500 мл — 5 шт. и 100 мл — 6 шт., пробирки — 6 шт.

Материалы и реактивы: супернатант зерновок пшеницы; 0,1 М натрий-ацетатный буфер (рН 4,0 5,0 6,0) и 0,1 М натрий-фосфатный буфер (рН 6,0, 7,0 8,0); 1 М водный раствор HCl; 4,3 мМ водно-спиртовой раствор *o*-дианизидина; 15,4 мМ раствор перекиси водорода.

Приготовление реактивов. Натрий-ацетатные буферные растворы (рН 4,0, 5,0, 6,0) готовят из исходных 0,1 М водных растворов CH_3COOH и CH_3COONa , а натрий-фосфатные буферные растворы (рН 6,0, 7,0, 8,0) — из исходных 0,1 М водных растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на рН-метре до желаемой величины рН. 1 М раствор HCl готовят, растворяя исходной концентрированной HCl в д. в.

Раствор *o*-дианизидина (4,3 мМ этанольный раствор) готовят, растворяя 105 мг навески в 50 мл 96% -ного этанола. Вещество хорошо растворяется при нагревании. Раствор должен быть бесцветным или слегка розовым.

Перекись водорода 15,4–15,8 мМ водный раствор готовят на спектрофотометре со светопоглощением 1,12–1,15 усл. ед. при длине волны 230 нм ($\epsilon = 72,7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Ход работы. В 6 пробирок последовательно вносят по 0,2 мл супернатанта, 2,6 мл 0,1 М буферные растворы (рН 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0) и по 0,1 мл 4,3 мМ *o*-дианизидина. После перемешивания реакцию во всех пробирках инициируют введением 0,1 мл 15,4 мМ раствора

H_2O_2 . Снова перемешивают и через 1 мин реакцию останавливают добавлением в каждую пробирку по 1 мл 1 М раствора HCl . Затем измеряют светопоглощение растворов в каждой пробирке на ФЭКе при 460–500 нм (зеленый светофильтр).

Т а б л и ц а 8.4

Влияние pH на активность пероксидазы

pH	v_0 , усл. ед./мин	v_0 , мкМ/мин
4,0		
5,0		
6,0		
7,0		
8,0		

Расчет. Активность пероксидазы рассчитывают с помощью следующих формул:

$$v_0 = \frac{dD}{dt} \quad \text{или} \quad v_0 = \frac{dD}{\varepsilon \cdot l \cdot dt},$$

где dD — величина светопоглощения при 460 нм, усл. ед.; ε — коэффициент молярного светопоглощения ($30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$); l — ширина кюветы, см; dt — время реакции, мин.

Определяют активность пероксидазы в каждой пробирке. Затем строят на миллиметровой бумаге график зависимости изменения активности фермента от pH (v_0 , pH).

Оформление работы. Построить график зависимости активности пероксидазы от pH и определить pH-оптимум активности фермента.

8.1.7. КИСЛОТНАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Принцип метода. В каталитическом действии фермента принимают участие аминокислотные остатки, содержащие —COOH, —NH₂, —SH и другие группы, входящие в состав активного центра, протонирование и депротонирование которых может влиять на каталитические свойства фермента. Поэтому активность ферментов зависит от pH среды,

изменение которой может приводить к нарушению нативной структуры апобелка и конформации активного центра, что проявляется в утрате ими каталитических свойств. Для исследования этих процессов предлагается изучить влияние pH среды на активность пероксидазы. Фермент катализирует реакции пероксидазного окисления неорганических и органических соединений перекисью водорода. Активную роль в каталитическом процессе пероксидазы принимает участие Fe^{3+} , координирующее с четырьмя атомами азотов пирролов протопорфирина, проксимальным лигандом которого является остаток имидазола гистидина апобелка (His-170). В процессе восстановления перекиси водорода участвуют His-42 и Arg-38. В координации гема принимают участие остатки фенилаланинов (Phe-41 и Phe-143), роль которых заключается в формировании гидрофобного окружения нековалентно связанного гема и обеспечении его прочного встраивания в белковую глобулу. Субстратсвязывающая площадка для соединений органической природы представлена протяженной гидрофобной областью, включающей Arg-38, Phe-142, Phe-143.

Оборудование: спектрофотометр, pH-метр, аналитические весы.

Посуда: пипетки на 5 мл — 1 шт., 1 мл — 1 шт., 0,2 мл — 3 шт.; пробирки — 2 шт.

Материалы и реактивы: супернатант зерновок пшеницы; 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0; 4,3 мМ водно-спиртовой раствор *o*-дианизидина; 15,4 М водный раствор перекиси водорода; 0,36% -ный водный раствор соляной кислоты.

Приготовление растворов. Буферные растворы готовят путем смешивания 0,1 М одно- и двухзамещенных фосфатов натрия на pH-метре. Раствор *o*-дианизидина готовят, растворяя 105 мг навески в 100 мл 96% -ного этилового спирта. *o*-Дианизидин хорошо растворяется в спирте при нагревании. Исходный водный раствор H_2O_2 готовят из 3% -ного (0,882 М) раствора H_2O_2 на спектрофотометре по светопоглощению при 230 нм до 1,12–1,15 усл. ед. ($\epsilon = 72,7 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$), разбавляя исходный раствор перекиси водорода д. в.

Ход работы. В две пробирки помещают по 0,2 мл супернатанта зерновок пшеницы. В первую пробирку добавляют

2,5 мл 0,36% HCl, во вторую — 2,5 мл буфера. После перемешивания выдерживают 10 мин, после чего в обе пробирки добавляют по 0,1 мл 4,3 мМ *o*-дианизидина и 0,2 мл 15,4 мМ перекиси водорода. Измеряют светопоглощение растворов при 460 нм ($\varepsilon = 30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$). Контролем служит пробирка, в которую вместо перекиси водорода добавляют д. в. Наблюдаемые изменения записывают в таблицу 8.5.

Таблица 8.5

Изучение кислотной денатурации пероксидазы

Реактивы	Пробирки		
	1	2	3 (контроль)
Супернатант, мл	0,2	0,2	0,2
HCl, мл	2,5	—	—
Буфер, мл	—	2,5	2,5
ОДН, мл	0,1	0,1	0,1
Перекись водорода, мл	0,2	0,2	—
Дистиллированная вода, мл	—	—	0,2
Наблюдаемые изменения			

Расчет. Активность пероксидазы рассчитывают по следующей формуле:

$$v_0 = \frac{dD}{\varepsilon \cdot l \cdot dt}, \text{ мкМ/мин,}$$

где dD — светопоглощение раствора при 460 нм, усл. ед.; ε — коэффициент молярного светопоглощения продукта окисления *o*-дианизидина, $\text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$; l — ширина кюветы, см; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Наблюдают за изменением поглощения растворов в пробах и сравнивают полученные результаты.

8.1.8. ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ОЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

Принцип метода. Действие высоких температур способствует как изменениям в структуре фермента, так и в его активном центре. При этом нарушается специфическое

расположение функциональных групп в активном центре, что приводит к утрате ферментом способности катализировать протекание химической реакции. На начальных этапах воздействия температуры отмечается нарушение структуры белковой глобулы фермента, которая при непродолжительном действии высокой температуры могла быть восстановлена до исходной формы. Однако длительное действие температуры приводит к образованию денатурированной формы фермента, которая сопровождается необратимыми изменениями в третичной конформации фермента. Действие высоких температур может проявляться как на изменении активности фермента, так и его стабильности. Последняя характеризует способность фермента длительно сохранять каталитическую активность в определенных условиях среды и температуры. Показатель стабильности обусловлен подвижностью конформационной структуры фермента, которая зависит преимущественно от наличия числа ковалентных дисульфидных ($-S-S-$) связей, обеспечивающих устойчивость третичной конформации белковой глобулы фермента к действию денатурирующих факторов.

Оборудование: рН-метр; спектрофотометр или ФЭК; термостат или водяная баня.

Посуда: пипетки на 5 мл — 1 шт., 0,1 мл — 4 шт.; пробирки — 8 шт.; колбы на 500 мл — 3 шт., 100 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: буфер 0,1 М Na-фосфатный рН 7,0; 4,3 мМ спиртовой раствор *o*-дианизидина; 15,4 мМ водный раствор перекиси водорода; 0,1 мкМ раствор пероксидазы.

Приготовление растворов. Буферные растворы готовят путем смешивания 0,1 М растворов одно- и двухзамещенных фосфатов натрия на рН-метре. Раствор *o*-дианизидина готовят, растворяя 52 мг навески в 50 мл 96% -ного этилового спирта. Раствор перекиси водорода готовят, разбавляя 3% -ный (0,882 М) исходный раствор перекиси дистиллированной водой или на спектрофотометре по поглощению при 230 нм до 1,12–1,15 усл. ед. ($\epsilon = 72,7 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$). Раствор пероксидазы 0,1 мкМ готовят, растворяя навеску лиофилизированной пероксидазы с $RZ = 3,0$ в 0,1 М Na-фосфатном

буфере, рН 7,0. Концентрацию фермента определяют спектрофотометрически при 403 нм ($\epsilon = 102 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Ход работы. В пробирку вносили 1,0 мл 0,1 мкМ раствора пероксидазы в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рН 7,0. Пробирку помещают в термостат с температурой 50°C и затем через 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 и 60 мин инкубации отбирают пробы по 0,1 мл, внося их в пробирки с 9,9 мл 0,1 М Na-фосфатном буфере, рН 7,0. После выдерживания пробирок в течение 24 час при + 4°C определяют активность пероксидазы по *o*-дианизидину при рН 7,0. Максимум светопоглощения продукта окисления *o*-дианизидина при 460 нм ($\epsilon = 30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$). Данные по активности пероксидазы записывают в таблицу.

Таблица 8.6

Данные по термостабильности пероксидазы

Время, мин	v_0 , усл. ед./мин	v_0 , мкМ/мин	$\lg(v_{\text{ин}}/v_0) \cdot 100$
0			
5			
10			
15			
20			
30			
40			
60			

Метод расчета. За единицу активности фермента принимают его количество, окисляющее 1 мкмоль *o*-дианизидина за 1 мин.

Исследования необходимо повторить при 60, 65 и 70°C.

Величину $k_{\text{ин}}$ рассчитывают из тангенса угла наклона экспериментальной кривой зависимости логарифма активности пероксидазы ($\lg(v_{\text{ин}}/v_0) \cdot 100$) от времени (t , мин) инаktivации фермента.

Оформление работы. Построить график полулогарифмической анаморфозы кинетической кривой термоинаktivации нативной пероксидазы при 50, 60, 65 и 70°C и сравнить величины $k_{\text{ин}}$.

8.1.9. ИЗУЧЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ДЕНАТУРАЦИИ ПЕРОКСИДАЗЫ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Принцип метода. В клетках растений ферменты выполняют роль биологических катализаторов. Аналогично белкам, ферменты при повышении температуры изменяют свою конформацию, теряя способность катализировать превращения различных соединений. Так, например, пероксидаза катализирует реакцию окисления *o*-дианизидина перекисью водорода. Однако длительное воздействие высокой температурой может приводить к денатурации белка, уменьшению или полной утрате каталитической активности фермента.

Оборудование: рН-метр; ФЭК; водяная баня или термостат.

Посуда: пипетки на 5 мл — 1 шт., 1 мл — 1 шт.; пробирки — 8 шт., колбы на 500 мл — 1 шт., 100 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: супернатант зерновок пшеницы; буфер 0,1 М Na-фосфат рН 7,0; 4,3 мМ спиртовой раствор *o*-дианизидина; 15,4 мМ водный раствор перекиси водорода.

Приготовление растворов. Буферные растворы готовят путем смешивания 0,1 М растворов одно- и двухзамещенных фосфатов натрия на рН-метре. Раствор *o*-дианизидина готовят, растворяя 52 мг навески в 50 мл 96% -ного этилового спирта. Раствор перекиси водорода готовят, разбавляя 3% -ный (0,882 М) исходный раствор перекиси д. в. на спектрофотометре по светопоглощению при 230 нм до 1,12–1,15 усл. ед. ($\epsilon = 72,7 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Ход работы. В четыре пробирки вносят по 3 мл супернатанта зерновок пшеницы. Первую пробирку оставляют в качестве контроля, три другие пробирки помещают в водяную баню с температурой 60°C на 10, 20 и 30 мин. Через указанные интервалы времени пробирки извлекают и после охлаждения проверяют активность фермента, отбирая по 0,2 мл в чистые пробирки и последовательно добавляя в каждую по 2,1 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, рН 7,0, и 0,1 мл 4,3 мМ раствор, *o*-дианизидина. После перемешивания реакцию инициируют введением 0,1 мл 15,4 мМ раствора H_2O_2 . Активность фермента регистрируют на ФЭКе (спектрофотометре) при 460–500 нм в течение 1 мин. Максимум поглощения продукта окисления *o*-дианизидина при 460 нм ($\epsilon = 30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Метод расчета. За единицу активности фермента принимают его количество, окисляющее 1 мкмоль *o*-дианизидина за 1 мин:

$$v_0 = \frac{dD}{\varepsilon \cdot l \cdot dt}, \text{ мкМ/мин,}$$

где dD — светопоглощение раствора при 460 нм, усл. ед.; ε — коэффициент молярного светопоглощения продукта окисления *o*-дианизидина, $\text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$; l — ширина кюветы, см; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Сравнить величины начальных скоростей реакций пероксидазного окисления *o*-дианизидина в присутствии пероксидазы в опытных и контрольной пробирках.

8.1.10. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Принцип метода. При изучении влияния температуры на скорость ферментативной реакции (V_m , T) чаще всего наблюдается близкая к колоколообразной форме зависимость, с проявлением температурного оптимума реакции, который преимущественно приходится на температуру 40–60°C. При этом возрастание скорости ферментативной реакции обусловлено увеличением подвижности функциональных групп активного центра фермента, возрастанием степени соответствия расположения групп, участвующих в каталитическом процессе, пространственной структуре субстрата. В рамках представлений теории индуцированного соответствия это способствует как улучшению связывания субстрата в активном центре, так и его превращению. Понижение активности фермента при высоких температурах прежде всего вызвано возрастанием конформационной подвижности белковой глобулы фермента, сопровождаемой денатурацией фермента. При этом в растворе обычно присутствуют три формы фермента: нативная, лабильная и денатурированная. Функциональную активность проявляют только первые две формы фермента (нативная и лабильная). На стабильность пероксидазы проростков пшеницы могут оказывать влияние присутствующие в среде посторонние

белки и другие метаболиты. Поэтому стабильность неочищенных препаратов фермента будет всегда выше, чем очищенных форм.

Оборудование: термостат; спектрофотометр с термостатируемой кюветой; рН-метр; аналитические весы; штатив.

Посуда: пипетки на 5 мл — 1 шт., 0,1 мл — 3 шт.; колбы на 500 мл — 3 шт. и 50 мл — 2 шт.; пробирка — 1 шт.

Материалы и реактивы: супернатант зерновок пшеницы; 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0; 4,3 мМ *o*-дианизидин; 31,6 мМ перекись водорода.

Приготовление растворов. *Буферный раствор* готовят из исходных 0,1 М растворов CH_3COOH и CH_3COONa путем их смешивания на рН-метре до рН 5,0. *Раствор o-дианизидина* (1,05 мг/мл) готовят, растворяя 52,5 мг навески в 50 мл 96%-ного этанола. Вещество хорошо растворяется при нагревании. Раствор должен быть бесцветным или слегка розовым. *Перекись водорода* 30,8 мМ водный раствор готовят на спектрофотометре при длине волны 230 нм ($\epsilon = 72,7 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Ход работы. В термостатированную спектрофотометрическую кювету шириной 1,0 см последовательно вносят 0,1 мл 4,3 мМ *o*-дианизидина и 2,8 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера, рН 5,0. После перемешивания ожидают установления желаемой температуры в кювете. Обычно начинают опыт с 5°C, увеличивая температуру на 10 до 85°C. После установления в кювете желаемой температуры в нее добавляют последовательно 0,05 мл супернатанта и 0,05 мл 31,6 мМ H_2O_2 . Реакцию окисления *o*-дианизидина регистрируют через каждые 15–20 с в течение 1 мин, записывают показания светопоглощения на фотоколориметре при 440–490 нм или на спектрофотометре при 460 нм ($\epsilon = 30 \text{ ММ}^{-1}\text{см}^{-1}$). Данные по влиянию температуры на активность пероксидазы записывают в таблицу 8.7.

Метод расчета. Скорость ферментативной реакции определяют из тангенса угла наклона кинетической кривой, выражаемой в изменении светопоглощения в течение минуты (dD/dt , усл. ед./мин).

Оформление работы. После окончания измерений построить на миллиметровой бумаге график зависимости

Влияние температуры на активность пероксидазы

Температура, °C	v_0 , усл. ед./мин	v_0 , мкМ/мин
5		
15		
25		
35		
45		
55		
65		
75		
85		

изменения активности фермента (v_0) от температуры (T , °C), определить температурный максимум фермента, сравнить активности фермента при низких и высоких температурах.

8.1.11. ВЛИЯНИЕ АЛЬБУМИНА И ХЛОРИДА КАЛЬЦИЯ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ

Принцип метода. На стабильность ферментов могут влиять присутствующие в среде белки, ионы (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} и др.), различные низкомолекулярные соединения (субстраты, коферменты, аминокислоты и др.), а также природа и полярность растворителя, pH среды, ионная сила и др. Стабилизирующее влияние ионов Ca^{2+} на пероксидазу можно объяснить образованием прочных хелатов с карбоксильными и карбонильными группами, расположенными на поверхности белковой глобулы фермента, тогда как в случае модификации пероксидазы карбодиимидами и нуклеофилами могут модифицироваться только те карбоксильные группы фермента, которые расположены близко к поверхности и не участвуют в стабилизации пероксидазы. При этом ионы Ca^{2+} образуют хелаты с несколькими маскированными карбоксильными группами, которые вследствие стерических затруднений не могут быть промодифицированы ни карбодиимидами, ни нуклеофилами.

Оборудование: термостат; спектрофотометр; рН-метр; аналитические весы; штатив.

Посуда: пипетки на 5 мл — 1 шт., 0,1 мл — 6 шт.; колбы на 500 мл — 3 шт. и 50 мл — 4 шт.; пробирки — 18 шт.

Материалы и реактивы: пероксидаза хрена ($RZ = 1,0$); 0,2 М раствор CaCl_2 ; 1 мМ раствор альбумина; 1 мкМ раствор пероксидазы; 0,1 М Na-фосфатный раствор, рН 7,0; 4,3 мМ раствор *о*-дианизидина; 15,4 мМ раствор перекиси водорода.

Приготовление растворов. *Буферный раствор* готовят из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на рН-метре до рН 7,0.

Раствор о-дианизидина (1,05 мг/мл) готовят, растворяя 52,5 мг навески в 50 мл 96%-ного этанола. Вещество хорошо растворяется при нагревании. Раствор должен быть бесцветным или слегка розовым.

Перекись водорода, 15,4–15,8 мМ водный раствор, готовят на спектрофотометре с поглощением 1,12–1,15 усл. ед. при длине волны 230 нм ($\epsilon = 72,7 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

1 мМ раствор альбумина готовят, растворяя исходный 1,56 мМ (10% -ный) раствор альбумина в б. в.

Раствор CaCl_2 (22,2 мг/мл) готовят, растворяя навеску в б. в.

Ход работы. В две пробирки (опыт 1 и 2) вносили по 0,1 мл 1 мкМ раствор пероксидазы и 0,8 мл 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0. Затем в первую пробирку добавляли 0,1 мл 1 мМ раствора альбумина (опыт 1), а во вторую 0,1 мл 0,2 М раствора CaCl_2 (опыт 2). Контролем служит пробирка, в которую вносили 0,1 мл 1 мкМ раствора пероксидазы и 0,9 мл 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0. После перемешивания пробы инкубируют при температуре 60°C в термостате. Через каждые 10 мин из инкубируемых пробирок отбираем по 0,1 мл в пробирки с 9,9 мл 0,1 М Na-фосфатным буфером, рН 7,0. После перемешивания пробы помещают в холодильник с температурой + 4°C на 2 ч.

Для определения активности пероксидазы в контрольной и опытных пробах в спектрофотометрическую кювету шириной 1,0 см последовательно вносят 2,6 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера рН 7,0, 0,1 мл фермента, 0,1 мл 4,3 мМ

о-дианизидина. После перемешивания реакцию инициируют введением в кювету 0,1 мл 15,4 мМ Н₂О₂. Снова перемешивают содержимое кюветы и через каждые 15–20 с в течение 2 мин записывают показания светопоглощения на ФЭКе при 440–490 нм или на спектрофотометре при 460 нм.

Метод расчета. Активность пероксидазы определяют из тангенса угла наклона кинетической кривой, выражаемой в изменении светопоглощения в течение минуты (dD/dt , усл. ед./мин). После окончания измерений строят на миллиметровой бумаге график зависимости $(\lg(v_i/v_0) \cdot 100)$ от времени (t , мин) инкубации фермента. Где v_0 — активность нативной пероксидазы, v_i — активность термоинактивированной формы пероксидазы.

Величины констант термоинактивации ($k_{ин}$) рассчитывают из тангенса угла наклона полулогарифмической анаморфозы кинетических кривых, которые записывают в таблицу 8.8.

Таблица 8.8

Константы скорости необратимой термоинактивации очищенного препарата пероксидазы в присутствии различных соединений

Соединения	Концентрация, мМ	Константа скорости инактивации $\times 10^3$, мин ⁻¹	Эффект стабилизации
Na-фосфатный буфер рН 7,0 (контроль)	—		
CaCl ₂	20,0		
Альбумин	0,1		

Оформление работы. Сравнить величины констант инактивации пероксидазы в отсутствие и в присутствии альбумина и хлорида кальция.

8.1.12. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА СТАБИЛЬНОСТЬ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Принцип метода. В растительных тканях уровень эндогенных алифатических спиртов и альдегидов регулируется с помощью дегидрогеназной системы, в состав которой входит алкогольдегидрогеназа. Основными субстратами фермента являются двухуглеродные соединения — этанол

и ацетальдегид, которые образуются в тканях преимущественно при окислении углеводных производных. Равновесие алкогольдегидрогеназной реакции сдвинуто в сторону образования этанола, накопление которого может служить адаптивным признаком растений и семян переносить ряд внешних неблагоприятных условий (низкая температура, повышенная влажность и др.).

АДГ пшеницы состоит из двух субъединиц, каждая из которых содержит активный центр. В активном центре алкогольдегидрогеназы пшеницы выявлены две SH-группы, принимающие участие в каталитическом процессе. Алкогольдегидрогеназы пшеницы в реакции окисления этанола имеют температурный оптимум в диапазоне 40–50°C. Стабильность АДГ можно повысить, добавляя в инкубационную среду НАД, глицин, глицерин, этанол и другие соединения. При этом показано, что наибольшим стабилизирующим эффектом обладает кофермент алкогольдегидрогеназы НАД, а также глицин и глицерин. При добавлении НАД стабильность фермента возрастала в 19 раз, а глицина — в 17 раз.

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; рН-метр; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы шириной 1 см; пипетки на 0,1 мл — 3 шт. и на 5 мл — 1 шт.; колба на 100 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: супернатант зерновок пшеницы; 45 мМ раствор НАД; 0,5 М раствор глицина; 1 мМ раствор альбумина; 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0; 0,1 М глицин-NaOH буфера, рН 10; 36 мМ раствор НАД; 40 мл 0,41 М раствора этанола.

Приготовление рабочих растворов. *Растворы для термоинактивации:* буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на рН-метре до рН 7,0; 45 мМ раствор НАД (30 мг/мл), 0,5 М раствор глицина (37,5 мг/мл), 1 мМ раствор альбумина (64 мг/мл) готовят, растворяя навески в 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0.

Растворы для определения активности АДГ: раствор НАД (24 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.; раствор

этанола готовят путем прибавления 1 мл 96% -ного спирта к 39 мл д. в.; раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы глицина и NaOH на рН-метре до рН 10.

Ход работы. В три пробирки (опыт 1, 2, и 3) вносили по 0,9 мл 5,6 мкМ раствора АДГ в 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0. Затем в первую пробирку добавляли 0,1 мл 45 мМ НАД, во вторую — 0,1 мл 0,5 М глицина, в третью — 0,1 мл 1 мМ альбумина. Контролем служит пробирка, в которую вносили 0,9 мл 5,6 мкМ раствора АДГ и 0,1 мл 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0. После перемешивания пробирки последовательно помещали в термостат при температуре 60°C. Через каждые 10 мин отбираем из инкубируемой пробирки по 0,1 мл в пробирки с 9,9 мл 0,1 М Na-фосфатным буфером, рН 7,0. Затем после перемешивания пробы помещали в холодильник с температурой + 4°C на 2 ч.

Для определения активности АДГ в спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 2,7 мл 0,1 М глицин-NaOH буфера рН 10, 0,1 мл 36 мМ раствора НАД и 0,1 мл 0,41 М раствора этанола. После перемешивания содержимого кюветы реакцию иницируют введением 0,1 мл раствора АДГ. За ходом реакции следят на спектрофотометре при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$), записывая изменения светопоглощения в течение 1 мин.

Метод расчета. За меру активности фермента принимали количество микромолей НАД, восстановленного за 1 мин.

После окончания измерений строят на миллиметровой бумаге график зависимости ($\lg(v_i/v_0) \cdot 100$) от времени (t , мин) инкубации фермента. Где v_0 — активность нативной пероксидазы, v_i — активность термоинактивированной формы АДГ.

Величины констант термоинактивации ($k_{ин}$) рассчитывают из тангенса угла наклона полулогарифмической анаморфозы кинетических кривых, которые записывают в таблицу 8.9.

Оформление работы. Сравнить величины констант инактивации АДГ в отсутствие и в присутствии различных соединений.

Константы скорости необратимой термоинактивации АДГ зерновок пшеницы в присутствии различных соединений

Соединения	Концентрация, мМ	Константа скорости инактивации $\times 10^3$, мин ⁻¹	Эффект стабилизации
Na-фосфатный буфер pH 7,0 (контроль)	—		
НАД	4,5		
Глицин	50,0		
Альбумин	0,1		

8.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

8.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ ПО *o*-ДИАНИЗИДИНУ

Принцип метода. Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) является самым распространенным ферментом растений. По строению фермент является гемсодержащим гликопротеидом, в составе которого полипептидная цепь из около 300 аминокислотных остатков, гемин и поверхностные углеводы.

Для определения активности пероксидазы используют неорганические и органические соединения, при окислении которых перекисью водорода образуются окрашенные продукты. В данной работе предлагается использовать в качестве субстрата пероксидазы *o*-дианизидин, продукт пероксидазного окисления которого имеет максимум поглощения при 460, с коэффициентами молярного поглощения 30 мМ⁻¹см⁻¹.

Оборудование: рН-метр; ФЭК или спектрофотометр; центрифуга; аналитические весы.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт. и 50 мл — 2 шт.; пипетки на 5 мл — 1 шт., 0,2 мл — 1 шт., 0,1 мл — 3 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: супернатант зерновок пшеницы; пероксидаза из корней хрена (ПХ, $RZ = 1,0-3,0$) 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0; 4,3 мМ раствор *o*-дианизидина (ОДН); 25 мМ раствор ферроцианида калия (ФК); 15,4 мМ раствор перекиси водорода.

Приготовление реактивов. *Буферный раствор* готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на рН-метре до рН 7,0.

Раствор о-дианизидина (1,05 мг/мл) готовят, растворяя 52,5 мг навески в 50 мл 96%-ного этанола. Вещество хорошо растворяется при нагревании. Раствор должен быть бесцветным или слегка розовым.

Перекись водорода, 15,4–15,8 мМ водный раствор, готовят на спектрофотометре со светопоглощением 1,12–1,15 усл. ед., при длине волны 230 нм ($\epsilon = 72,7 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Раствор пероксидазы из корней хрена (0,16 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,1 М Na-фосфатного буфера рН 7,0. При этом концентрация пероксидазы должна быть равна 4 мкМ ($D_{403} = 0,4$ усл. ед.). Для выполнения работы требуется разбавить исходный раствор фермента в 1000 раз, до 4 нМ.

Ход работы. *Определение активности пероксидазы из корней хрена.*

В спектрофотометрическую кювету шириной 1 см последовательно вносят 0,1 мл 4,3 мМ раствора ОДН, 2,6 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера рН 7,0 и 0,1 мл 4 нМ раствора пероксидазы. После перемешивания реакцию инициируют введением в кювету 0,1 мл 15,4 мМ H_2O_2 . Снова перемешивают содержимое кюветы и через каждые 15–20 с в течение 1 мин записывают показания светопоглощения на ФЭКе при 440–490 нм или на спектрофотометре при 460 нм. Данные записывают в таблицу 8.10.

Таблица 8.10

Величины светопоглощения продукта окисления о-дианизидина от времени протекания реакции его пероксидазного окисления в присутствии пероксидазы

Измерения	Время t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		
5		
6		

За меру активности фермента принимали количество микромолей ОДН окисленного за 1 мин.

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D , t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин или мкмоль/мин):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{\varepsilon \cdot l \cdot dt} \quad \text{или} \quad v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V}{30 \cdot dt},$$

где dD — величина светопоглощения при 460 нм, усл. ед.; ε — коэффициент молярного светопоглощения ($30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$); 30 — коэффициент микромолярного светопоглощения; V — общий объем раствора в кювете, мл; l — ширина кюветы, см; dt — время реакции, мин.

Определение активности пероксидазы в супернатанте зерновок пшеницы

В спектрофотометрическую кювету шириной 1 см последовательно вносят 0,1 мл 4,3 мМ *o*-дианизидина, 2,6 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера pH 7,0 и 0,2 мл супернатанта. После перемешивания реакцию иницируют введением в кювету 0,1 мл 15,4 мМ H_2O_2 . Снова перемешивают содержимое кюветы и через каждые 15–20 с, в течение 1 мин, записывают показания поглощения на ФЭКе при 440–490 нм или на спектрофотометре при 460 нм ($\varepsilon = 30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$). Данные записывают в таблицу 8.11.

Таблица 8.11

Величины поглощения продукта окисления *o*-дианизидина от времени протекания реакции его пероксидазного окисления в присутствии пероксидазы

Измерения	Время t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		
5		
6		

После окончания измерений строят на миллиметровой бумаге график зависимости изменения поглощения от времени проведения реакции. Скорость реакции определяют из тангенса угла наклона кинетической кривой, выражаемой в изменении поглощения в течение минуты (dD/dt , усл. ед./мин).

Метод расчета. Активность пероксидазы ($A_{\text{по}}$, мкмоль/мин г сухой массы) определяется по формуле

$$A_{\text{по}} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_2}{dt \cdot P \cdot V_3 \cdot \varepsilon \cdot l},$$

где dD — усл. ед.; V_1 — общий объем гомогената, мл; V_2 — общий объем раствора в кювете, мл; V_3 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; dt — время реакции; ε — коэффициент молярного поглощения, $\text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$; P — навеска, г; l — ширина кюветы, см.

Оформление работы. Определить активности пероксидазы очищенного препарата и супернатанта в реакциях пероксидазного окисления *o*-дианизидина. Рассчитать каталитические константы.

8.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ ПО ФЕРРОЦИАНИДУ КАЛИЯ

Принцип метода. Для определения активности пероксидазы используется ферроцианид калия, продукт пероксидазного окисления которого имеет максимум поглощения при 420, с коэффициентом молярного поглощения $1 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Оборудование: рН-метр; ФЭК или спектрофотометр; центрифуга; аналитические весы.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт. и 50 мл — 2 шт.; пипетки на 5 мл — 1 шт., 0,2 мл — 1 шт., 0,1 мл — 3 шт.; пробирка — 1 шт.

Материалы и реактивы: супернатант зерновок пшеницы; пероксидаза из корней хрена (ПХ, $RZ = 1,0\text{--}3,0$) 0,1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0; 4,3 мМ раствор *o*-дианизидина (ОДН); 25 мМ раствор ферроцианида калия (ФК); 15,4 мМ раствор перекиси водорода.

Приготовление реактивов. Буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем

их смешивания на рН-метре до рН 7,0. *Раствор ферроцианида калия* (9,2 мг/мл) готовят, растворяя 460 мг навески в 50 мл дистиллированной воды.

Перекись водорода, 15,4–15,8 мМ водный раствор, готовят на спектрофотометре со светопоглощением 1,12–1,15 усл. ед., при длине волны 230 нм ($\varepsilon = 72,7 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Раствор пероксидазы из корней хрена (0,16 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,1 М Na-фосфатного буфера рН 7,0. При этом концентрация пероксидазы должна быть равна 4 мкМ ($D_{403} = 0,4$ усл. ед.). Для выполнения работы требуется разбавить исходный раствор фермента в 1000 раз, до 4 нМ.

Ход работы. В спектрофотометрическую кювету шириной 1 см последовательно вносят 0,1 мл 25 мМ ферроцианида калия, 2,6 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера (рН 6,0) и 0,2 мл супернатанта. После перемешивания реакцию инициируют введением в кювету 0,1 мл 15,4 мМ H_2O_2 . Снова перемешивают содержимое кюветы и через каждые 15–20 с в течение 2 мин регистрируют показания поглощения на ФЭКе при 400–440 нм или на спектрофотометре при 420 нм ($\varepsilon = 1000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$). Показания ФЭКа записывают в таблицу 8.12.

Т а б л и ц а 8.12

Величины поглощения продукта окисления ферроцианида калия от времени протекания реакции его пероксидазного окисления в присутствии пероксидазы

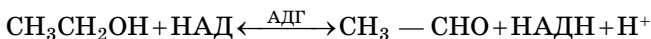
Измерения	Время t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		
5		
6		

После окончания измерений строят на миллиметровой бумаге график зависимости изменения поглощения от времени проведения реакции, как описано выше.

Оформление работы. Определить активность пероксидазы в реакциях пероксидазного окисления ферроцианида калия и рассчитать каталитические константы.

8.2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ В РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ЭТАНОЛА ПО НАДН

Принцип метода. Алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1; АДГ) выполняет одну из важнейших функций по метаболизации эндогенных спиртов и альдегидов в клетках растений в присутствии окисленных и восстановленных форм НАД. Максимальная активность фермента в реакции окисления этанола проявляется в щелочной области рН.



В данной работе активность алкогольдегидрогеназы в реакции окисления этанола определяется по образованию НАДН при 340 нм (коэффициент молярного поглощения $6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: фотоэлектроколориметр; рН-метр; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы шириной 1 см; пипетки на 0,1 мл — 3 шт. и на 5 мл — 1 шт.; колба на 500 мл — 3 шт.

Материалы и реактивы: 0,1 М глицин- NaOH буфера, рН 10; 36 мМ раствора НАД (24 мг/мл); 0,41 М раствора этанола; 2,5 мкМ раствора АДГ или супернатанта зерновок пшеницы.

Приготовление рабочих растворов. Раствор НАД готовят, растворяя 239 мг в 10 мл дистиллированной воды; раствор этанола готовят путем прибавления 1 мл 96% -ного спирта к 39 мл дистиллированной воды; раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы глицина и NaOH на рН-метре до рН 10.

Ход определения. В спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 2,7 мл 0,1 М глицин- NaOH буфера рН 10, 0,1 мл 36 мМ раствора НАД и 0,1 мл 0,41 М раствора этанола. После перемешивания содержимого кюветы реакцию иницируют введением 0,1 мл 2,5 мкМ раствора АДГ или 0,1 мл супернатанта. За ходом реакции следят на фотоэлектроколориметре при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$), записывая изменения светопоглощения в течение 1 мин с интервалом 15–20 с. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.13.

Величины светопоглощения НАДН от времени протекания реакции окисления этанола в присутствии алкогольдегидрогеназы

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

За меру активности фермента принимали количество микромолей НАД, восстановленного за 1 мин.

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D, t) , или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.1) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г массы) (8.2):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.1)$$

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.2)$$

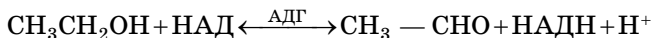
где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного поглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Определить активность фермента в супернатанте и в исследуемой навеске. Раскрыть роль фермента в метаболизме клеток растений.

8.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ В РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ЭТАНОЛА ПО ИОДНИТРОТЕТРАЗОЛИЕВОМУ ФИОЛЕТОВОМУ

Принцип метода. Алкогольдегидрогеназа катализирует реакцию окисления спиртов, сопровождающуюся восстановлением НАД. За скоростью реакции можно наблюдать

спектрофотометрически при 340 нм по образованию НАДН. Однако в лабораторных условиях не всегда приемлемо проводить исследования в ультрафиолетовой области. Поэтому предлагается использовать йоднитротетразолий фиолетовый (ИНТФ), который стехиометрически восстанавливается НАДН с образованием окрашенного в красный цвет формазана с максимумом поглощения при 510 нм.



В данной работе активность алкогольдегидрогеназы в реакции окисления этанола определяется по поглощению формазана при 510 нм ($\varepsilon = 14 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: фотоэлектрокolorиметр; рН-метр; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы шириной 1 см; пипетки на 0,1 мл — 3 шт. и на 5 мл — 1 шт.; колба на 100 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: 0,1 М глицин-NaOH буфера, рН 10; 36 мМ раствора НАД (24 мг/мл); 0,41 М раствора этанола; 0,25 мг/мл йоднитротетразолия фиолетового; 0,4 М HCl; 2,5 мкМ раствора АДГ или супернатанта зерновок пшеницы.

Приготовление рабочих растворов. Раствор НАД готовят, растворяя 239 мг в 10 мл дистиллированной воды; раствор этанола готовят путем прибавления 1 мл 96% -ного спирта к 39 мл дистиллированной воды; раствор йоднитротетразолия фиолетового готовят, растворяя 10 мг навески в 40 мл дистиллированной воды; раствор соляной кислоты готовят, растворяя 3,5 мл исходного 35,2% -ного (11,34 М) раствора HCl в 96,5 мл дистиллированной воды; раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы глицина и NaOH на рН-метре до рН 10.

Вариант 1

Ход определения. В спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 2,6 мл 0,1 М глицин-NaOH буфера

pH 10, 0,1 мл 36 мМ раствора НАД, 0,1 мл 0,41 М раствора этанола и 0,1 мл ИНТФ. После перемешивания содержимого кюветы реакцию иницируют введением 0,1 мл 2,5 мкМ раствора АДГ или 0,1 мл супернатанта. За меру активности фермента принимали количество микромолей НАД, восстановленного за 1 мин. За ходом реакции следят на фотоэлектродколориметре при 510 нм ($\epsilon = 14 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$), записывая изменение светопоглощения раствора в кювете в течение 1 мин с интервалом 15–20 с. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.14.

Таблица 8.14

Величины светопоглощения ИНТФ от времени проведения реакции окисления этанола в присутствии алкогольдегидрогеназы

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D , t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.3) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г) (8.4):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{14 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.3)$$

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{14 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.4)$$

где dD — величина поглощения, усл. ед.; 14 — коэффициент микромолярного поглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Вариант 2

Ход определения. В спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 2,1 мл 0,1 М глицин-NaOH буфера pH 10, 0,1 мл 36 мМ раствора НАД, 0,1 мл 0,41 М раствора этанола и 0,1 мл ИНТФ. После перемешивания содержимого кюветы реакцию инициируют введением 0,1 мл 2,5 мкМ раствора АДГ или 0,1 мл супернатанта. За реакцией наблюдают в течение 1 мин. Затем реакцию останавливают добавлением к инкубационной смеси 0,5 мл 0,4 М раствора HCl.

Активность фермента определяют на фотоэлектроколориметре при 510 нм ($\epsilon = 14 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Метод расчета. Активность фермента определяют по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.5) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г) (8.6).

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{14 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.5)$$

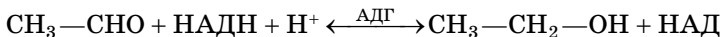
$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{14 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.6)$$

где dD — величина поглощения, усл. ед.; 14 — коэффициент микромолярного поглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Записать величины определенных активностей фермента и сравнить их между собой.

8.2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ В РЕАКЦИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ АЦЕТАЛЬДЕГИДА

Принцип метода. Алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1.) катализирует реакции восстановления альдегидов, проявляя максимальную активность в физиологической области pH.



Активность фермента в реакции восстановления альдегидов определяется по скорости убывания НАДН при 340 нм (коэффициент молярного поглощения $6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: фотоэлектроколориметр; рН-метр; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы шириной 1 см; пипетки на 0,1 мл — 3 шт. и на 5 мл — 1 шт.; колба на 100 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: 100 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, рН 6,5; 10 мл 11,3 мМ раствора НАДН (8 мг/мл); 177 мл 0,1 М раствора ацетальдегида; 10 мл 2,5 мкМ раствора АДГ или супернатанта зерновок пшеницы. Раствор НАДН и супернатант готовят перед выполнением работы.

Приготовление рабочих растворов. Раствор НАДН готовят, растворяя 80 мг в 10 мл дистиллированной воды; раствор ацетальдегида готовят путем прибавления 1 мл 17,7 М раствора ацетальдегида к 176 мл дистиллированной воды; раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы одно- и двухзамещенных фосфатов натрия на рН-метре до рН 6,5.

Ход определения. В спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 2,7 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, рН 6,0, 0,1 мл 11,3 мМ раствора НАДН и 0,1 мл 2,5 мкМ фермента или супернатанта. Реакцию инициируют введением 0,1 мл 0,1 М раствора ацетальдегида. За ходом реакции следят на фотоэлектроколориметре, записывая изменения светопоглощения раствора при 340 нм в течение 1 мин с интервалом 15–20 с. За меру активности фермента принимали количество микромолей НАДН, окисленного за 1 мин. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.15.

Таблица 8.15

Величины светопоглощения НАДН от времени протекания реакции восстановления ацетальдегида в присутствии алкогольдегидрогеназы

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D , t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.7) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г) (8.8):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.7)$$

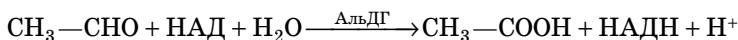
$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.8)$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Записать величину определенной активности фермента. При использовании очищенного препарата АДГ рассчитать каталитические константы.

8.2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Принцип метода. Альдегиддегидрогеназа (КФ 1.2.1.3) катализирует реакцию окисления ацетальдегида в присутствии НАД. За реакцией наблюдают по поглощению восстановленного НАД при 340 нм ($\varepsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).



Оборудование: фотоэлектроколориметр; рН-метр; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы шириной 1 см — 2 шт.; пипетки на 0,1 мл — 3 шт. и на 5 мл — 1 шт.; колба на 100 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: 100 мл 0,1 М глицин- NaOH буфера, рН 10; 10 мл 36 мМ раствора НАД (24 мг/мл); 100 мл 0,25 М раствора ацетальдегида; 10 мл супернатанта зерновки пшеницы или печени.

Приготовление рабочих растворов. Раствор НАД готовят, растворяя 239 мг навески в 10 мл д. в.; раствор ацетальдегида готовят путем прибавления 1,4 мл 17,7 М альдегида в 98,6 мл дистиллированной воды; раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы глицина и NaOH на рН-метре до рН 10.

Ход определения. В спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 2,6 мл 0,1 М глицин/NaOH буферного раствора, 0,1 мл 36 мМ раствора НАД и 0,1 мл 0,25 М раствора ацетальдегида. После перемешивания реакцию инициируют введением 0,2 мл раствора супернатанта. Активность фермента определяют по количеству восстановленного НАД при 340 нм ($\varepsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$). За меру активности фермента принимали количество микромолей НАД, восстановленного за 1 мин.

За ходом реакции следят на ФЭКе при 340 нм, записывая изменения светопоглощения в течение 1 мин с интервалом 15–20 с. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.16.

Т а б л и ц а 8.16

Величины поглощения НАДН от времени протекания реакции окисления ацетальдегида в присутствии альдегиддеhydroгеназы

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

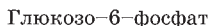
Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной в координатах (D , t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.9) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г) (8.10):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.9)$$

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.10)$$

Оформление работы. Записать величину определенной активности фермента.

Принцип метода. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) катализирует реакцию окисления глюкозо-6-фосфата до 6-фосфо-глюконолактона в присутствии НАДФ и ионов Mg^{2+} , является ключевым ферментом пентозофосфатного пути окисления гексозофосфатов.



Фермент состоит из четырех субъединиц, однако в разбавленных растворах они диссоциируют до димерных форм, которые сохраняют высокую активность. Высокие концентрации глюкозо-6-фосфата активируют фермент, а избыток НАДФ приводит к его ингибированию.

314

Посуда: спектрофотометрические кюветы; колбы на 100 и 50 мл — по 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 3 шт., 5 мл — 1 шт.; пробирки — 5 шт.

Материалы и реактивы: 0,1 М раствор $MgCl_2$ (9,5 мг/мл); 0,025 М раствор НАДФ (19,1 мг/мл); 0,05 М раствор глюкозо-6-фосфата (15,2 мг/мл); 0,01 М *трис*-HCl буфер (рН 7,4); раствор супернатанта зерновок пшеницы.

Приготовление рабочих растворов. 0,1 М раствор $MgCl_2$ готовят путем растворения 475 мг навески в 50 мл д. в.; 0,025 М раствор НАДФ готовят, растворяя 382 мг навески в 20 мл д. в.; 0,05 М раствор глюкозо-6-фосфата готовят, растворяя 304 мг навески в 20 мл д. в.; раствор буфера готовят, смешивая 0,01 М растворы триса и HCl на рН-метре до рН 7,4.

Ход определения. В кювету последовательно вносят 2,1 мл 0,01 М *трис*-HCl буферного раствора (рН 7,4), 0,1 мл 0,1 М раствора $MgCl_2$, 0,1 мл 0,025 М раствора НАДФ и 0,1 мл 0,05 М раствора глюкозо-6-фосфата. После перемешивания реакцию инициируют введением 0,1 мл раствора супернатанта. За меру активности фермента принимают количество микромолей НАДФ, восстановленного за 1 мин в процессе окисления глюкозо-6-фосфата. За ходом реакции следят на ФЭКе при 340 нм, записывая величины светопоглощения через 15–20 с в течение 1 мин в таблицу 8.17.

Таблица 8.17

Величины поглощения НАДФН от времени протекания реакции дегидрирования глюкозо-6-фосфата в присутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной в координатах (D ,

t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.11) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г) (8.12):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.11)$$

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.12)$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Записать величину определенной активности фермента.

8.2.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПО ИОДНИТРОТЕТРАЗОЛИЕВОМУ ФИОЛЕТОВОМУ

Принцип метода. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа катализирует реакцию окисления глюкозо-6-фосфата. За скоростью реакции можно наблюдать спектрофотометрически при 340 нм по образованию НАДФН. Однако в лабораторных условиях не всегда приемлемо проводить исследования в ультрафиолетовой области. Поэтому предлагается использовать иоднитротетразолий фиолетовый, который стехиометрически восстанавливается НАДФН с образованием окрашенного в красный цвет формазана. Последний может быть легко определен как на спектрофотометре, так и на фотоэлектроколориметре в видимой области.

Активность фермента в реакции окисления глюкозо-6-фосфата определяют по скорости образования формазана при 510 нм ($\varepsilon = 14 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

Оборудование: ФЭК; рН-метр; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы, колбы на 100 и 50 мл — по 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 3 шт., 5 мл — 1 шт.; пробирки — 5 шт.

Реактивы: 50 мл 0,1 М раствора MgCl_2 (9,5 мг/мл); 20 мл 0,025 М раствора НАДФ (19,1 мг/мл); 20 мл 0,05 М

раствора глюкозо-6-фосфата (15,2 мг/мл); 40 мл 0,25 мг/мл йоднитротетразолия фиолетового; 100 мл 0,1 М *трис*-HCl буфера (рН 7,4); 10 мл раствора супернатанта зерновок пшеницы.

Приготовление рабочих растворов. 0,1 М раствор $MgCl_2$ (безводного) готовят путем растворения 475 мг навески в 50 мл д. в.; 0,025 М раствор НАДФ готовят, растворяя 382 мг навески в 20 мл д. в.; 0,05 М раствор глюкозо-6-фосфата динатриевая соль готовят, растворяя 304 мг в 20 мл д. в.; раствор йоднитротетразолия фиолетового готовят, растворяя 10 мг навески в 40 мл д. в.; раствор соляной кислоты готовят, растворяя 3,5 мл исходного 35,2% -ного (11,34 М) раствора в 96,5 мл д. в.; раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы триса и HCl на рН-метре до рН 7,4.

Вариант 1

Ход определения. В кювету последовательно вносили 2,6 мл 0,1 М *трис*-HCl буферного раствора (рН 7,4), 0,1 мл 0,1 М раствора $MgCl_2$, 0,1 мл 0,025 М раствора НАДФ, 0,1 мл 0,05 М раствора глюкозо-6-фосфата и 0,1 мл ИНТФ. После перемешивания реакцию инициировали введением 0,1 мл раствора супернатанта. За меру активности фермента принимали количество микромолей НАДФ, восстановленного за 1 мин в процессе окисления глюкозо-6-фосфата. За ходом реакции следят на ФЭКе при 510 нм ($\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), записывая величины светопоглощения через 15–20 с в течение 1 мин в таблицу 8.18.

Таблица 8.18

Величины поглощения ИНТФ от времени протекания реакции окисления глюкозо-6-фосфата в присутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной в координатах (D , t),

или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.13) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г) (8.14):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{14 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.13)$$

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{14 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.14)$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 14 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Записать величину определенной активности фермента. Сравнить с его с предыдущим методом определения активности Г6ФДГ, где не используется иоднитротетразолий фиолетовый.

Вариант 2

Ход определения. В кювету последовательно вносили 2,1 мл 0,01 М *трис*-HCl буферного раствора (pH 7,4), 0,1 мл 0,1 М раствора $MgCl_2$, 0,1 мл 0,025 М раствора НАДФ, 0,1 мл 0,05 М раствора глюкозо-6-фосфата и 0,1 мл ИНТФ. После перемешивания реакцию инициировали введением 0,1 мл раствора супернатанта. За реакцией наблюдают в течение 1 мин. Затем реакцию останавливают добавлением к инкубационной смеси 0,5 мл 0,4 М соляной кислоты. Активность фермента определяют на ФЭКе при 510 нм.

Метод расчета. Активность фермента определяют по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.15) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г) (8.16):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{14 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.15)$$

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{14 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.16)$$

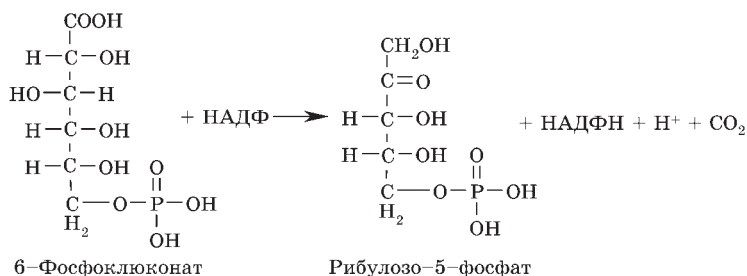
где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 14 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина

кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Записать величину определенной активности фермента. Сравнить его с предыдущим методом определения активности Г6ФДГ, где не используется соляная кислота.

8.2.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ 6-ФОСФОГЛЮКОНАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Принцип метода. Дегидрогеназа 6-фосфоглюконовой кислоты (6ФГДГ, КФ 1.1.1.44) катализирует двухэтапную реакцию, которая включает стадии окисления и декарбоксилирования 6-фосфоглюконовой кислоты (6-фосфоглюконата) до рибулозо-5-фосфата.



В качестве кофермента в реакции участвует НАДФ, восстановление которого происходит на этапе окисления 6-фосфоглюконовой кислоты в 3-кето-6-фосфоглюконовую кислоту. Активность фермента определяют по скорости восстановления НАДФ в инкубационной среде при насыщающих концентрациях субстрата и кофактора, при оптимальных значениях pH и концентрации фермента.

Оборудование: ФЭК; гомогенизатор; pH-метр; аналитические весы.

Посуда: колбы на 100 и 50 мл — по 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 3 шт., 5 мл — 1 шт.; пробирки — 5 шт.

Материалы и реактивы: раствор супернатанта зерновок пшеницы; 0,1 М *трис*-HCl буферный раствор, pH 7,6;

0,1 М раствор MgCl_2 ; 0,025 М раствор НАДФ; 0,05 М раствор 6-фосфоглюконата.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы триса и HCl на рН-метре до рН 7,6. Растворы MgCl_2 (9,53 мг/мл), НАДФ (18,59 мг/мл), 6-фосфоглюконата (13,81 мг/мл) готовят, растворяя соответствующие навески в д. в.

Ход работы. Вначале определяют активность дегидрогеназ (фоновая реакция), присутствующих в исследуемом супернатанте. Для этого в спектрофотометрическую кювету вносят 2,6 мл 0,1 М *трис*- HCl буфера, 0,1 мл 0,1 М раствора MgCl_2 , 0,1 мл 0,025 М раствора НАДФ и 0,2 мл супернатанта. После перемешивания растворов в кювете регистрируют изменение светопоглощения раствора (D_1) при 340 нм в течение 2 мин.

Затем измеряют активность ферментов 6-ФГДГ. В кювету вносят 2,5 мл 0,01 М *трис*- HCl буферного раствора с рН 7,6; 0,1 мл 0,1 М раствора MgCl_2 , 0,1 мл 0,025 М раствора НАДФ, 0,1 мл 0,05 М раствора 6-фосфоглюконата. После перемешивания растворов в кювете реакцию инициируют добавлением 0,2 мл супернатанта и затем регистрируют изменение светопоглощения раствора (D_2) при 340 нм в течение 2 мин. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.19.

Т а б л и ц а 8.19

Величины светопоглощения НАДФН от времени протекания реакции окислительного декарбоксилирования 6-фосфоглюконата в присутствии 6-фосфоглюконат дегидрогеназы

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

За меру активности фермента принимали количество микромолей НАДФН, восстановленного за 1 мин в процессе окисления 6-фосфоглюконовой кислоты.

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D , t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.17) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г массы) (8.18):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.17)$$

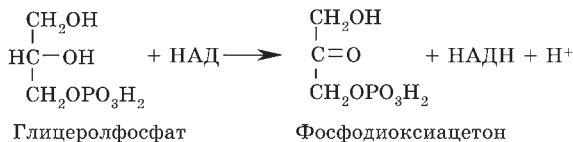
$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.18)$$

где dD — величина светопоглощения ($D_2 - D_1$), усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Определить активность фермента в супернатанте и в исследуемой навеске. Раскрыть роль фермента в метаболизме клеток растений.

8.2.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛИЦЕРОЛ-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Принцип метода. Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (ГЗФДГ, КФ 1.1.1.8) катализирует реакцию окисления глицеролфосфата с образованием фосфодиоксиацетона. В реакции участвует НАД, продукт которого имеет поглощение при 340 нм.



Оборудование: спектрофотометр; гомогенизатор; центрифуга; аналитические весы; штатив.

Посуда: коблы на 500 мл — 3 шт.; пипетки на 0,1 мл — 4 шт., на 5 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; препарат ГЗФДГ; 0,05 М NaOH-глициновый буфер, pH 9,0, содержащий 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол; 36,0 мМ НАД; 54,0 мМ глицеролфосфат; 0,6 М гидразин.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,05 М растворы глицина и NaOH на pH-метре до pH 9,0 с добавлением ЭДТА (0,30 мг/мл) и дитиотреитола (0,16 мг/мл). Раствор НАД (23,9 мг/мл) и глицеролфосфата (9,3 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в. Препарат ГЗФДГ 10–20 Е/мл. Супернатант готовят из проростков пшеницы.

Ход работы. В кювету вносили 0,1 мл 36,0 мМ НАД, 0,1 мл 0,6 М гидразина, 2,6 мл 0,05 М буфера и 0,1 мл 54,0 мМ глицеролфосфата. После перемешивания реакцию инициировали введением 0,1 мл супернатанта или препарата ГЗФДГ. За ходом реакции следят на спектрофотометре при 340 нм, записывая изменения светопоглощения в течение 1 мин с интервалом 15–20 с. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.20.

Т а б л и ц а 8.20

Величины светопоглощения НАДН от времени протекания реакции окисления глицеролфосфата в присутствии глицерол-3-фосфатдегидрогеназы

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

За меру активности фермента принимали количество микромолей НАД, восстановленного за 1 мин.

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D , t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.19) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г массы) (8.20):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.19)$$

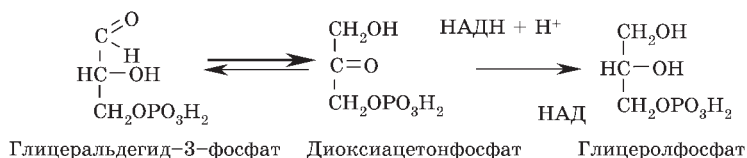
$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.20)$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Определить активность фермента в супернатанте и в готовом препарате. Раскрыть роль фермента в метаболизме клеток растений.

8.2.11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИОЗОФОСФАТИЗОМЕРАЗЫ

Принцип метода. Триозофосфатизомераза (ТФИ, КФ 5.3.1.1) является ферментом гликолиза, катализирует обратимо реакцию изомеризации триозофосфатов. При этом равновесие реакции смещено в сторону образования диоксиацетонфосфата. Поэтому активность ТФИ определяют, используя глицеральдегид-3-фосфата, который вначале превращается в диоксиацетонфосфат, а затем в присутствии глицерол-3-фосфатдегидрогеназы восстанавливается за счет НАДН.



За реакцией наблюдают, измеряя уменьшение светопоглощения при 340 нм.

Оборудование: спектрофотометр; гомогенизатор; центрифуга; аналитические весы; штатив.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт.; пипетки на 0,1 мл — 4 шт., на 5 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы, препарат ТФИ и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы; 0,01 М

триэтаноламин-HCl буфер, рН 7,5; 4,5 мМ раствор НАДН; 90,0 мМ раствор глицеральдегид-3-фосфата.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,01 М растворы триэтаноламина и HCl на рН-метре до рН 7,5. Растворы НАДН (2,99 мг/мл) и глицеральдегид-3-фосфата (15,3 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в. Растворы триозофосфатизомеразы (0,4 Е/мл) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (70 Е/мл). Супернатант готовят из проростков пшеницы.

Ход работы. В кювету вносят 0,1 мл 90,0 мМ раствор глицеральдегид-3-фосфата, 0,1 мл 4,5 мМ раствора НАДН, 2,7 мл 0,01 М триэтаноламин-HCl буфера и 0,05 мл глицерол-3-фосфатдегидрогеназы. После перемешивания реакцию инициировали добавлением 0,05 мл триозофосфатизомеразы.

За ходом реакции следят на спектрофотометре при 340 нм, записывая изменения светопоглощения в течение 3–4 мин с интервалом 15–20 с. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.21.

Т а б л и ц а 8.21

Величины светопоглощения НАДН от времени протекания реакции восстановления диоксиацетонфосфата в присутствии глицерол-3-фосфатдегидрогеназы

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		

За меру активности фермента принимали количество микромолей НАДН, окисленного за 1 мин.

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D , t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.21) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г массы) (8.22):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.21)$$

Ход работы. В кювету вносили 0,1 мл 30,0 мМ НАД, 0,1 мл 1,5 М $\text{KН}_2\text{РO}_4$, 2,6 мл 0,05 М буфера и 0,1 мл 30 мМ глицеральдегид-3-фосфата. После перемешивания реакцию инициировали введением 0,1 мл супернатанта или препарата ГАФДГ. За ходом реакции следят на спектрофотометре при 340 нм, записывая изменения светопоглощения в течение 1 мин с интервалом 15–20 с. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.22.

Таблица 8.22

Величины светопоглощения НАДН от времени протекания реакции окисления глицеральдегид-3-фосфата в присутствии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

За меру активности фермента принимали количество микромолей НАД, восстановленного за 1 мин.

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D , t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.23) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г массы) (8.24):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.23)$$

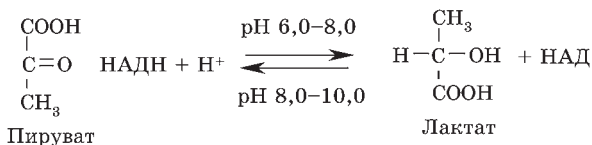
$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.24)$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Определить активность фермента в супернатанте и в готовом препарате. Раскрыть роль фермента в метаболизме клеток растений.

8.2.13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) катализирует обратимо реакции окисления молочной кислоты (лактата) с образованием пировиноградной кислоты (пирувата). В реакции участвуют окисленная и восстановленная формы НАД.



При значениях pH, близких к нейтральным, равновесие реакции сдвинуто в сторону образования молочной кислоты и НАД.

8.2.13.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПО ПИРУВАТУ

Принцип метода. Активность фермента определяется по реакции восстановления пирувата до молочной кислоты, протекающей с участием НАДН. Последний имеет светопоглощение при 340 нм и в ходе реакции окисляется до НАД. При этом светопоглощение раствора в спектрофотометрической кювете в процессе реакции будет понижаться.

Оборудование: спектрофотометр; pH-метр; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрическая кювета на 1 см; пипетки на 5 мл — 1 шт.; на 0,1 мл — 3 шт.; колбы на 500 мл — 2 шт. и на 100 мл — 2 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: 10 мМ раствор пирувата натрия; 3 мМ раствор НАДН, pH 8,0; 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,4; раствор лактатдегидрогеназы, pH 7,4.

В процессе работы растворы фермента и НАДН должны находиться в ледяной бане.

Приготовление рабочих растворов. Раствор пирувата На готовят, растворяя 11 мг навески в 10 мл дистиллированной воды; раствор НАДН готовят, растворяя 20 мг навески в 10 мл буферного раствора, pH 8,0; буферные растворы готовят из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на pH-метре до необходимого значения pH (7,4 и 8,0).

Ход определения. В спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 2,75 мл 0,1 М раствор Na-фосфатного буфера (pH 7,4), 0,1 мл 10 мМ раствора пирувата натрия и 0,1 мл 3 мМ раствора НАДН. После перемешивания добавляют 0,05 мл раствора фермента или гомогената (супернатанта) и после повторного перемешивания регистрируют понижение поглощения при 340 нм в течение 1–2 мин.

Метод расчета. Активность ЛДГ (мкмоль НАДН/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле

$$A_{\text{ЛДГ}} = \frac{dD \cdot V}{t \cdot 6,22 \cdot a},$$

где dD — изменение светопоглощения при 340 нм; V — конечный объем пробы в кювете, мл; t — время проведения реакции, мин; 6,22 — коэффициент молярного светопоглощения НАДН; a — количество белка в пробе, мг.

Оформление работы. Записать результаты исследования и указать на особенности протекания реакции восстановления пирувата до молочной кислоты в присутствии лактатдегидрогеназы.

8.2.13.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПО МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЕ

Принцип метода. Активность фермента определяется в реакции окисления молочной кислоты, в результате которой НАД восстанавливается. Накопление НАДН характеризуется увеличением поглощения при 340 нм.

Оборудование: спектрофотометр; pH-метр.

Посуда: колбы на 500 мл — 4 шт.; на 100 мл — 2 шт.; пипетки на 5,0 мл — 1 шт.; на 0,2 мл — 2 шт.; на 0,1 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: 0,1 М NaOH/глициновый буфер, pH 10,0; 20,0 mM раствор НАД, pH 6,0; 0,5 М раствор лактата натрия или молочной кислоты.

Приготовление рабочих растворов. Раствор лактата натрия готовят, растворяя 1,12 г навески в 20 мл дистиллированной воды; раствор НАД готовят, растворяя 133 мг навески в 10 мл 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 6,0; 0,1 М NaOH/глициновый буфер готовят из исходных 0,1 М растворов NaOH и глицина путем их смешивания на pH-метре до необходимого значения pH.

Ход определения. В спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 2,65 мл 0,1 М NaOH/глицинового буфера, pH 10, 0,15 мл 0,5 М раствор лактата натрия, 0,15 мл 20 mM раствор НАД. После перемешивания в кювету добавляют 0,05 мл фермента или гомогената (супернатанта). Затем повторно перемешивают и регистрируют увеличение поглощения при 340 нм в течение 1–2 мин.

Метод расчета. Активность ЛДГ ($A_{\text{ЛДГ}}$, мкмоль НАДН/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле

$$A_{\text{ЛДГ}} = \frac{dD \cdot V}{t \cdot 6,22 \cdot a},$$

где dD — изменение светопоглощения при 340 нм; V — конечный объем пробы в кювете, мл; t — время проведения реакции, мин; 6,22 — коэффициент молярного светопоглощения НАДН; a — количество белка в пробе, мг.

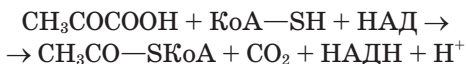
Оформление работы. Записать результаты исследования. Раскрыть роль фермента в метаболизме молочной кислоты и особенности протекания реакции в присутствии лактатдегидрогеназы.

8.2.14. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПЕРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА

Принцип метода. Перуватдегидрогеназный комплекс (ПДК, КФ 1.2.4.1) относится по своей структуре к мультиферментным комплексам. В состав ПДК входят три фермента: пируватдекарбоксилаза, дигидролипоилацетилтрансфераза и дигидролипоилдегидрогеназа. Комплекс локализуется

исключительно в митохондриях, и поэтому проявляемая им активность может служить маркером этих субклеточных структур.

Ферменты ПДК катализируют реакции окислительного декарбоксилирования пирувата. В реакции участвует НАД, восстанавливающийся до НАДН.



Активность ферментов ПДК определяется по накоплению НАДН, который имеет максимум светопоглощения при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: ФЭК; рН-метр; аналитические весы; штатив.

Посуда: спектрофотометрические кюветы шириной 1 см; пипетки на 0,1 мл — 6 шт. и на 5 мл — 1 шт.; колба на 500 мл — 3 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: митохондрии проростков пшеницы, 0,1 М *трис*-HCl буфер, рН 8,0, с 2,78 мМ меркаптоэтанолом и 0,56 мМ ЭДТА; 68,9 мМ раствор пирувата калия, 278,3 мМ раствор MgCl_2 (безводного); 27,5 мМ раствор тиаминпирофосфата; 27,7 мМ раствор НАД; 32,6 мМ раствор SH-KoA.

Приготовление растворов. Раствор *трис*-HCl буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы триса и HCl на рН-метре до рН 8,0, добавляя меркаптоэтанол (0,217 мг/мл) и ЭДТА (0,162 мг/мл).

Растворы пирувата калия (8,7 мг/мл), MgCl_2 (26,5 мг/мл), тиаминпирофосфата (11,7 мг/мл), НАД (18,4 мг/мл) и SH-KoA (25,0 мг/мл) готовят, растворяя соответствующие навески в д. в.

Ход работы. Вначале определяют активность дегидрогеназ (фоновая реакция), присутствующих в исследуемой смеси митохондрий. Для этого в спектрофотометрическую кювету вносят 2,3 мл 0,1 М *трис*-HCl буфера, 0,1 мл 27,8 мМ раствора НАД и 0,1 мл митохондриального препарата. После перемешивания регистрируют изменение светопоглощения раствора (D_1) при 340 нм в течение 2 мин.

Затем измеряют активность ферментов ПДК. В спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 1,9 мл 0,1 М *трис*-HCl буфера, 0,1 мл 68,9 мМ раствора пирувата калия, 0,1 мл 278,3 мМ раствора $MgCl_2$, 0,1 мл 27,5 мМ раствора тиаминпирофосфата, 0,1 мл 27,7 мМ раствора НАД и 0,1 мл 32,6 мМ раствора $SH-CoA$. Данные о концентрации реагентов представлены в таблице 8.23.

Таблица 8.23

Названия и концентрации реагентов для определения активности ферментов ПДК

Реактивы	Исходная концентрация, мг/мл	Исходная концентрация, мМ	Объем, вносимый в кювету, мл	Концентрация в кювете, мМ
Буфер	—	—	1,9	—
Пируват калия	8,7	68,9	0,1	2,76
$MgCl_2$	26,5	278,3	0,1	11,13
Тиаминпирофосфат	11,7	27,5	0,1	1,10
НАД	18,4	27,7	0,1	1,11
CoA	25,0	32,6	0,1	1,30
Митохондриальный препарат	—	—	0,1	—

После перемешивания реакцию инициируют добавлением в кювету 0,1 мл митохондриального препарата и затем регистрируют изменение светопоглощения раствора (D_2) при 340 нм в течение 2 мин. Результаты наблюдений записывают в следующую таблицу 8.24.

Таблица 8.24

Величины светопоглощения НАДН от времени протекания реакции окислительного декарбоксилирования пирувата в присутствии ферментов пируватдегидрогеназного комплекса

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Метод расчета. Активность ферментов ПДК (мкмоль/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле

$$A = \Delta D \cdot V / (6,22 \cdot t \cdot a),$$

где ΔD — величина светопоглощения ($D_2 - D_1$), усл. ед.; V — конечный объем пробы в кювете, мл; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения НАДН при 340 нм; t — время реакции, мин; a — количество белка в пробе, определенной в суспензии митохондрий, мг.

Оформление работы. Записать величину определенной активности фермента.

8.2.15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПЕРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА С ПОМОЩЬЮ ЙОДНИТРОТЕТРАЗОЛИЕВОГО ФИОЛЕТОВОГО

Принцип метода. Ферменты ПДК катализируют реакции декарбоксилирования и дегидрирования, в которых окисленная форма НАД восстанавливается до НАДН, имеющего максимум поглощения при 340 нм по образованию НАДН. Однако в лабораторных условиях не всегда приемлемо проводить исследования в ультрафиолетовой области. Поэтому предлагается использовать йоднитротетразолий фиолетовый, который стехиометрически восстанавливается НАДН с образованием окрашенного в красный цвет формазана с максимумом поглощения при 510 нм ($\epsilon = 14 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

Посуда: спектрофотометрические кюветы шириной 1 см; пипетки на 0,1 мл — 7 шт. и на 5 мл — 1 шт.; колба на 500 мл — 3 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: митохондрии проростков пшеницы, 0,1 М *трис*-HCl буфер, pH 8,0, с 2,78 мМ меркаптоэтанолом и 0,56 мМ ЭДТА; 69,3 мМ раствор пирувата калия, 278,3 мМ раствор MgCl_2 (безводного); 27,6 мМ раствор тиаминпирофосфата; 27,8 мМ раствор НАД; 32,6 мМ раствор SH—КоА; 0,25 мг/мл йоднитротетразолия фиолетового (ИНТФ).

Приготовление растворов. Раствор ИНТФ (0,25 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в. Остальные реактивы готовят, как описано выше.

Ход определения. Вначале определяют активность де-гидрогеназ (фоновая реакция), присутствующих в исследуемой смеси митохондрий. Для этого в спектрофотометрическую кювету вносят 2,2 мл 0,1 М *трис*-HCl буфера, 0,1 мл 27,8 мМ раствора НАД, 0,1 мл ИНТФ и 0,1 мл митохондриального препарата. После перемешивания регистрируют изменение светопоглощения раствора (D_1) при 510 нм в течение 2 мин.

Для измерения активности ферментов ПДК в спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 1,8 мл 0,1 М *трис*-HCl буфера, 0,1 мл 69,3 мМ раствора пирувата калия, 0,1 мл 278,3 мМ раствора $MgCl_2$, 0,1 мл 27,6 мМ раствора тиаминпирофосфата, 0,1 мл 27,8 мМ раствора НАД, 0,1 мл 32,6 мМ раствора SH—КоА и 0,1 мл ИНТФ. После перемешивания содержимого кюветы реакцию инициируют введением 0,1 мл митохондриального препарата. За меру активности фермента принимали количество микромолей НАД, восстановленного за 2 мин. За ходом реакции следят при 510 нм ($\epsilon = 14 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$), записывая изменение светопоглощения раствора (D_2) в кювете в течение 2 мин. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.25.

Т а б л и ц а 8.25

Величины светопоглощения ИНТФ от времени протекания реакции окислительного декарбоксилирования пирувата в присутствии ферментов пируватдегидрогеназного комплекса

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Метод расчета. Активность ферментов ПДК (мкмоль/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле

$$A = \Delta D \cdot V / (14 \cdot t \cdot a),$$

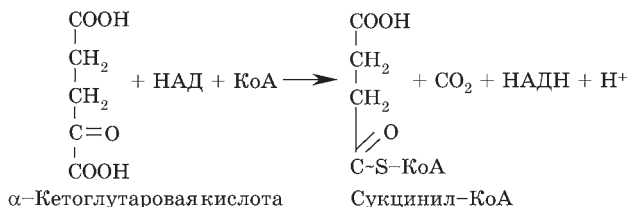
где ΔD — величина светопоглощения ($D_2 - D_1$), усл. ед.; V — конечный объем пробы в кювете, мл; 14 — коэффициент микромолярного светопоглощения ИНТФ при 510 нм;

t — время реакции, мин; a — количество белка в пробе, определенной в суспензии митохондрий, мг.

Оформление работы. Записать величину определенной активности фермента.

8.2.16. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КЕТОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА

Принцип метода. Процесс окислительного декарбоксилирования α -кетоглутаровой кислоты протекает при участии трех ферментов кетоглутаратдегидрогеназного комплекса (КДК): α -кетоглутаратдегидрогеназы, липоил-сукцинилтрансферазы и дигидролипоедегидрогеназы.



Комплекс активируется в присутствии тиаминпирозофосфата, липоевой кислоты, КоА, НАД и ФАД. Активность КДК определяют по образованию НАДН, имеющего максимум светопоглощения при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: спектрофотометры; рН-метры; штатив.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт.; пипетки на 0,1 мл — 6 шт., на 5 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: суспензия митохондрий; 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0; 60,0 мМ раствор α -кетоглутарата, 10,0 мМ раствор НАД; 4,5 мМ раствор SH—КоА; 15,0 мМ 1,4-дигидроксибутирата; 2,0 мМ раствор тиаминпирозофосфата.

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на рН-метре до рН 7,0. Растворы α -кетоглутарата (8,77 мг/мл), НАД (6,63 мг/мл), SH—КоА (3,45 мг/мл), 1,4-дигидроксибутирата (2,32 мг/мл), тиаминпирозофосфата (0,85 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в.

Ход работы. Вначале определяют активность дегидрогеназ (фоновая реакция), присутствующих в исследуемой смеси митохондрий. Для этого в кювету вносят 2,8 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, 0,1 мл 10,0 мМ раствора НАД и 0,1 мл митохондриального препарата. После перемешивания регистрируют изменение светопоглощения раствора (D_1) при 340 нм в течение 1 мин.

Затем измеряют активность ферментов КДК. В кювету последовательно вносят 0,1 мл 60,0 мМ раствора α -кетоглутарата, 0,1 мл 10,0 мМ раствора НАД, 0,1 мл 4,5 мМ раствора SH—КоА, 0,1 мл 15,0 мМ 1,4-дителиотреитола, 0,1 мл 2,0 мМ раствора тиаминпирофосфата и 2;4 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера. Данные о концентрации реагентов, представлены в таблице 8.26.

Таблица 8.26

Названия и концентрации реагентов для определения активности ферментов КДК

Реактивы	Исходная концентрация, мг/мл	Исходная концентрация, мМ	Объем, вносимый в кювету, мл	Концентрация в кювете, мМ
α -Кетоглутарат	8,77	60,0	0,1	2,00
НАД	6,63	10,0	0,1	0,33
КоА	3,45	4,5	0,1	0,15
1,4-Дитиотреитол	2,32	15,0	0,1	0,50
Тиаминпирофосфат	0,85	2,0	0,1	0,067
Буфер	—	—	2,4	—
Митохондриальный препарат	—	—	0,1	—

После перемешивания реакцию инициируют добавлением в кювету 0,1 мл митохондриального препарата и затем регистрируют изменение светопоглощения раствора (D_2) при 340 нм в течение 1 мин. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.27.

Метод расчета. Активность ферментов КДК (мкмоль/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле

$$A = \Delta D \cdot V / (6,22 \cdot t \cdot a),$$

где ΔD — величина светопоглощения ($D_2 - D_1$), усл. ед.; V — конечный объем пробы в кювете, мл; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения НАДН при 340 нм; t — время реакции, мин; a — количество белка в пробе, определенной в суспензии митохондрий, мг.

Таблица 8.27

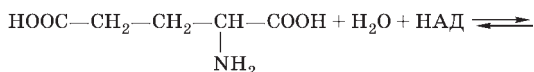
Величины светопоглощения НАДН от времени протекания реакции окислительного декарбоксилирования α -кетоглутарата в присутствии ферментов кетоглутаратдегидрогеназного комплекса

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

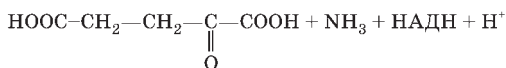
Оформление работы. Записать величину определенной активности фермента и раскрыть роль ферментативного комплекса в метаболизации трикарбоновых кислот.

8.2.17. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Принцип метода. Глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.3) катализирует обратимо реакцию отщепления водорода от L -глутамата с образованием соответствующей кетоаминокислоты, которая подвергается спонтанному гидролизу до α -кетоглутарата. В качестве коферментов могут быть как НАД, так и НАДФ.



L -Глутаминовая кислота



α -Кетоглутаровая кислота

Основным местом локализации фермента служат митохондрии, где он преимущественно располагается на внутренней поверхности и матриксе. В составе фермента

8 идентичных субъединиц с молекулярной массой $4 \cdot 10^5$ Да. На каждом N-конце полипептидной цепи располагается аланин, а на С-конце — треонин. Функционально активной группой активного центра фермента служит триптофан. Кроме того, фермент имеет два аллостерических участка. Регуляторное действие на фермент оказывают производные аденозина (АТФ, АДФ и др.), активирующие реакции окисления глутамата, тогда как производные гуанозина и инозина (ГТФ, ИТФ и др.) способны ингибировать активность фермента.

Принцип метода. В данном методе активность глутаматдегидрогеназы изучается по образованию НАДФН, регистрируя светопоглощение при 340 нм.

Оборудование: спектрофотометр; рН-метр; рефрижераторная центрифуга.

Посуда: колбы на 500 мл — 2 шт., на 100 мл — 6 шт.; пипетки на 5 мл — 2 шт., на 1 мл — 1 шт., на 0,2 мл — 1 шт., на 0,1 мл — 2 шт.; цилиндры и пробирки.

Материалы и реактивы: митохондриальный препарат; 0,25 М раствор сахарозы; 0,25 М буфер *трис*-HCl, pH 8,2; 0,5%-ный раствор тритона X-100; 1,8 мМ раствор НАДФ; 0,75 М раствор глутаминовой кислоты; 0,05 М Na,К-фосфатный буфер, pH 8,2; 1 мМ раствор ЭДТА; раствор фермента.

Приготовление рабочих растворов. 0,25 М раствор сахарозы (85,6 мг/мл), 1,8 мМ раствор НАДФ (1,34 мг/мл), 0,75 М раствор глутаминовой кислоты (110,3 мг/мл) и 1 мМ раствор ЭДТА (0,292 мг/мл) готовят на бидистиллированной воде; раствор тритона X-100 готовят на 0,05 М Na,К-фосфатном буфере, растворяя 0,5 г тритона X-100 в 99,5 г буфера; буферный раствор *трис*-HCl готовят из 0,25 М исходных растворов триса и HCl путем их смешивания до pH 8,2 на рН-метре.

Ход определения. В спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 0,3 мл 1 мМ ЭДТА, 0,1 мл 1,8 мМ раствора НАДФ и 2,3 мл 0,25 М *трис*-HCl буфера, pH 8,2. После перемешивания в кювету добавляют 0,1 мл митохондриального супернатанта. После перемешивания реакцию инициируют введением 0,2 мл 0,75 М раствора

глутаминовой кислоты. Изменение поглощения регистрируют при 340 нм в течение 1–2 мин.

Метод расчета. Активность глутаматдегидрогеназы (мкмоль НАДФ/мин на 1 мг белка или 1 г влажной массы) рассчитывают по формуле

$$A_{\text{ГДГ}} = \frac{\Delta D \cdot V \cdot 1000}{t \cdot 6,22 \cdot a} \quad \text{или} \quad A_{\text{ГДГ}} = \frac{\Delta D \cdot V \cdot 1000}{t \cdot 6,22 \cdot P},$$

где ΔD — изменение поглощения раствора; V — объем пробы в кювете, мл; t — время проведения реакции, мин; a — количество белка, определенное по методу Лоури, мг; P — навеска ткани, г.

Оформление работы. Определить активность глутаматдегидрогеназы в исследуемой ткани, раскрыть роль фермента в превращении глутамата.

8.2.18. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Принцип метода. Цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1) катализирует реакции окисления восстановленных цитохромов. Фермент локализуется во внутренней мембране митохондрий, состоит из нескольких субъединиц. В качестве простетической группы содержит гемин. Активность фермента определяется спектрофотометрически по изменению поглощения восстановленного цитохрома c при 550 нм ($\epsilon = 8000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: спектрофотометр; центрифуга; весы.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 25 мл — 2 шт.; пипетки на 2 мл — 2 шт.; фарфоровая ступка с пестиком.

Материалы и реактивы: 0,15 М Na-фосфатный буфер рН 7,4; гидросульфит, феррицианид калия; 0,25–0,5 мкМ раствор восстановленного цитохрома c .

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,15 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на рН-метре до рН 7,4. Раствор восстановленного цитохрома c готовят, растворяя 52 мг навески в 25 мл бидистиллированной воды. Затем после перемешивания берут 3 мл приготовленного раствора и смешивают с 17 мл буферного раствора, рН 7,4. К смеси добавляют 70 мг

гидросульфита, который восстанавливает цитохром *c*, при этом раствор приобретает розовый цвет.

Приготовление супернатанта. Все работы проводят при 0°C, используя охлажденные растворы. Навеску растительной ткани массой 0,4–0,6 г растирают в фарфоровой ступке с добавлением 0,15 М фосфатного буфера, рН 7,4. Гомогенат переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят буфером до метки. Вытяжку центрифугируют в течение 15 мин при 3000–4000 об/мин при температуре + 4°C, полученный супернатант используют в опыте.

Ход работы. В опытную кювету вносят 1,5 мл супернатанта или взвеси митохондрий и добавляют 1,5 мл восстановленного цитохрома *c*. После перемешивания через 30 с, а затем через 1–2 мин в течение 5–10 мин производят измерение поглощения на спектрофотометре при 550 нм. При окислении цитохрома *c* цитохромоксидазой поглощение понижается. По истечении времени опыта для полного окисления оставшегося неокисленным цитохрома *c* в кювету добавляют 1–2 кристаллика феррицианида калия. Смесь перемешивают и вновь измеряют светопоглощение раствора при 550 нм. Величину светопоглощения рассчитывают по следующей формуле:

$$D = (D_1 - D_2) - (D_2 - D_3),$$

где D_1 — оптическая плотность исследуемого раствора в начале опыта (первое измерение); D_2 — оптическая плотность раствора в конце опыта; D_3 — оптическая плотность раствора после окисления цитохрома красной кровяной солью.

Метод расчета. Активность цитохромоксидазы ($A_{\text{цо}}$, мкмоль/мин г массы) определяют по следующему уравнению:

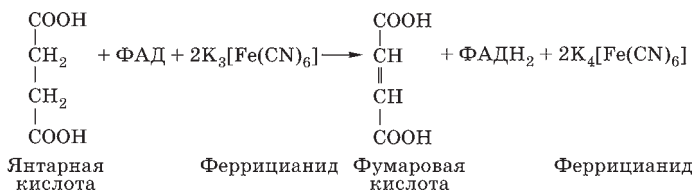
$$A_{\text{цо}} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{8 \cdot t \cdot P \cdot V_2}, \text{ мкмоль/мин} \cdot \text{г},$$

где dD — светопоглощение образца, усл. ед.; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем гомогената ткани, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; 8 — коэффициент микромольного светопоглощения.

Оформление работы. Записать результаты опыта, описать строение и механизм действия цитохромоксидазы, нарисовать формулу гемина.

8.2.19. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Принцип метода. Сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1) относится к флавиновым ферментам, катализирующим реакции дегидрирования (окисление) янтарной кислоты до фумаровой. Простетическая группа фермента ФАД связана ковалентно с апобелком. СДГ обладает высокой субстратной специфичностью по отношению к янтарной кислоте. Фермент входит в состав II комплекса электрон-транспортной системы и локализуется во внутренней мембране митохондрий. Конкурентными ингибиторами фермента являются фумарат, малонат, оксалоацетат. Последний ингибирует СДГ необратимо. Для определения активности СДГ используется феррицианид калия. В реакции феррицианид, имеющий желтую окраску, восстанавливается до бесцветного ферроцианида калия сукцинатом при участии СДГ. Активность фермента пропорциональна количеству восстановленного феррицианида.



Оборудование: спектрофотометр; центрифуга; шейкер; термостат.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 100 мл — 1 шт., на 25 мл — 5 шт.; центрифужные пробирки; пробирки на 0,1 мл — 5 шт., на 1 мл — 2 шт., на 2 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: суспензия митохондрий, 0,1 М янтарная кислота (рН 7,8); 25 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; 150 мМ азид натрия; 25 мМ ЭДТА (рН 7,8); 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,8); 20% -ная ТХУ.

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на рН-метре до рН 7,8. Растворы феррицианида калия (8,23 мг/мл), азида натрия (9,75 мг/мл) и ТХУ (20 г в 100 г раствора) готовят, растворяя навески в д. в. Раствор янтарной кислоты (11,81 мг/мл) и ЭДТА (7,305 мг/мл) готовят, растворяя навеску в фосфатном буфере рН 7,8.

Ход работы. В две центрифужные пробирки (опыт и контроль) заливают по 1 мл 0,1 М фосфатного буфера и по 0,1 мл растворов янтарной кислоты, ЭДТА, азида натрия и дистиллированной воды. В контрольную пробу добавляют 2 мл 20%-ной ТХУ. Затем к пробам добавляют по 0,5 мл суспензии митохондрий, выделенных из растительной ткани. После перемешивания пробы инкубируют при комнатной температуре в течение 5 мин. Азид натрия используют для ингибирования активности цитохромоксидазы. После этого реакцию иницируют добавлением к пробам 0,1 мл раствора феррицианида калия. Пробы инкубируют в течение 10–15 мин при 30°C. После инкубации реакцию останавливают погружением проб в лед и добавлением к опытной пробе 2 мл 20%-ной ТХУ. После остановки реакции пробы центрифугируют при 2000 об/мин в течение 15 мин для осаждения денатурированного митохондриального белка. Измеряют светопоглощение надосадочной жидкости на ФЭКе или спектрофотометре при 420 нм ($\epsilon = 1000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$). Измерения производят против смеси в составе 20%-ной ТХУ и 0,1 М фосфатного буфера в соотношении 1:1.

Метод расчета. Для определения содержания феррицианида в пробам по результатам фотометрических проб, содержащих от 100 до 1000 мкг феррицианида в 4 мл раствора, строят калибровочную кривую. По разности величин светопоглощения ($D_{\text{к}} - D_{\text{оп}}$) рассчитывают количество феррицианида, восстановленного за время инкубации. Учитывая, что реакция протекает стехиометрически и 1 моль сукцината восстанавливает 2 моля феррицианида, можно выразить активность СДГ количеством кислородного субстрата. Активность фермента (в нмолях сукцината/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле

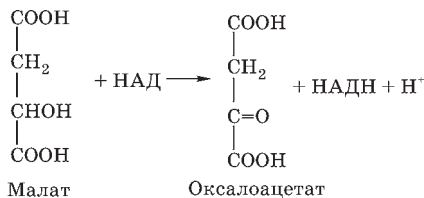
$$A = 1000 \cdot n / (2 \cdot M \cdot m \cdot t),$$

где n — количество восстановленного феррицианида калия в пробе ($D_k - D_{оп}$), мкг; D_k — светопоглощение контрольной пробирки, усл. ед.; $D_{оп}$ — светопоглощение опытной пробирки, усл. ед.; M — молекулярная масса феррицианида калия (329,25 г/моль); m — содержание белка в пробе, мг; t — время инкубации, мин.

Оформление работы. Записать результаты опыта, описать строение и механизм действия сукцинатдегидрогеназы, раскрыть роль СДГ в функционировании митохондрий.

8.2.20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ НАД-ЗАВИСИМОЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Принцип метода. Малатдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.1.37) состоит из двух субъединиц и имеет молекулярную массу 65–70 кДа. Фермент локализуется в митохондриальной и цитоплазматической фракции клеток. Катализирует обратимую реакцию окисления яблочной кислоты (малата) до щавелевоуксусной кислоты (оксалоацетата).



Исследование активности фермента позволяет выявить его роль в переносе восстановленных биогенных соединений, в частности малата, через митохондриальные мембраны. Установить функционирование челночного механизма с участием малата, который способен регулировать соотношение окисленных и восстановленных форм НАД в митохондриальном и цитозольном компартментах клетки и концентраций восстановленных пиридиновых нуклеотидов и оксалоацетата. Кроме того, МДГ участвует в иницировании начальных этапов глюконеогенеза, обеспечивая фосфоенолпируваткарбоксикиназную реакцию субстратом.

Оборудование: ФЭК; центрифуга; гомогенизатор; рН-метр; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрические кюветы шириной 1 см; пипетки на 0,1 мл — 2 шт., на 0,2 мл — 1 шт., на 5 мл — 1 шт.; колба на 500 мл — 3 шт.

Материалы и реактивы: препарат митохондрий; 0,1 М NaOH-глициновый буфер, рН 10,0; 2,55 М раствор малата натрия; 0,075 М раствор НАД.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы глицина и NaOH на рН-метре до рН 10. Растворы малата натрия (398,06 мг/мл) и НАД (49,76 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в.

Выделение МДГ. Осадок митохондрий обрабатывают детергентом тритоном X-100, добавляя 2,0 мл 0,1%-ный раствора к осадку митохондрий, выделенных из 1 г растительных тканей. Полученную суспензию разводят в 10 раз и затем центрифугируют 20 мин при 7000g. Осадок отбрасывают, а супернатант используют в дальнейших исследованиях.

Ход работы. Вначале измеряют фоновую реакцию, которая обусловлена активностью присутствующих в супернатанте посторонних дегидрогеназ. Для этого в кювету вносят 2,7 мл 0,1 М NaOH-глициновый буфер (рН 10,0), 0,1 мл 0,75 М раствора НАД и после перемешивания растворов в кювете добавляют 0,2 мл супернатанта. Реакцию регистрируют с помощью спектрофотометра при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$), записывая изменения светопоглощения (D_1) в течение 1 мин с интервалом 15–20 с.

Затем измеряют активность МДГ, внося в кювету 2,6 мл буфера, 0,1 мл 2,55 М раствора малата натрия, 0,1 мл 0,75 М раствора НАД. После перемешивания смеси в кювете реакцию инициируют внесением 0,2 мл супернатанта. Записывают изменения светопоглощения (D_2) при 340 нм, как описано выше. Полученные результаты измерений записывают в таблицу 8.28.

За меру активности фермента принимали количество микромолей НАД, восстановленного за 1 мин.

Метод расчета. Активность ферментов МДГ (мкмоль/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле

Материалы и реактивы: препарат митохондрий; 0,1 М *трис*-HCl буферного раствора, pH 7,2; 89,4 мМ раствор малата натрия; 2,4 мМ раствор НАДФ; 44,9 мМ раствор MgSO₄.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы триса и HCl на pH-метре до pH 7,2. Растворы малата натрия (13,9 мг/мл), MgSO₄ (5,4 мг/мл) и НАДФ (1,8 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в.

Выделение МДГ. Осадок митохондрий обрабатывают детергентом тритоном X-100, добавляя 2,0 мл 0,1%-ного раствора к осадку митохондрий, выделенных из 1 г тканей. Полученную суспензию разводят в 10 раз и затем центрифугируют 20 мин при 7000g. Осадок отбрасывают, а супернатант используют в дальнейших исследованиях.

Ход работы. Вначале измеряют фоновую реакцию, которая обусловлена активностью присутствующих в супернатанте посторонних дегидрогеназ. Для этого в кювету вносят 2,1 мл 0,1 М *трис*-HCl буфера, 0,1 мл 44,9 мМ раствора MgSO₄, 0,1 мл 2,4 мМ раствора НАДФ и после перемешивания растворов в кювете добавляют 0,2 мл супернатанта. Реакцию регистрируют с помощью спектрофотометра при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$), записывая изменения светопоглощения (D_1) в течение 1 мин с интервалом 15–20 с.

Затем измеряют активность МДГ, внося в кювету 2,0 мл буфера, 0,1 мл 89,4 мМ раствора малата натрия, 0,1 мл 44,9 мМ раствора MgSO₄, 0,1 мл 2,4 мМ раствора НАДФ. После перемешивания смеси в кювете реакцию инициируют внесением 0,2 мл супернатанта. Записывают изменения светопоглощения (D_2) при 340 нм, как описано выше. Полученные результаты измерений записывают в таблицу 8.29.

За меру активности фермента принимали количество микромолей НАДФ, восстановленного за 1 мин.

Метод расчета. Активность ферментов МДГ (мкмоль/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле

$$A = \Delta D \cdot V / (6,22 \cdot t \cdot a),$$

где ΔD — величина светопоглощения ($D_2 - D_1$), усл. ед.; V — конечный объем пробы в кювете, мл; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения НАДФН при 340 нм;

t — время реакции, мин; a — количество белка в пробе, определенной в суспензии митохондрий, мг.

Таблица 8.29

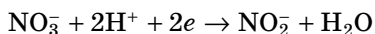
Величины светопоглощения НАДФН от времени протекания реакции окисления малата натрия в присутствии малатдегидрогеназы

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 фермента в метаболизме клеток растений.

8.2.22. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ

Принцип метода. Нитратредуктаза (КФ 1.6.6.2) относится к индуцибельным ферментам, активность которого в растительных клетках возрастает в присутствии нитратов. У проростков пшеницы нитратредуктаза больше всего содержится в побегах. Фермент состоит из двух субъединиц, каждая из которых имеет молекулярную массу, равную 100 кДа. Нитратредуктаза катализирует 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 ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в результате окисления НАД(Ф)Н.

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы; центрифуга; штатив.

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

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

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

Растворы KNO_3 (50,6 мг/мл) и НАДН (4 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в.

Ход работы. В кювету вносят 0,1 мл 0,5 М KNO_3 , 0,1 мл 0,006 М НАДН и 2,1 мл 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,5. Реакцию инициируют внесением 0,2 мл супернатанта. За ходом реакции следят на спектрофотометре, записывая изменения светопоглощения раствора при 340 нм в течение 5 мин с интервалом 15–20 с (v_1).

Фоновую реакцию прописывают аналогично опытной, только вместо 0,1 мл 0,5 М KNO_3 вносят 0,1 мл д. в. (v_2). Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.30.

Таблица 8.30

Величины светопоглощения НАДН 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 фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D , t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.25) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г) (8.26):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.25)$$

$$v_0 = (v_1 - v_2) \frac{V_1 \cdot V_3}{P \cdot V_2}, \quad (8.26)$$

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 — общий 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 8.31.

Таблица 8.31

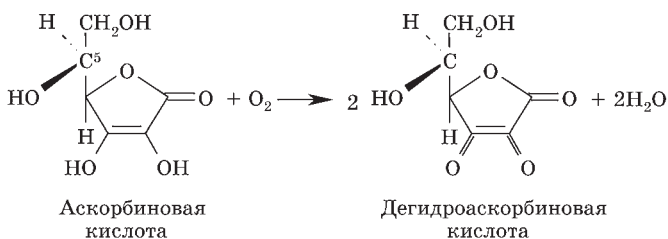
Величины активности нитратредуктазы побегов проростков пшеницы

№ опыта	v_1 , мкМ/мин	v_2 , мкМ/мин	v_0 , мкМ/мин	v_0 , мкмоль/мин г влажной массы
1				
2				
3				
4				

Оформление работы. Записать величину определенной активности фермента.

8.2.23. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АСКОРБАТОКСИДАЗЫ

Принцип метода. Аскорбатоксидаза (КФ 1.10.3.3) катализирует реакции окисления аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую.



Активность фермента можно определять, измеряя светопоглощение аскорбиновой кислоты при 265 нм ($\varepsilon = 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). В процессе реакции светопоглощение при 265 нм будет уменьшаться.

Оборудование: спектрофотометр; весы; центрифуга; гомогенизатор или фарфоровая ступка.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 100 мл — 2 шт., пипетки на 5 мл — 1 шт., на 0,2 мл — 3 шт.; центрифужные пробирки.

Материалы и реактивы: 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,0; 5 мМ раствор MgSO_4 ; 2 мМ раствор аскорбиновой кислоты.

Приготовление растворов. *Буферный раствор* готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на pH-метре до pH 7,0. Растворы MgSO_4 (0,6 мг/мл) и аскорбиновой кислоты (0,352 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в.

Приготовление гомогената. Навеску листьев (2 г) вначале измельчают, а затем растирают в фарфоровой ступке. Гомогенат переносят в центрифужную пробирку на 10 мл, объем которой доводят до метки фосфатным буферным раствором. После перемешивания гомогенат центрифугируют при 7000g в течение 15 мин. Полученный супернатант используют в опыте.

Ход работы. В опытную кювету вносят 2,6 мл 0,1 М фосфатного буфера, 0,1 мл 5 мМ раствора MgSO_4 и 0,1 мл аскорбиновой кислоты. После перемешивания реакцию инициируют введением 0,2 мл супернатанта. Реакцию окисления аскорбиновой кислоты регистрируют на спектрофотометре по уменьшению светопоглощения при 265 нм.

Для определения величины скорости самоокисления аскорбиновой кислоты в контрольную кювету вносят 2,7 мл 0,1 М фосфатного буфера, 0,1 мл 5 мМ раствора MgSO_4 , 0,2 мл аскорбиновой кислоты. После перемешивания реакцию окисления аскорбиновой кислоты регистрируют, как и опытную пробу. За единицу активности фермента принимали количество мкмоль аскорбиновой кислоты, окисленной за 1 мин. При этом из величины скорости опытной пробы вычитали значения скорости самоокисления аскорбиновой кислоты.

Метод расчета. Активность аскорбатоксидазы (мкмоль/мин г) определяют по следующей формуле:

$$A = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{7 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt},$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 7 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого

в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Записать результаты опыта, описать строение и механизм действия аскорбатоксидазы, раскрыть роль фермента в растительных тканях.

8.2.24. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ

Принцип метода. Полифенолоксидаза (КФ 1.14.18.1) катализирует реакции окисления полифенолов. Активность полифенолоксидазы определяют спектрофотометрическим способом, измеряя светопоглощение продуктов окисления пирокатехина при 420 нм.

Оборудование: спектрофотометр; центрифуга; гомогенизатор или фарфоровая ступка; весы.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 100 мл — 1 шт., на 25 мл — 1 шт., центрифужные пробирки.

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

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на pH-метре до pH 7,0. Раствор пирокатехина (5,5 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Приготовление гомогената. Навеску тканей растений (0,5–1 г) растирают в фарфоровой ступке в присутствии буферного раствора. Затем гомогенат переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят бурным раствором до метки. Гомогенат центрифугируют 15 мин при 7000g, а полученный супернатант используют в опыте.

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

Для определения величины скорости самоокисления пирокатехина в контрольную кювету вносят 2,5 мл 0,1 М фосфатного буфера и 0,5 мл раствора пирокатехина. После перемешивания реакцию окисления 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:

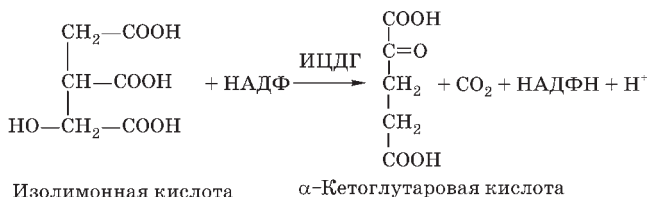
$$A = \frac{dD}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{dt \cdot P \cdot V_2},$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Записать результаты опыта, описать строение и механизм действия полифенолоксидазы, раскрыть роль фермента в растительных тканях.

8.2.25. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ НАДФ-ЗАВИСИМОЙ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Принцип метода. НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.42) катализирует обратимую реакцию окислительного декарбоксилирования изолимонной кислоты в присутствии ионов марганца и НАДФ.



Фермент широко распространен в клетках растений, особенно в митохондриях. Имеет молекулярную массу 64 кДа. Ион марганца каталитического центра может быть замещен на ионы магния и кобальта. В активном центре фермента имеются SH-группы. Ингибиторами НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы могут быть НАДФН₂, НАДН₂ и АТФ, присутствующие в среде в избыточном количестве.

Оборудование: ФЭК; аналитические весы.

Посуда: спектрофотометрическая кювета на 1 см; колбы на 100 мл — 1 шт. и 50 мл — 1 шт.; пробирки — 5 шт.; пипетки на 0,1 мл — 3 шт., 0,2 мл — 1 шт., 5 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: 0,1 М *трис*-HCl буферного раствора, pH 7,5; 4 mM раствор НАДФ; 0,1 М раствора $MnCl_2$; 0,1 М раствора изоцитрата натрия; супернатант зерновок пшеницы.

Приготовление рабочих растворов. Раствор НАДФ готовят путем растворения 61 мг в 20 мл дистиллированной воды; раствор $MnCl_2$ готовят, растворяя 630 мг в 50 мл дистиллированной воды; раствор изоцитрата Na готовят, растворяя 516 мг в 20 мл дистиллированной воды; раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы триса и HCl на pH-метре до pH 7,5.

Ход определения. В кювету последовательно вносят 2,6 мл 0,1 М *трис*-HCl буферного раствора, 0,1 мл 4 mM раствора НАДФ, 0,1 мл 0,1 М раствора $MnCl_2$ и 0,1 мл 0,1 М раствора изоцитрата натрия. После перемешивания реакцию инициировали введением 0,2 мл раствора супернатанта. Активность фермента определяли по скорости окисления изоцитрата и образования НАДФН при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). За меру активности фермента принимают количество микромолей НАДФ, восстановленного за 1 мин. За ходом реакции следят на ФЭКе при 340 нм, записывая величины светопоглощения через 15–20 с в течение 1 мин в таблицу 8.32.

Таблица 8.32

Величины поглощения НАДФН от времени протекания реакции окислительного декарбоксилирования изоцитрата в присутствии НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной в координатах (D ,

t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.27) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г) (8.28):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.27)$$

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.28)$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Записать результаты опыта, описать механизм действия НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы, раскрыть роль фермента в растительных тканях.

8.2.26. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ

Принцип метода. Каталаза (КФ 1.11.1.6) осуществляет реакцию диспропорционирования, т. е. расщепляет перекись водорода до воды и молекулярного O_2 в ходе одностадийной двухэлектронной реакции по схеме:



Соединение



относится к гемсодержащим ферментам. Состоит из четырех субъединиц, каждая из которых содержит гем. Одна молекула фермента способна разложить $44 \cdot 10^3$ молекул H_2O_2 в секунду. В клетках растений фермент локализуется преимущественно в пероксисомах, глиоксисомах и митохондриях. Активность каталазы определяют спектрофотометрически, регистрируя уменьшение светопоглощения H_2O_2 при 230 нм ($\epsilon = 72,7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Оборудование: рН-метр; ФЭК или спектрофотометр; центрифуга; аналитические весы.

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

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0; 0,4 М H_2O_2 .

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на pH-метре до pH 7,0. Перекись водорода, 0,4 М водный раствор, готовят на спектрофотометре при длине волны 230 нм ($\epsilon = 72,7 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Ход работы. Навеску растительной ткани (0,5-1,0 г) размельчают и растирают до однородной массы. К гомогенату добавляют 0,1 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,0) в соотношении 1:3 (на 1 г растительной ткани 3 мл буфера). Гомогенат центрифугируют 15 мин при 7000g. Супернатант используют для определения активности каталазы.

В кювету вносят 0,2 мл супернатанта и 2,7 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,0. Реакцию инициируют добавлением 0,1 мл 0,4 М H_2O_2 . После перемешивания реакцию регистрируют по уменьшению светопоглощения при 230 нм в течение 1 мин. Данные записывают в таблицу 8.33.

Таблица 8.33

Величины светопоглощения перекиси водорода от времени протекания реакции, катализируемой каталазой

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

За меру активности фермента принимали количество микромолей H_2O_2 , разложившейся за 1 мин.

Метод расчета. Активность каталазы ($A_{\text{кат}}$, мкмоль/мин г сухой массы) определяется по формуле

$$A_{\text{кат}} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_2}{dt \cdot P \cdot V_3 \cdot \epsilon \cdot l},$$

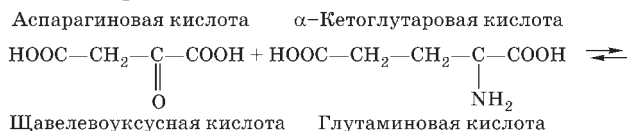
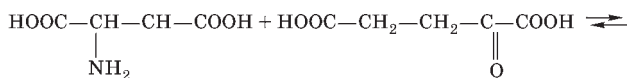
где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; V_1 — общий объем гомогената, мл; V_2 — общий объем раствора в кювете, мл; V_3 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; dt — время реакции; ε — коэффициент молярного светопоглощения, ($72,7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); P — навеска, г; l — ширина кюветы, см.

Оформление работы. Определить активность каталазы, указать места локализации в клетке и раскрыть роль фермента в составе антиоксидантной системы.

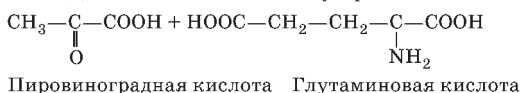
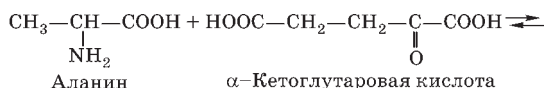
8.2.27. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ

Принцип метода. Аспартаттрансаминаза (КФ 2.1.3.2) и аланинтрансаминаза (КФ 2.6.1.2) катализируют реакции переноса аминогруппы с соответствующей аминокислоты (аспарагиновая кислота или аланин) на кетокислоту.

Аспаратаминотрансфераза катализирует следующую обратимую реакцию трансминирования:



Тогда как аланинаминотрансфераза способна обратимо катализировать следующую реакцию:



В основе метода лежит реакция кетокислоты с 2,4-динитрофенилгидразином, в результате которой образуется гидразон. В щелочной среде гидразон имеет краснокоричневый цвет, интенсивность которого пропорциональна содержанию гидразона в пробе.



Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; рН-метр; термостат.

Посуда: колбы на 500 мл — 4 шт., на 100 мл — 3 шт.; пипетки на 0,2 мл — 2 шт., на 1 мл 4 шт., на 10 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: 0,25 М раствор сахарозы; 0,1 М К-фосфатный буфер, рН 7,4; 0,001 М раствор пирувата натрия (стандарт); 0,2%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина; 0,4 М раствор NaOH.

Реактив 1. Субстраты для определения активности АсТ: 0,2 М раствор аспарагиновой кислоты и 0,002 М раствор α-кетоглутаровой кислоты.

Реактив 2. Субстраты для определения активности АлТ: 0,2 М раствор аланина и 0,002 М раствор α-кетоглутаровой кислоты.

Приготовление рабочих растворов. Раствор сахарозы (85,6 мг/мл) готовят на д. в.; стандартный раствор пирувата натрия (0,11 мг/мл) готовят на д. в.; раствор 2,4-динитрофенилгидразина готовят путем растворения навески (20 мг/мл) в 1 М растворе HCl; раствор 0,4 М NaOH (16 мг/мл) и 1 М NaOH (40 мг/мл) готовят на д. в.

Реактив 1. Субстраты для определения активности АсТ: аспарагиновая кислота (26,6 мг/мл) и α-кетоглутаровая кислота (0,292 мг/мл), растворяют в 1 М растворе NaOH, осторожно приливая едкий натр небольшими порциями до рН 7,4.

Реактив 2. Субстраты для определения активности АлТ: аланин (17,8 мг/мл) и α-кетоглутаровая кислота (0,292 мг/мл), готовят, как описано выше при приготовлении реактива 1.

Построение калибровочного графика. В 6 пробирок согласно таблице последовательно вносят ингредиенты: стандартный раствор и д. в.

Растворы пирувата натрия для построения калибровочного графика

Пробирки	Стандартный раствор пирувата натрия, мл	Дистиллированная вода, мл	Светопоглощение D , усл. ед.	Содержание пирувиноградной кислоты	
				мкг	мкМ
1	0,05	0,55		4,4	0,05
2	0,10	0,50		8,8	0,10
3	0,15	0,45		13,2	0,15
4	0,20	0,40		17,7	0,20
5	0,25	0,35		22,0	0,25
6	0,30	0,30		26,4	0,30

После перемешивания в каждую пробирку добавляют по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, оставляют при комнатной температуре на 20 мин и после этого во все пробирки приливают по 5 мл 0,4 М раствора NaOH. Через 30 мин измеряют светопоглощение растворов при 505 нм против контрольной пробы, в которую вместо раствора пирувата добавляют дистиллированную воду. Калибровочную кривую строят на миллиметровой бумаге, определяя количество микромолей пирувата, соответствующее разнице поглощения раствора гидрогена в опыте и контроле.

При построении калибровочного графика на оси ординат откладывают величины поглощения (D , усл. ед.), на оси абсцисс — соответствующее ей содержание пирувата в мкМ или мкг.

Ход определения. Для анализа берут 1 г ткани и после добавления 9 мл 0,25 М раствора сахарозы гомогенизируют. Все операции производят на холоду. Гомогенат центрифугируют 10 мин при 10^3g , осаждая ядра и неразрушенные клетки. Супернатант используют для определения активности АсТ и АлТ. В связи с тем, что активность ферментов в тканях высока, необходимо производить несколько разбавлений супернатанта в 10, 50, 100 и 200 раз.

Определение активности АсТ. В пробирку вносят 0,5 мл реактива 1 и прогревают при $+37^\circ\text{C}$ в течение 5 мин. Затем добавляют 0,1 мл разбавленного супернатанта и после перемешивания пробирку помещают в термостат при $+37^\circ\text{C}$ на

1 ч. Параллельно ставят контрольную пробу, в которую не вносят субстрат и также устанавливают в термостат. Затем к опытной и контрольной пробам прибавляют по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина.

В контрольную пробирку после добавления 2,4-динитрофенилгидразина вносят 0,5 мл субстрата. Пробы оставляют на 20 мин при комнатной температуре, а затем во все пробирки вносят по 0,5 мл 0,4 М NaOH. Перемешивают и через 30 мин измеряют светопоглощение растворов при 505 нм.

Определение активности АлТ. В пробирку вносят 0,5 мл реактива 2, прогревают при +37°C в течение 5 мин, а затем добавляют 0,1 мл разбавленного супернатанта. После перемешивания пробу помещают в термостат на 30 мин при +37°C. Дальнейший ход анализа осуществляется так же, как и при определении активности АсТ.

Метод расчета. По калибровочной кривой определяют количество пирувата, соответствующее разнице поглощения раствора гидразона в опыте и контроле. Активность ферментов (мкмоль/ч·г влажной массы) рассчитывают по следующей формуле:

$$A = \frac{2 \cdot C \cdot V_1 \cdot V_2}{t \cdot P \cdot V_3},$$

где C — количество пирувата, определенное по калибровочному графику, мкМ; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — объем реакционной среды в кювете, мл; V_3 — объем супернатанта, вносимый в кювету, мл; t — время проведения реакции, 1 ч; P — навеска ткани, г.

Оформление работы. Построить калибровочный график и определить активность ферментов в исследуемом образце растительной ткани.

8.2.28. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЕКСОКИНАЗЫ

Принцип метода. Гексокиназа (КФ 2.7.1.1) катализирует реакции фосфорилирования гексоз, присоединяя остаток фосфорной кислоты от АТФ к гидроксильной группе при шестом атоме углерода. Для определения активности

гексокиназы используют Г6ФДГ, в присутствии которой протекает реакция дегидрирования глюкозо-6-фосфата. В реакции происходит восстановление НАДФ, продукт которой имеет светопоглощение при 340 нм.

Оборудование: спектрофотометр; холодильник; рН-метр; центрифуга; аналитические весы.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 100 мл — 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 4 шт., на 0,2 мл — 1 шт., 1,0 мл — 1 шт., 5,0 мл — 2 шт., центрифужные пробирки.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; 0,1 М *трис*-HCl буфер, рН 7,5; 0,1 М раствор $MgCl_2$; 7,5 мМ раствор НАДФ; 0,5 М раствор глюкозы; 0,1 М раствор АТФ; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (20 Е/мл).

Приготовление растворов. Буферный раствор готовят из исходных 0,1 М растворов *триса* и HCl путем их смешивания на рН-метре до рН 7,5. Растворы $MgCl_2$ (9,52 мг/мл), НАДФ (5,58 мг/мл), глюкозы (90,1 мг/мл), АТФ (50,7 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в.

Ход работы. Вначале в опытную кювету вносят 0,1 мл 0,1 М АТФ, 0,4 мл 0,5 М раствора глюкозы и 2,0 мл *трис*-HCl буфера, рН 7,5. Реакцию с участием гексокиназы иницируют введением 0,1 мл супернатанта. Перемешиваем и через 5 мин в кювету добавляем 0,05 мл НАДФ, 0,3 мл $MgCl_2$ и 0,05 мл Г6ФДГ. После перемешивания за ходом реакции следят на спектрофотометре при 340 нм, записывая изменения светопоглощения (D_2) в течение 1 мин с интервалом 15–20 с.

В контрольную кювету вносят 0,05 мл НАДФ, 0,3 мл $MgCl_2$, 0,1 мл супернатанта, 0,05 мл Г6ФДГ и 2,5 мл *трис*-HCl буфера, рН 7,5. После этого измеряют изменение светопоглощения раствора (D_1) при 340 нм, как и опытной пробы. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.35.

За меру активности фермента принимали количество микромолей НАД, восстановленного за 1 мин.

Метод расчета. Активность фермента определяют по тангенсу угла наклона кривой, построенной на миллиметровой бумаге в координатах (D , t), или по формуле для очищенных образцов (мкМ/мин) (8.29) и супернатанта тканей (мкмоль/мин г массы) (8.30):

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{6,22 \cdot l \cdot dt}, \quad (8.29)$$

$$v = \frac{dC}{dt} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt}, \quad (8.30)$$

где dD — величина светопоглощения ($D_2 - D_1$), усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — объем для экстракции, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Таблица 8.35

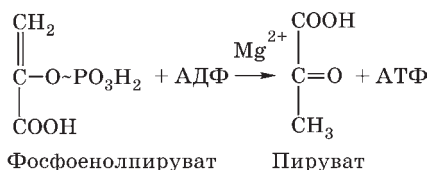
Величины светопоглощения НАДН от времени протекания реакции окисления глюкозо-6-фосфата в присутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Измерения (опыт)	Время реакции t , с	Светопоглощение D_2 , усл. ед.	Измерения (контроль)	Время реакции t , с	Светопоглощение D_1 , усл. ед.
1			1		
2			2		
3			3		
4			4		

Оформление работы. Определить активность фермента в супернатанте и в готовом препарате. Раскрыть роль фермента в метаболизме клеток растений.

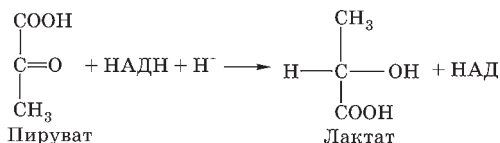
8.2.29. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПИРУВАТКИНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Принцип метода. Пируваткиназа (ПК, КФ 2.7.1.40) катализирует необратимую реакцию превращения фосфоенолпирувата в пируват, сопровождающуюся образованием АТФ. Для протекания реакции требуются ионы Mg^{2+} .



Фермент состоит из четырех идентичных субъединиц. Молекулярная масса тетрамера пируваткиназы составляет 200–250 кДа, а субъединицы имеют молекулярную массу, равную 50–61 кДа. Пируваткиназа относится к группе аллостерических ферментов, проявляет высокую специфичность по отношению к фосфоенолпирувату. Пируваткиназа скелетных мышц ингибируется АТФ, ацетил-КоА, ионами Na^+ . Активаторами фермента являются ионы K^+ , Mg^{2+} .

Активность пируваткиназы определяют по образованию пирувата, количество которого измеряют в системе, содержащей лактатдегидрогеназу.



Скорость реакции измеряют по уменьшению светопоглощения при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы; центрифуга; штатив.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 100 мл — 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 7 шт., на 5 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: скелетные мышцы кролика; 0,1 М *трис*-HCl буфер, pH 7,4; 5 мМ раствор НАДН; 3,0 М раствор KCl; 0,3 М раствор MgCl_2 ; 60 мМ раствор АДФ; 24 мМ раствор фосфоенолпирувата; лактатдегидрогеназа 5 ед./мл.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы HCl и триса на pH-метре до pH 7,5.

Растворы НАДН (3,33 мг/мл), АДФ- $\text{Na}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (30,5 мг/мл), KCl (223,5 мг/мл), фосфоенолпирувата (4,03 мг/мл) и MgCl_2 (28,56 мг/мл) готовят, растворяя соответствующие навески в б. в.

Ход работы. В кювету последовательно вводят реагенты, как показано в таблице 8.36.

После перемешивания растворов в кювете реакцию иницируют добавлением 0,1 мл супернатанта и затем регистрируют изменение светопоглощения раствора при 340 нм в течение 1–2 мин. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.37.

Реагенты и порядок их внесения в кювету при изучении активности пируваткиназы

Реагенты	Исходная концентрация реагента, М	Объем реагента вносимый в кювету, мл	Концентрация реагента в кювете, мМ
MgCl ₂	0,300	0,1	10,00
НАДН	0,005	0,1	0,16
АДФ	0,060	0,1	2,00
Фосфоенолпируват	0,024	0,1	0,80
KCl	3,000	0,1	100,00
Буфер	0,100	2,3	76,66
ЛДГ	—	0,1	—

Величины поглощения НАДН от времени протекания реакции восстановления пировиноградной кислоты в присутствии лактатдегидрогеназы, которая образуется в реакции превращения фосфоенолпирувата в пируват с участием АДФ

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Метод расчета. Активность фермента (мкмоль/мин г массы) в супернатанте ткани определяют по формуле

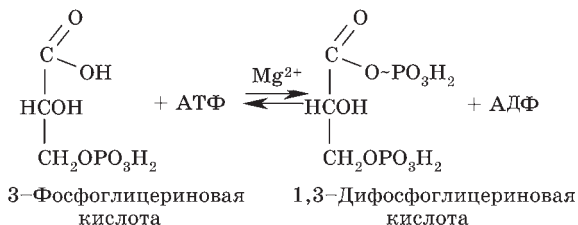
$$A = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt},$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Определить активность фермента в супернатанте и в исследуемой навеске. Раскрыть роль фермента в метаболизме клеток растений и животных.

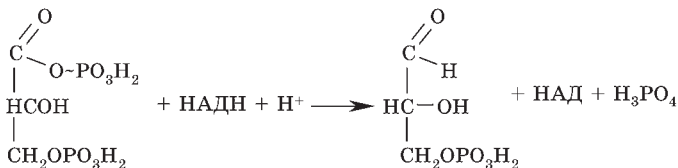
8.2.30. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ 3-ФОСФОГЛИЦЕРАТКИНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Принцип метода. 3-Фосфоглицераткиназа (3ФГКа, КФ 2.7.2.3) катализирует обратимо реакцию фосфорилирования 3-фосфоглицериновой кислоты (3ФГК) с участием АТФ в качестве донора фосфатной группы. В результате реакции образуется 1,3-дифосфоглицериновая кислота (1,3ДФГК) и АДФ.



Фермент состоит из одной полипептидной цепи, в составе которой 420 аминокислотных остатков. Молекулярная масса 3-фосфоглицераткиназы 47 кДа. Фермент из мышц кролика содержит семь SH-групп, некоторые из них входят в состав активного центра. Поэтому ингибиторами 3ФГКа могут быть ионы тяжелых металлов и ртутьсодержащие соединения. Активаторами фермента являются ионы Mg^{2+} и Mn^{2+} . Величина константы Михаэлиса для 3-фосфоглицерата составляет 0,2 мМ, 1,3-дифосфоглицерата — 1,8 мкМ, АТФ — 0,1 мМ, АДФ — 0,2 мМ, ионов Mg^{2+} — 0,2 мМ.

Активность 3ФГКа определяют в сопряженной системе, используя глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Последняя катализирует реакцию восстановительного дефосфорилирования 1,3-дифосфоглицериновой кислоты.



Скорость реакции измеряют по уменьшению светопоглощения при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы; центрифуга; штатив.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 100 мл — 1 шт.; пробирки на 0,1 мл — 5 шт., на 0,2 мл — 1 шт., на 5 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: скелетные мышцы кролика; 0,1 М триэтаноламиновый буфер, pH 7,5; 6 мМ раствор НАДН; 0,12 М раствор АТФ; 0,3 М раствор 3-фосфоглицериновой кислоты; 0,2 М раствор MgSO_4 ; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы HCl и триэтаноламина на pH-метре до pH 7,5.

Растворы НАДН (4 мг/мл), $\text{АТФ} \cdot \text{Na}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (72,62 мг/мл), 3-фосфоглицериновой кислоты (55,83 мг/мл) и MgSO_4 (24,07 мг/мл) готовят, растворяя соответствующие навески в б. в.

Ход работы. В кювету последовательно вводят реагенты, как показано в таблице 8.38.

Таблица 8.38

Реагенты и порядок их внесения в кювету
при изучении активности 3-фосфоглицераткиназы

Реагенты	Исходная концентрация реагента, М	Объем реагента вносимый в кювету, мл	Концентрация реагента в кювете, мМ
MgSO_4	0,20	0,15	10,0
НАДН	0,006	0,10	0,2
АТФ	0,12	0,10	4,0
ЗФГК	0,30	0,10	10,0
Буфер	0,10	2,35	78,0
Галь3ФДГ	—	0,1	—

После перемешивания растворов в кювете реакцию инициируют добавлением 0,1 мл супернатанта и затем регистрируют изменение светопоглощения раствора при 340 нм в течение 1–2 мин. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.39.

Величины поглощения НАДН от времени протекания реакции восстановительного дефосфорилирования 1,3-дифосфоглицериновой кислоты в присутствии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, которая образуется в реакции фосфорилирования 3-фосфоглицериновой кислоты с участием АТФ

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Метод расчета. Активность фермента (мкмоль/мин г массы) в супернатанте ткани определяют по формуле

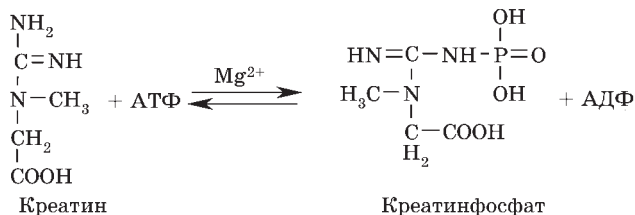
$$A = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt},$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Определить активность 3-фосфоглицераткиназы в супернатанте и в исследуемой навеске. Раскрыть роль фермента в метаболизме клеток растений и животных.

8.2.31. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КРЕАТИНКИНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ СЛОЖНОЙ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Принцип метода. Креатинкиназа (КК, КФ 2.7.3.2) катализирует реакции переноса фосфорильной группы с АТФ на креатин с образованием креатинфосфата и АДФ.



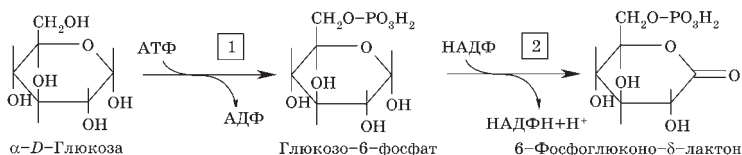
Фермент цитоплазмы клетки состоит из двух субъединиц, каждая из которых имеет молекулярную массу в 40–43 кДа, полипептидная цепь содержит 360 аминокислотных остатков.

Митохондриальный фермент выделен в виде димера, гексамера и октамера.

В активном центре и вблизи него располагаются функционально важные аминокислотные остатки (лизин, цистеин, триптофан, аргинин, тирозин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты), содержащие SH-, NH₂-, OH- и COOH-группы, которые принимают участие в катализе и межсубъединичных взаимодействиях.

Активаторами креатинкиназы являются ионы Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, а ингибиторами фермента служат ионы HCO³⁻, HSO²⁻, NO³⁻, NO²⁻, Cl⁻, Br⁻, F⁻.

Для определения активности креатинкиназы предлагается использовать энзиматическую систему, в состав которой входят гексокиназа (1) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (2).



Скорость ферментативной реакции измеряют по возрастанию светопоглощения при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы; центрифуга; штатив.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт.; пипетки на 0,1 мл — 10 шт., на 5 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: скелетные мышцы кролика; 0,1 М трис-HCl буфер, pH 7,2; 0,3 М раствор креатинфосфата; 0,03 М раствор АДФ; 0,6 М раствор Mg(CH₃COO)₂; 0,3 М раствор АМФ; 0,06 М раствор глюкозы; 7,5 мМ раствор НАДФ; 30 мМ раствор дитиотреитола; гексокиназа 0,5 ед./мл; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 0,5 ед./мл.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы HCl и триса на pH-метре до pH 7,2.

Растворы НАДФ (5,58 мг/мл), АДФ- $\text{Na}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (15,3 мг/мл) и АМФ (104,16 мг/мл) готовят, растворяя соответствующие навески в 0,1 М *трис*-HCl буфере, pH 7,2.

Растворы креатинфосфата (63,4 мг/мл), $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (85,45 мг/мл), глюкозы (10,82 мг/мл) и дитиотреитола (4,63 мг/мл) готовят, растворяя соответствующие навески в б. в.

Ход работы. В кювету последовательно вводят реагенты, как показано в таблице 8.40.

Т а б л и ц а 8.40

Реагенты и порядок их внесения в кювету при изучении активности пируваткиназы

Реагенты	Исходная концентрация реагента, М	Объем реагента, вносимый в кювету, мл	Концентрация реагента в кювете, мМ
АДФ	0,03	0,10	1,0
$\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	0,60	0,05	10,0
Глюкоза	0,06	0,10	2,0
НАДФ	0,0075	0,10	0,25
АМФ	0,30	0,10	10,0
Дитиотреитол	0,03	0,10	1,0
Буфер	0,1	2,15	72,0
Гексокиназа	—	0,10	—
Г6ФДГ	—	0,10	—
Супернатант	—	0,10	—

После перемешивания растворов в кювете реакцию инициируют добавлением 0,1 мл креатинфосфата и затем регистрируют изменение светопоглощения раствора при 340 нм в течение 1–2 мин. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.41.

Метод расчета. Активность креатинкиназы (мкмоль/мин г массы) в супернатанте ткани определяют по формуле

$$A = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt},$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина

кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Таблица 8.41

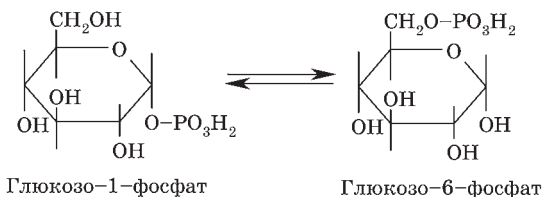
Величины поглощения НАДН от времени протекания реакции в энзиматической системе с участием трех ферментов (креатинкиназа, гексокиназа и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа)

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Оформление работы. Определить активность креатинкиназы в супернатанте и в исследуемой навеске. Раскрыть роль фермента в метаболизме скелетных мышц животных.

8.2.32. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФОСФОГЛЮКОМУТАЗЫ С ПОМОЩЬЮ Г6ФДГ

Принцип метода. Фосфоглюкомутаза (ФГМ, КФ 2.7.5.1) катализирует реакции внутримолекулярного переноса остатка фосфата между углеродами C_1 и C_6 в молекуле глюкозы.



Равновесие при pH 7,5 сдвинуто в сторону образования глюкозо-6-фосфата. Реакция протекает в присутствии иона Mg^{2+} и кофермента — глюкозо-1,6-дифосфата. В состав полипептидной цепи молекулы фермента из мышц кролика входит 561 остаток аминокислот. Молекулярная масса фермента равна 61,6 кДа. Активность проявляет только фосфорилированная форма фосфоглюкомутазы, которая

образуется как промежуточная форма при переносе фосфорильной группы с глюкозо-1,6-дифосфата на остаток серина-116, расположенного в активном центре фермента. В процессе катализа фермент выполняет роль донора и акцептора фосфата. Для протекания реакции необходим ион Mg^{2+} , который, связываясь с фосфорильной группой фермента, оказывает влияние на равновесие реакции. Для активации фермента используется имидазол или гистидин. Ингибиторами фермента могут быть фруктозо-1,6-дифосфат и 2,3-дифосфоглицерат.

Активацию фосфоглюкомутазы проводят в среде, содержащей 1 мМ $MgCl_2$ и 30 мМ гистидин, выдерживая фермент в течение 20 мин при 0°C.

Для определения активности фосфоглюкомутазы используется сопряженная система, содержащая два фермента (фосфоглюкомутаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) и НАДФ. При этом в системе должен быть избыток Г6ФДГ, которая катализирует реакцию окисления глюкозо-6-фосфата и восстановления НАДФ до НАДФН. Последний имеет максимум поглощения при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы; центрифуга; штатив.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 100 — 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 6 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: гомогенат ткани; 0,05 М *трис*-HCl буфер, pH 7,5; 60 мМ раствор глюкозо-1-фосфата; 30 мкМ раствор глюкозо-1,6-дифосфата; 0,3 М раствор $MgCl_2$; 6 мМ раствор НАДФ; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 0,02 ед./мл.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,05 М растворы триса и HCl на pH-метре до pH 7,5. Растворы глюкозо-1-фосфата (15,6 мг/мл) и глюкозо-1,6-дифосфата (0,0102 мг/мл) готовят, растворяя соответствующие навески в 0,05 М *трис*-HCl буфере, pH 7,5. Растворы $MgCl_2$ (28,6 мг/мл) и НАДФ (4,46 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Для активации фосфоглюкомутазы в гомогенат добавляют $MgCl_2$ (0,0953 мг/мл) и гистидин (4,66 мг/мл), а затем выдерживают смесь в течение 20 мин при 0°C.

Ход работы. В кювету последовательно вносим 0,1 мл 60 мМ раствора глюкозо-1-фосфата, 0,1 мл 30 мкМ раствора глюкозо-1,6-дифосфата, 0,1 мл 0,3 М раствора $MgCl_2$, 0,1 мл 6 мМ раствора НАДФ, 2,5 мл 0,05 М *трис*-HCl буфера (pH 7,5) и 0,05 мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. После перемешивания растворов в кювете реакцию инициируют добавлением 0,05 мл супернатанта и затем регистрируют изменение светопоглощения раствора при 340 нм в течение 1–2 мин. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.42.

Таблица 8.42

Величины поглощения НАДФН от времени протекания реакции дегидрирования глюкозо-6-фосфата в присутствии глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, образуемого в реакции внутримолекулярного переноса остатка фосфата с глюкозо-1-фосфат на глюкозо-6-фосфат

Измерения	Время реакции t , с	Светопоглощение D , усл. ед.
1		
2		
3		
4		

Метод расчета. Активность фермента (мкмоль/мин г массы) в супернатанте ткани определяют по формуле

$$A_{\text{ФГМ}} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt},$$

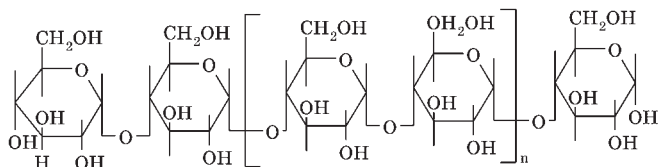
где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Оформление работы. Определить активность фермента в супернатанте и в исследуемой навеске. Раскрыть роль фермента в метаболизме клеток растений и животных.

8.2.33. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ α -АМИЛАЗЫ

Принцип метода. α -Амилаза (α -1,4 D -глюкан-глюкано-гидролаза, КФ 3.2.1.1) катализирует реакцию гидролиза

α -1,4-гликозидных связей крахмала. Конечными продуктами гидролиза крахмала являются мальтоза и мальтотриоза.



Нередуцирующий конец Участок действия амилазы Редуцирующий конец

Активность амилазы может возрасти в присутствии ионов хлора. Оптимум pH фермента приходится на 6,5–7,5. Фермент содержит один ион кальция на молекулу белка. Поэтому в присутствии ЭДТА, оксалата и цитрата наблюдается ингибирование активности амилазы, которая обусловлена связыванием ионов кальция этими соединениями.

В основе предлагаемого метода используется реакция гидролитического расщепления нерастворимого цветного крахмального субстрата α -амилазой, протекающая с выделением свободного синего, растворимого в воде красителя. Количество освобожденного красителя в единицу времени пропорционально активности фермента.

Оборудование: pH-метр; спектрофотометр или фотоэлектроколориметр; центрифуга; магнитная мешалка; термостат.

Посуда: пипетки на 2 мл — 2 шт., 1 мл — 2 шт., 0,1 мл — 2 шт.; колбы мерные на 50 мл — 2 шт.; стакан на 50 мл; воронка.

Материалы и реактивы: зерновки пшеницы; буферный раствор (0,06 М фосфатный буферный раствор, pH 7, с 0,01 М NaCl); субстрат (цветной крахмал) — 0,6 г; осаждающий раствор (3%-ный раствор ТХУ с 1,85 М магнием сернокислым).

Приготовление рабочих растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,06 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на pH-метре до pH 7,0 с добавлением NaCl (0,585 мг/мл).

Суспензия субстрата. В стакан емкостью 50 мл вносят 10 мл разбавленного буферного раствора и при постоянном перемешивании на магнитной мешалке медленно добавляют 0,1 г субстрата (цветного крахмала). Продолжают перемешивать до возникновения гомогенной суспензии (15–20 мин). Приготовленную таким образом суспензию можно хранить одну неделю при температуре от +1° до +4°С.

Ход работы. Определение активности α -амилазы проводят следующим образом. В опытную и контрольную пробирки вносят по 1 мл суспензии субстрата. Пробирки прогревают в течение 5 мин при 37°С, затем добавляют в опытную пробирку 1,0 мл супернатанта растительной ткани, в которой определяется активность фермента. В контрольную пробирку добавляют 1,0 мл д. в. Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют точно 15 мин при 37°С. После этого добавляют в обе пробирки по 2,0 мл осаждающего раствора, перемешивают при комнатной температуре 15 мин. Супернатант отделяют от образовавшегося осадка центрифугированием 5–10 мин при 3000 об/мин, переносят в кювету шириной 0,5 см и измеряют светопоглощение (D) раствора из опытной пробирки по сравнению с раствором из контрольной пробирки при 590 нм.

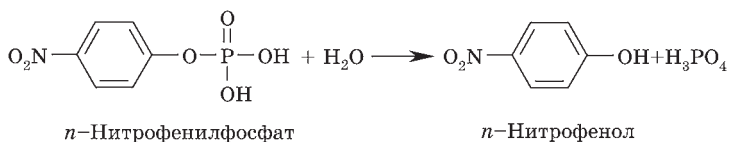
Метод расчета. Активность α -амилазы в пробе определяют по следующей формуле:

$$A = D \cdot 1083, \text{ Е/л.}$$

Оформление работы. Записать результаты опыта и определить активность амилаз в зерновках пшеницы.

8.2.34. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

Принцип метода. Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1) катализирует реакции гидролиза сложных эфиров фосфорной кислоты. Для определения активности щелочной фосфатазы используется n -нитрофенилфосфат, который гидролизуется ферментом с образованием n -нитрофенола, обуславливающего появление желтой окраски раствора в щелочной среде.



Максимум светопоглощения *n*-нитрофенола при pH 9–10 приходится на 400 нм ($\varepsilon = 18300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Интенсивность окраски раствора пропорциональна активности фермента.

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; термостат.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 100 мл — 4 шт.; пипетки на 1 мл — 2 шт., на 5 мл — 1 шт., на 10 мл — 1 шт.; пробирки — 7 шт.

Материалы и реактивы: супернатант растительных тканей; 0,1 М NaOH-глициновый буфер, pH 9,0; *n*-нитрофенилфосфат- Na_2 ; *n*-нитрофенол; 0,02 М раствор NaOH; MgCl_2 ; 50 мкМ стандартный раствор *n*-нитрофенола.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы глицина и NaOH на pH-метре до pH 9,0. Раствор 0,02 М NaOH (0,8 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Субстратно-буферный раствор готовят, растворяя в 100 мл 0,1 М NaOH-глициновый буфер, pH 9,0, 9,5 мг MgCl_2 и 400 мг *n*-нитрофенилфосфата натрия. Светопоглощение раствора при 415 нм не должно быть больше 0,05 усл. ед.

Стандартный раствор *n*-нитрофенола готовят следующим образом. Вначале 69,5 мг *n*-нитрофенола вносят в мерную колбу на 100 мл и добавляют 0,02 М раствор NaOH до метки. Концентрация *n*-нитрофенола в полученном растворе будет равна 5 мМ. Затем из этой колбы отбирают 1 мл раствора *n*-нитрофенола и вносят в другую мерную колбу на 100 мл, объем которой тоже доводят до метки 0,02 М NaOH. При этом концентрация полученного раствора *n*-нитрофенола будет уже равна 50 мкМ. Этот раствор *n*-нитрофенола используют для построения калибровочного графика.

Калибровочный график. В 5 пробирок согласно таблице последовательно вносят по 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 5,0 мл

стандартного раствора *n*-нитрофенола и затем общий объем пробирок доводят до 10,0 мл 0,02 М раствором NaOH. После перемешивания измеряют светопоглощение проб на ФЭКе при 415–420 нм против раствора 0,02 М NaOH. Результаты измерений записывают в таблице 8.43.

Таблица 8.43

Данные к построению калибровочного графика
для определения активности щелочной фосфатазы

№ пробирок	Объем стандартного раствора, мл	Объем NaOH, мл	Концентрация <i>n</i> -нитрофенола		Светопогло- щение <i>D</i> , усл. ед.
			мкг/мл	нмоль/мл	
1	1,0	9,0	0,695	5,0	
2	2,0	8,0	1,390	10,0	
3	3,0	7,0	2,085	15,0	
4	4,0	6,0	2,780	20,0	
5	5,0	5,0	3,475	25,0	

Ход работы. В две пробирки (опыт и контроль) вносят по 1 мл *субстрат-буферного раствора*, прогревают в термостате в течение 5 мин при 37°C. В опытную пробирку добавляют 1,0 мл супернатанта. После перемешивания опытную и контрольную пробирки помещают в термостат на 60 мин (+ 37°C). Затем пробирки охлаждают под струей холодной воды и в каждую добавляют по 9,0 мл 0,02 М раствора NaOH. Растворы в пробирках перемешивают и в контрольную вносят 1,0 мл супернатанта и вновь перемешивают растворы в пробирках. Светопоглощение опытной пробы изучают на ФЭК при 415–420 нм, измерения проводят против контроля.

Метод расчета. Активность щелочной фосфатазы ($A_{\text{ЩФ}}$, нмоль/ч г массы) рассчитывают, используя следующую формулу:

$$A_{\text{ЩФ}} = \frac{C_{\text{к}} \cdot V_1 \cdot V_2}{dt \cdot V_3 \cdot P},$$

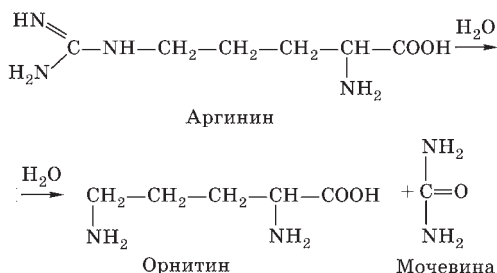
где $C_{\text{к}}$ — количество *n*-нитрофенола в пробе, определенное по калибровочному графику, нмоль/мл; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — общий объем в кювете, мл;

V_3 — объем пробы, вносимый в кювету, мл; dt — время реакции, мин; P — навеска растительной ткани, г.

Оформление работы. Построить калибровочный график и определить активность щелочной фосфатазы в исследуемом образце растительной ткани.

8.2.35. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ

Принцип метода. Аргиназа (КФ 3.5.3.1) катализирует реакцию расщепления аргинина с образованием орнитина и мочевины:

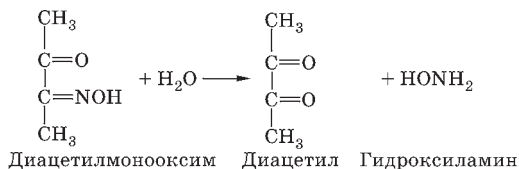


Фермент имеет молекулярную массу 140 кДа, состоит из четырех субъединиц (35 кДа). В состав активного центра аргиназы входят остатки гистидина. Остатки триптофана и тирозина расположены в гидрофобных участках макромолекулы, которые удалены от активного центра аргиназы. В области активного центра аргиназы печени крыс, который расположен в углублении на расстоянии 15 Å от поверхности молекулы, кроме остатков гистидина, имеются карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот. Изучение инактивации аргиназы печени быка при химической модификации карбоксильных групп фермента водорастворимым карбодиимидом показало, что около 20% активности сохраняется даже при использовании высоких концентраций реагента. Ингибирование носит неконкурентный характер и значительно более эффективно происходит в присутствии этилового эфира глицина. Кроме того, ингибиторами фермента являются орнитин и лизин, проявляющие конкурентный тип ингибирования. Активируется

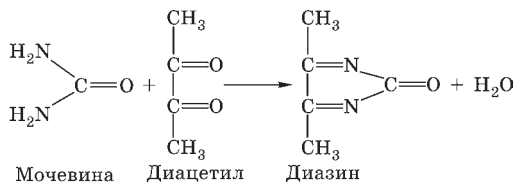
аргиназа ионами Mn^{2+} и Ca^{2+} . Максимум активности аргиназы приходится на pH 9,0–9,5.

Для определения мочевины используется диацетилмонооксим, с которым мочеви́на образует в сильнокислой среде в присутствии тиосемикарбазида и ионов трехвалентного железа комплекс, окрашивающий раствор в красный цвет.

Диацетилмонооксим не реагирует с мочевиной непосредственно, поэтому вначале он расщепляется до гидроксиламина и диацети́ла.



Последний в кислой среде вступает в реакцию конденсации с мочевиной с образованием окрашенного комплекса.



Стабильность комплекса зависит от содержания в растворе тиосемикарбазида. Величину светопоглощения комплекса регистрируют при 550 нм.

Наиболее высокая активность фермента выявляется в печени животных и человека, где аргиназа обнаруживается в ядрах, митохондриях и микросомах.

Оборудование: аналитические весы; центрифуга; спектрофотометр; водяная баня; термостат; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 6 шт., на 500 мл — 3 шт.; пипетки на 0,2 — 1 шт., на 1 мл — 1 шт., на 2 мл — 6 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: печень; 0,9%-ный раствор NaCl; 0,1 М NaOH-глициновый буфер, pH 9,5; 7 мМ раствор аргинина; 5%-ный раствор ТХУ; цветной реактив; 7 мМ раствор мочевины; концентрированная H_2SO_4 .

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы глицина и NaOH на pH-метре до pH 9,5.

0,05% -ный раствор FeCl_3 готовят, растворяя 50 мг хлорного железа в 94 мл д. в., который подкисляют 1 мл концентрированной H_2SO_4 .

0,9% -ный раствор NaCl, 2,5% -ный раствор диацетилмонооксима и 0,25% -ный раствор тиосемикарбозида готовят, растворяя соответствующие навески в д. в.

Цветной реактив: 30 мл 0,05% -ного раствора FeCl_3 , 1 мл 2,5% -ного раствора диацетилмонооксима, 0,5 мл 0,25% -ного раствора тиосемикарбозида и 20 мл д. в.

Раствор мочевины (0,42 мг/мл или 7 мкмоль/мл) и аргинина (1,22 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Приготовление супернатанта. Печень промывают при 0°C 0,9% -ным раствором NaCl, удаляют сосуды, соединительную и жировую ткань. После взвешивания печень нарезают на мелкие кусочки и гомогенизируют. К гомогенату добавляют 0,1 М глициновый буфер в соотношении 1:3 (на 1 г печени 3 мл буфера). После перемешивания до однородной массы гомогенат центрифугируют 15 мин при 7000g. Супернатант используют для определения активности аргиназы.

Ход работы. В две пробирки (опыт и контроль) последовательно вносят 1,4 мл 0,1 М NaOH-глициновый буфер и 0,2 мл 7 мМ раствора аргинина. После перемешивания растворов в контрольную пробирку добавляют 2 мл 5% -ного раствора ТХУ, а затем в обе пробирки по 0,4 мл супернатанта. После перемешивания растворов обе пробирки помещают на 15 мин в термостат при 37°C. По окончании инкубации в опытную пробирку добавляют 2 мл 5% -ного раствора ТХУ. Пробирки перемешивают и центрифугируют 15 мин при 7000g, а затем из каждой пробирки отбирают по 2 мл супернатанта и добавляют по 2 мл цветного реактива, содержащего диацетилмонооксим, семикарбозид и FeCl_3 . Пробы тщательно перемешиваются и помещаются на 15 мин в кипящую водяную баню. Затем пробы охлаждают и измеряют в течение 10–15 мин светопоглощение опытной ($D_{\text{оп}}$) и контрольной ($D_{\text{к}}$) проб на спектрофотометре при 550 нм против д. в. Из светопоглощения опытной пробы

вычитают поглощение контрольной пробы ($D_o = D_{\text{оп}} - D_{\text{к}}$) и полученную величину используют для нахождения содержания мочевины по отношению к стандартной пробе.

Стандартную пробу готовят перед фотометрией, смешивая 2 мл 7 мМ раствора мочевины и 2 мл цветного реактива. Смесь помещают на 15 мин в кипящую водяную баню и после охлаждения измеряют светопоглощение стандарта ($D_{\text{ст}}$) при 550 нм против д. в.

Метод расчета. Активность аргиназы (мкмоль/мин · г влажной массы) рассчитывают по формуле

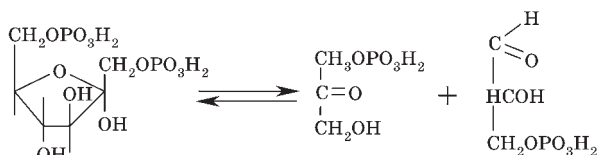
$$A = \frac{D_o \cdot C_{\text{ст}} \cdot V_1 \cdot V_3}{D_{\text{ст}} \cdot t \cdot P \cdot V_2},$$

где D_o — светопоглощение опытной пробы, усл. ед.; $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение стандартной пробы, усл. ед.; $C_{\text{ст}}$ — концентрация мочевины в стандартной пробе, мкмоль/мл; V_1 — объем гомогената ткани, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в пробирку, мл; V_3 — конечный объем пробы в пробирке, мл; t — время проведения реакции, мин; P — навеска ткани, г.

Оформление работы. Определить активность аргиназы в исследуемой ткани, раскрыть роль фермента в образовании мочевины.

8.2.36. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТАЛЬДОЛАЗЫ

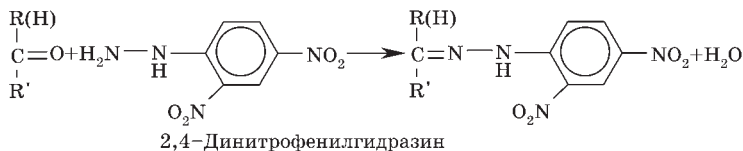
Принцип метода. Фруктозо-1,6-дифосфатальдолоза (КФ 4.1.2.13) катализирует реакцию расщепления фруктоз-1,6-дифосфата на глицеральдегид-3-фосфат и диоксиацетонфосфат.



Фруктоз-1,6-дифосфат Диоксиацетонфосфат Глицеральдегид-3-фосфат

Продукты ферментативной реакции образуют с 2,4-динитрофенилгидразином гидразон, имеющий в щелочной

среде коричневое окрашивание, имеющее максимальное поглощение при 530–540 нм.



Реакция обратима и зависит от температуры. При повышении температуры реакция сдвигается в сторону образования триозофосфатов. Фермент присутствует в мышцах, печени и мозге животных. Много его содержится в эритроцитах.

При проведении реакции добавляется гидразин, чтобы ингибировать активность триозофосфатизомеразы, катализирующей превращение глицеральдегид-3-фосфата в диоксиацетонфосфат.

Оборудование: ФЭК; центрифуга; аналитические весы; водяная баня; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 2 шт., на 500 мл — 3 шт.; пипетки на 0,1 мл — 4 шт., на 1 мл — 5 шт., на 5 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: мышечная ткань; 0,02 М раствор фруктозо-1,6-дифосфата; 5 мМ раствор динитрофенилгидразина; 2 М раствор HCl; 0,56 М раствор гидразинсульфата; 1 мМ раствор 3-фосфоглицеринового альдегида; 10% -ный раствор ТХУ; 3% -ный раствор NaOH; 0,1 М *трис*-HCl буфер, pH 7,4.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы *триса* и HCl на pH-метре до pH 7,4.

Раствор динитрофенилгидразина (1 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 2 М растворе HCl на водяной бане.

Раствор натриевой соли фруктозо-1,6-дифосфата (8,122 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Раствор гидразинсульфата (72,9 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Растворы ТХУ и NaOH готовят, растворяя навески в д. в.

Раствор 3-фосфоглицеринового альдегида (0,17 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Ход работы. В две центрифужные пробирки последовательно вносили растворы, как показано в таблице 8.44.

Таблица 8.44

Реактивы и порядок их внесения в пробирки при определении активности фруктозо-1,6-дифосфатальдолазы

Реактивы	Пробирки	
	проба	контроль
Супернатант	0,1	0,1
Буфер 0,1 М <i>трис</i> -HCl, pH 7,4	0,3	0,3
Гидразинсульфат	0,05	0,05
Фруктозо-1,6-дифосфат	0,05	—
Дистиллированная вода	—	0,05

После перемешивания растворов пробирки помещаем на 60 мин в термостат при 37°C. После инкубации в пробирки добавляем по 0,5 мл 10% -ного раствора ТХУ. При этом должен образоваться осадок из белков, для полного осаждения которых пробирки центрифугируем 15 мин при 7000g. Надосадочную жидкость переносят в новые пробирки, куда добавляют по 1,0 мл 3% -ного раствора NaOH. Пробирки выдерживают при комнатной температуре 10 мин и затем в каждую добавляют по 1,0 мл 5 мМ раствора динитрофенилгидразина. Пробирки помещают на 10 мин в термостат при 37°C. Затем добавляют в пробирки по 4,0 мл 3% -ного раствора NaOH и после перемешивания растворов измеряют светопоглощение пробы при 530–540 нм против контроля.

Стандартную пробу готовят путем добавления в пробирку 0,1 мл 1 мМ раствора 3-фосфоглицеринового альдегида, 0,1 мл супернатанта, 0,3 мл 0,1 М *трис*-HCl буфера и 0,5 мл 10% -ного раствора ТХУ. Далее стандартную пробу обрабатывают как опытную. Измерения стандартной пробы производят против контроля, куда вместо раствора 3-фосфоглицеринового альдегида добавляют д. в. В стандартной пробе содержится 0,1 мкмоль 3-фосфоглицеринового альдегида.

Метод расчета. Активность фруктозо-1,6-дифосфатальдолазы в супернатанте тканей (мкмоль/ч · г массы) рассчитывают по следующей формуле:

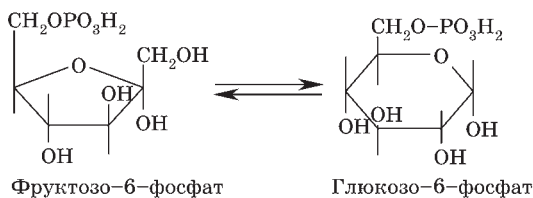
$$A = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}} \cdot V_1 \cdot V_3}{D_{\text{ст}} \cdot P \cdot V_3 \cdot dt},$$

где $D_{\text{оп}}$ — величина светопоглощения опытной пробы, усл. ед.; $D_{\text{ст}}$ — величина светопоглощения стандартной пробы, усл. ед.; $C_{\text{ст}}$ — концентрация 3-фосфоглицеринового альдегида в стандартной пробе, мкмоль; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в пробирку, мл; V_3 — конечный объем пробы в пробирке, мл; dt — время реакции, ч.

Оформление работы. Определить активность фермента в исследуемой ткани. Раскрыть роль фермента в метаболизме клеток.

8.2.37. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗОФОСФАТИЗОМЕРАЗЫ С ПОМОЩЬЮ Г6ФДГ

Принцип метода. Глюкозофосфатизомераза (ГФИ, КФ 5.3.1.9) катализирует обратимо реакцию превращения фруктозо-6-фосфат в глюкозо-6-фосфат.



Фермент состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых имеет молекулярную массу, равную 62 кДа. Фермент высоко специфичен по отношению субстратов. Оптимум активности глюкозофосфатизомеразы приходится на pH 8,0–8,5. Конкурентными ингибиторами фермента являются 6-фосфоглюконат, эритрозо-4-фосфат, рибозо-5-фосфат.

Для определения активности глюкозофосфатизомеразы используется сопряженная система, содержащая два фермента (глюкозофосфатизомераза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) и НАДФ. При этом в системе должен быть избыток Г6ФДГ, которая катализирует реакцию

окисления глюкозо-6-фосфата и восстановления НАДФ до НАДФН. Последний имеет максимум поглощения при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы; центрифуга; штатив.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт.; пипетки на 0,1 мл — 5 шт., на 5 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: мышечная ткань; 0,1 М *трис*-HCl буфер, pH 8,3, содержащий 55 мМ триэтанолламин и 3 мМ ЭДТА; 0,12 М раствор фруктозо-6-фосфат; 0,3 М раствор MgCl_2 ; 15 мМ раствор НАДФ; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 1 ед./мл.

Приготовление растворов. Раствор буфера готовят, смешивая 0,1 М растворы *триса* и HCl на pH-метре до pH 8,3, затем добавляют навески триэтаноламина (8,2 мг/мл) и ЭДТА (0,877 мг/мл). Раствор фруктозо-6-фосфата (31,2 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,5 М *трис*-HCl буфере, pH 8,3. Растворы MgCl_2 (28,6 мг/мл) и НАДФ (11,15 мг/мл) готовят, растворяя навески в б. в.

Приготовление супернатанта. 0,5 г скелетной мышцы кролика измельчают и гомогенизируют в двойном объеме 0,1 М *трис*-HCl буфера, pH 8,3, содержащего 10 мМ триэтанолламин и 1 мМ ЭДТА. После этого гомогенат центрифугируют 15 мин при 15 000g. Полученный супернатант используют при определении активности глюкозофосфатизомеразы.

Ход работы. В кювету последовательно вносят 0,1 мл 0,12 М фруктозо-6-фосфата, 0,1 мл 15 мМ НАДФ, 0,1 мл 0,3 М MgCl_2 , 2,5 мл 0,1 М *трис*-HCl буфера (pH 8,3) и 0,1 мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. После перемешивания смесь выдерживаем 5 мин при 25°C, а затем добавляем 0,1 мл супернатанта. Регистрируем изменение светопоглощения раствора при 340 нм в течение 1–2 мин. Результаты наблюдений записывают в таблицу 8.45.

Метод расчета. Активность фермента (мкмоль/мин · г массы) в супернатанте ткани определяют по формуле

$$A_{\text{ГФН}} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_3}{6,22 \cdot l \cdot P \cdot V_2 \cdot dt},$$

где dD — величина светопоглощения, усл. ед.; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; dt — время реакции, мин.

Таблица 8.45

Величины поглощения НАДФН от времени протекания реакции дегидрирования глюкозо-6-фосфата в присутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, образуемого в реакции внутримолекулярного превращения фруктозо-6-фосфата в глюкозо-6-фосфат

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 фермента в метаболизме клеток растений и животных.

8.3. МЕТОДЫ ОЧИСТКИ ФЕРМЕНТОВ

8.3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕКСОКИНАЗЫ ИЗ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ

Принцип метода. Гексокиназу выделяют из пекарских дрожжей, которые предварительно сушат и измельчают в порошок. Экстракцию фермента производят в растворе, содержащем ЭДТА. Фермент из раствора осаждают сульфатом аммония, а затем после диализа и ультрафильтрации наносят на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. С колонки фермент снимают линейным градиентом соли (KCl или NaCl). Для разделения двух изоферментов гексокиназы используют рН-градиентную элюцию. Препарат гексокиназы после лиофилизации хранят при -20°C .

Оборудование: центрифуга; термостат; рН-метр; весы аналитические; спектрофотометр с проточной кюветой или

Uvicord (ЛКВ, Швеция); коллектор фракций; лиофильная сушка; прибор для ультрафильтрации белков.

Посуда: колбы на 500 мл — 11 шт.; пипетка на 5 мл; хроматографические колонки (3×25 см), (1,4×15 см) и (1,2×27 см); стаканы на 500 мл.

Материалы и реактивы: пекарские дрожжи; диализный мешочек; фильтровальная бумага; 0,1 М К-фосфатный буфер, pH 7,0; 0,02 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0; *D*-глюкоза; ЭДТА; 0,2 М Na_2HPO_4 ; ледяная уксусная кислота ($\rho = 1,050 \text{ г/см}^3$, 1049 мг/мл); 3 М раствор CH_3COOH ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; ДЭАЭ-целлюлоза; КМ-целлюлоза; 1 mM раствор ЭДТА; 0,3 М раствор KCl; 0,4 М раствор NaCl.

Приготовление растворов. Фосфатный буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов K_2HPO_4 и KH_2PO_4 путем их смешивания на pH-метре до pH 7,0, с добавлением в раствор *D*-глюкозы (5 мг/мл) и ЭДТА (0,37 мг/мл).

Ацетатный буферный раствор готовится из исходных 0,02 М растворов CH_3COOH и CH_3COONa путем их смешивания на pH-метре до pH 5,0, с добавлением в раствор *D*-глюкозы (5 мг/мл) и ЭДТА (0,37 мг/мл).

1 mM раствор ЭДТА (0,293 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Раствор KCl (22,4 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,1 М К-фосфатный буфер, pH 7,0.

Раствор NaCl (23,4 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 0,02 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0.

Раствор CH_3COOH готовят, растворяя 17,2 мл 17,47 М уксусной кислоты в 82,8 мл д. в.

Раствор Na_2HPO_4 (28,4 мг/мл) готовят, растворяя навеску в 1 mM растворе ЭДТА.

Подготовка ионообменников к работе. Навеску порошка сорбента (ДЭАЭ-целлюлоза или КМ-целлюлоза) суспендируют в 50-кратном объеме д. в., перемешивают и оставляют набухать при 25°C 15–18 ч. После этого слой жидкости над ионообменником декантируют, снова заливают д. в., перемешивают и через 2,0–2,5 ч верхний слой жидкости декантируют вместе с неосевшими мелкими частицами. К осадку приливают 50-кратный объем 0,5 М раствора NaOH, тщательно перемешивают и через час ионит фильтруют через

воронку Бухнера. Осадок на воронке промывают д. в. до pH 7,0. Затем ионит перемешивают в 50-кратном объеме 0,5 М растворе HCl и через 30–60 мин отмывают д. в. до pH 5,0.

ДЭАЭ-целлюлозу повторно обрабатывают 50-кратным объемом 0,5 М раствора NaOH, переводя ионит в OH⁻-форму, перемешивают и через час отмывают д. в. до pH воды.

КМ-целлюлозу так же повторно обрабатывают 50-кратным объемом 0,5 М раствора HCl и через 30–60 мин отмывают д. в. до pH воды, переводя ионит в H⁺-форму.

Подготовка и заполнение колонки. Колонку заполняют суспензией ионита в элюирующем буферном растворе. Заполнение колонки можно проводить и суспензией ионита в д. в., и лишь после уплотнения слоя сорбента уравнивать колонку элюирующим буферным раствором. Над верхним слоем сорбента всегда должен оставаться слой жидкости не менее 1,5–2,0 см.

Экстракция и фракционирование сульфатом аммония гексокиназы. 1 кг пекарских дрожжей высушивают на фильтровальной бумаге при комнатной температуре до массы в 200 г. Затем дрожжи измельчают в ступке и 100 г порошка растворяют в 400 мл 0,2 М раствора Na₂HPO₄, содержащего 1 мМ ЭДТА. Смесь инкубируют в термостате при 37°C в течение 3 ч, а затем центрифугируют 30 мин при 5000g и 0°C.

Супернатант помещают в ледяную баню и небольшими порциями добавляют 3 М раствор CH₃COOH до pH 4,5. Раствор оставляют на 15–18 ч при 4°C и после этого центрифугируют 20 мин при 10 000g.

В супернатант добавляют сульфат аммония до насыщения 0,39 (24 г соли на 10 мл супернатанта). Через час раствор центрифугируют 20 мин при 10 000g, осадок отбрасывают. В супернатант добавляют сульфат аммония до насыщения 0,55 (10 г соли на 100 мл супернатанта). Раствор центрифугируют 30 мин при 15 000g. Осадок растворяют в 20 мл 0,1 М К-фосфатного буфера, pH 7,0. Затем раствор ставят на диализ против 1 л того же буфера. Во время диализа буфер меняют 2–3 раза. Осадок, выпавший во время диализа, удаляют.

Хроматография фермента на ДЭАЭ-целлюлозе. Раствор белка наносится вначале на колонку (3×25 см) с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию проводят в линейном градиенте 0,1 М К-фосфатного буфера, рН 7,0, содержащего 0–0,3 М раствор КСl. Скорость элюции — 90 мл/ч. Собирают фракции по 9 мл, определяют в них содержание белка и активность фермента. Фракции, в которых обнаружена активность гексокиназы, объединяют и проводят повторную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе. Для этого подготавливают хроматографическую колонку размером 1,4×15 см. Белок снова элюируют в линейном градиенте 0,1 М К-фосфатного буфера, рН 7,0, содержащего 0–0,3 М раствор КСl. Скорость элюции — 35 мл/ч. Собирают фракции по 4 мл, определяют в них содержание белка и активность гексокиназы. Фракции с наибольшей активностью фермента объединяют и лиофилизируют. Полученный препарат содержит два изофермента дрожжевой гексокиназы, и для их разделения необходимо провести хроматографию препарата на КМ-целлюлозе и повторно — на ДЭАЭ-целлюлозе.

Хроматография фермента на КМ-целлюлозе. Фракции белка, содержащие гексокиназу, концентрируют с помощью ультрафильтрации, а затем диализуют против 0,02 М Na-ацетатного буфера, рН 5,0.

Раствор белка наносят на колонку (1,4×15 см) с КМ-целлюлозой. Элюцию проводят в линейном градиенте 0,02 М Na-ацетатного буфера, рН 5,0, содержащего 0–0,4 М раствор NaCl. Скорость элюции — 20 мл/ч. Собирают фракции по 4 мл. Элюат концентрируют с помощью ультрафильтрации, а затем диализуют против 0,02 М Na-ацетатного буфера, рН 5,0.

Хроматография фермента на ДЭАЭ-целлюлозе; рН-градиентная элюция. На колонку размером 1,2×27 см, заполненную ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную 0,1 М К-фосфатным буфером, рН 7,0, наносят раствор фермента (10 мг). Элюцию проводят в градиенте рН, используя 150 мл 0,1 М К-фосфатный буфер, рН 7,0, в смешивающем сосуде и 150 мл 0,02 М Na-ацетатного буфера, рН 5,0, во втором сосуде. Скорость элюции — 20 мл/ч. Собирают фракции

по 4 мл. В процессе хроматографии pH изменяется от 7,0 до 5,0. Первым выходит изозим I, а вслед за ним — изозим II.

Оформление работы. Записать методику очистки гексокиназы, определить выход фермента и степень его чистоты.

8.3.2. МЕТОД ОЧИСТКИ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ КОРНЕЙ ХРЕНА

Принцип метода. Очищенные препараты ферментов используются при исследовании их физико-химических свойств, определении величин каталитических констант, изучении активных центров. Очистку фермента начинают с экстракции его из разрушенных клеток растительных тканей и выделения фермента в раствор. Для этого используют механическую мельницу. Все операции лучше проводить при 0°C. Полученный гомогенат центрифугируют с целью удаления неразрушенных клеток и ядер. Присутствующий в супернатанте фермент осаждают сульфатом аммония, который способен при достижении 80%-ной концентрации осадить практически весь белок. Растворимость сульфата аммония мало изменяется при температуре 0–30°C, а концентрация насыщения в воде равна 4 М. Перед осаждением белков сульфатом аммония необходимо добавить ЭДТА. Растворимость сульфата аммония при 20°C составляет 533 мг/мл, а для получения насыщенного раствора требуется 761 мг/мл. После осаждения избыток соли удаляют диализом и затем фермент наносят на колонку с ионообменником. Белки связываются с ионообменником в основном с помощью электростатических сил между заряженными поверхностями белков и плотными кластерами заряженных групп ионообменника. При проведении ионообменной хроматографии используют буфер, минимальная концентрация которого составляет 5 мМ при значении pH, отличающегося не более чем на 0,3 единицы от величины его pK_a . Концентрация адсорбируемого белка не должна превышать 5 мг/мл. Для очистки белков используют в основном два типа ионообменников: карбоксиметилцеллюлоза (катионообменник) и диэтиламиноэтилцеллюлоза (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 $\text{pH} < 9,0$, а КМ-целлюлоза — при $\text{pH} > 3,5$. При работе с ДЭАЭ-целлюлозой ($\text{pH} 7,0\text{--}8,0$) лучше использовать *трис*-HCl буфер, а для КМ-целлюлозы ($\text{pH} 5,0\text{--}6,5$) — ацетатный или фосфатный буфер.

Оборудование: центрифуга; спектрофотометр с проточной кюветой или Uvicord (ЛКВ, Швеция); хроматографические колонки (2×30 см); лиофильная сушка; прибор для ультрафильтрации белков.

Посуда: колбы на 500 мл — 6 шт.; колонки хроматографические (2×30 см) — 2 шт.; стаканы на 500 мл — 2 шт.

Материалы и реактивы: корни хрена, диализный мешочек; сульфат аммония; 0,005 М *трис*-HCl буфер, $\text{pH} 7,5$; 0,005 М и 1,5 М Na-ацетатный буфер, $\text{pH} 5,0$; ДЭАЭ-целлюлоза и КМ-целлюлоза.

Приготовление растворов. Раствор *трис*-HCl буфера готовят, смешивая 0,005 М растворы триса и HCl на pH -метре до $\text{pH} 7,5$; раствор Na-ацетатного буфера готовят, смешивая 0,005 М растворы CH_3COONa и CH_3COOH на pH -метре до $\text{pH} 5,0$.

Ход работы. 100 г корней хрена промывают водой и после измельчения гомогенизируют, проводя экстракцию фермента, добавляя 100 мл д. в. Гомогенат центрифугируют 15 мин при 7000g. 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 течение 30 мин до полного растворения. Раствор оставляют при $+4^\circ\text{C}$ на 2 ч. Выпавший осадок отделяют центрифугированием (15 мин при 7000g). Осадок растворяют в минимальном количестве воды и диализуют против нее. Определяют концентрацию белка и активность пероксидазы. Затем образец наносят на колонку (2×30 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную 0,005 М *трис*-HCl буфером, $\text{pH} 7,5$. После прохождения самотеком коричневого кольца (цвет пероксидазы) его наносят на колонку того же объема с КМ-целлюлозой, уравновешенную 0,005 М Na-ацетатного буфера, $\text{pH} 5,0$. Пероксидазу элюируют в линейном градиенте, создаваемым Na-ацетатным буфером

0,005–1,5 М, рН 5,0. Объем смесителя 200 мл, скорость элюции 50 мл/ч. После выхода фермента из колонки с КМ-целлюлозой его диализуют против воды. Светопоглощение элюируемых растворов измеряют при 280 нм с помощью прибора Uvicord (ЛКВ, Швеция) или на спектрофотометре при 403 нм, оборудованном проточной кюветой. Фракции с наибольшей активностью пероксидазы и *RZ* лиофилизируют ($RZ = D_{403}/D_{280}$). Концентрацию белка определяют по Бредфорду или Лоури.

Метод расчета. Результаты исследований записывают в таблицу 8.46.

Т а б л и ц а 8.46

Результаты очистки полученных препаратов
алкогольдегидрогеназы зерновок пшеницы

Стадии очистки	Общий белок, мг	Активность пероксидазы		Выход, %		Степень очистки
		общая <i>E</i> , мкмоль/мин	удельная <i>E</i> /мг	по белку	по активности	
Гомогенат				100	100	1
Супернатант						
После осаждения сульфатом аммония						
Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой						
Хроматография на колонке с КМ-целлюлозой						

Заполнение таблицы проводят по следующим формулам:

$$\text{общий белок (мг)} = C_{\text{белка}} (\text{мг/мл}) \cdot V (\text{мл});$$

$$\text{общая активность } E (\text{мкмоль/мин}) = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_2}{30 \cdot l \cdot V_3 \cdot dt};$$

$$\text{удельная активность (Е/мг)} = E / \text{общий белок},$$

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.

Оформление работы. Заполнить таблицу, определить выход фермента и степень его чистоты.

8.3.3. ПОЛУЧЕНИЕ ОЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Принцип метода. Для определения этанола и НАД в растительных тканях используется алкогольдегидрогеназа. Фермент катализирует обратимо реакцию окисления этанола в присутствии НАД. Однако в аналитических целях может быть использован только очищенный препарат фермента, который получают с помощью гель-хроматографии — способа разделения веществ на основе разницы в их молекулярной массе (размера частиц). В качестве носителей в гель-хроматографии используются сефадексы (G-10, G-15, G-25, G-50, G-75, G-100, G-150, G-200), основой которых является полисахарид декстран, сшитый поперечными связями, формирующими трехмерную сетчатую структуру с высокой степенью гидрофильности за счет большого количества на их поверхности полярных гидроксильных групп. Сефадекс нерастворим в воде и стабилен в кислотных, щелочных и солевых растворах. После погружения в воду сефадекс набухает, приобретая способность фракционировать различные молекулы, в зависимости от их размера. Крупные частицы, имеющие более высокую молекулярную массу, двигаются значительно быстрее частиц меньших размеров, которые задерживаются внутри гранул сефадекса.

Таким образом достигается разделение (фракционирование) молекул, которое используется для:

- а) обессоливания растворов;
- б) отделения мелких по размеру и молекулярной массе молекул от крупных.

Гель фильтрация используется для очистки ферментов от субстратов и кофакторов или белков от аминокислот и пептидов и т. д.

Оборудование: спектрофотометр с проточной кюветой или Uvicord (LKB, Швеция); хроматографическая колонка (1×30 см); коллектор фракций; механическая мельница, лиофильная сушка.

Посуда: стакан; пипетка на 5 мл; пробирки для сбора фракций элюции — 50 шт.

Материалы и реактивы: зерновки пшеницы; 0,05 М раствор глицина; 96%-ный этанол; сефадекс G-25 fine.

Приготовление рабочих растворов. Раствор глицина готовится путем растворения 1,875 г глицина в 500 мл дистиллированной воды.

Хроматографическая колонка наполняется сефадексом G-25 fine, который предварительно набухал в течение 24 ч при комнатной температуре в дистиллированной воде. Перед употреблением колонка промывается 0,05 М раствором глицина.

Построение калибровочного графика. В работе используют калибровочный график, построенный для определения белка (по Лоури).

Ход работы. Зерновки пшеницы гомогенизируют на механической мельнице до получения порошкообразной массы с размером частиц 1 мм. Затем добавляют 0,05 М раствор глицина в соотношении 1:3 (на 1 г зерновок 3 мл раствора). Для удаления не полностью разрушенных клеток и ядер гомогенат центрифугируют 15 мин при 7000g. В супернатант добавляют этанол до 70% концентрации, интенсивно встряхивают в течение 5 мин, смесь центрифугируют. Осадок после растворения в небольшом количестве 0,05 М раствора глицина наносят на колонку (1×30 см) с сефадексом G-25 fine, уравновешенную 0,05 М раствором глицина, элюирование проводят этим же раствором. Светопоглощение элюируемых растворов измеряют при 280 нм с помощью прибора Uvicord (LKB, Швеция) или на спектрофотометре,

оборудованном проточной кюветой. Фракции с наибольшей активностью и малым фоном лиофилизируют. Образец содержит 90–95% алкогольдегидрогеназы от общего содержания белка. Концентрацию белка определяют по биуретовой реакции или методу Лоури, а активность фермента, как описано выше.

Метод расчета. Результаты исследований записывают в таблицу 8.47.

Таблица 8.47

Результаты очистки полученных препаратов алкогольдегидрогеназы зерновок пшеницы

Стадии очистки	Общий белок, мг	Активность АДГ		Выход, %		Степень очистки
		общая E , мкмоль/мин	удельная E /мг	по белку	по активности	
Исходный препарат				100	100	1
После осаждения этанолом						
Хроматография на колонке с сефадексом G-25 fine						

Заполнение таблицы проводят по следующим формулам:

$$\text{общий белок (мг)} = C_{\text{белка}} (\text{мг/мл}) \cdot V (\text{мл});$$

$$\text{общая активность } E (\text{мкмоль/мин}) = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_2}{6,22 \cdot l \cdot V_3 \cdot dt};$$

$$\text{удельная активность (Е/мг)} = E / \text{общий белок},$$

где $C_{\text{белка}}$ — концентрация белка в элюате (мг/мл); V — объем пробы (мл); dD — светопоглощение (усл. ед.); V_1 — общий объем элюата, мл; V_2 — общий объем пробы в пробирке, мл; V_3 — объем экстракта, вносимого в пробирку, мл; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; 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.

Оформление работы. Заполнить таблицу, определить выход фермента и степень его чистоты.

8.3.4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Принцип метода. Лактатдегидрогеназу выделяют из скелетных мышц путем их гомогенизирования и многократного осаждения белков с помощью сульфата аммония. Фермент хранят при $+4^{\circ}\text{C}$ в полунасыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Оборудование: гомогенизатор; аналитические весы; рН-метр; центрифуга; водяная баня; холодная комната.

Посуда: колбы на 1 л — 3 шт.; стаканы на 100, 500 и 1000 мл; пипетки; пробирки.

Материалы и реактивы: мышечная ткань; аммиак; 1 мМ раствор ЭДТА, содержащий 0,2 мМ дитиотреитол (ДТТ); 0,03 М КОН, содержащий 1 мМ ЭДТА и 0,2 мМ ДТТ; кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; насыщенный раствор сульфата аммония.

Приготовление растворов. Раствор КОН (1,68 мг/мл) готовят, растворяя навеску в растворе с ЭДТА (0,29 мг/мл) и ДТТ (0,03 мг/мл).

Сульфат аммония перекристаллизовывают в присутствии ЭДТА (1,5 мг/мл).

Насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (761 мг/мл) готовят, растворяя навеску в б. в., доводят аммиаком до рН 7,5.

Раствор ЭДТА (0,29 мг/мл), содержащий ДТТ (0,03 мг/мл), готовят, растворяя соответствующие навески в б. в.

Ход работы. К 200 г измельченной и гомогенизированной мышечной массы при 0°C добавляют 200 мл 0,03 М раствора КОН, содержащего 1 мМ ЭДТА и 0,2 мМ ДТТ. После перемешивания экстракцию проводят в течение 10 мин, а затем центрифугируют 20 мин при 10 000g. Осадок повторно экстрагируют половинным объемом щелочи в течение 5 мин и вновь центрифугируют. Супернатанты объединяют и добавляют небольшими порциями насыщенный

раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения 0,52 (104 мл на 100 мл супернатанта). Через 30–40 мин после добавления последней порции раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ смесь центрифугируют 15 мин 7000g.

Осадок отбрасывают, а к супернатанту добавляют кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения 0,72 (13 г соли на 100 мл супернатанта). Через 30 мин смесь центрифугируют 30 мин при 3000g.

Осадок растворяют в б. в. При этом конечная концентрация белка в растворе должна быть равна 20–25 мг/мл. К этому раствору добавляют насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения 0,55 (122 мл соли на 100 мл супернатанта). После перемешивания смесь центрифугируют 30 мин при 3000g.

Осадок растворяют в б. в. Раствор белка помещают на 3 мин в водяную баню с температурой 58°C, а затем раствор охлаждают при 0°C. Осадок удаляют центрифугированием 20 мин при 10 000g.

К супернатанту добавляют насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до появления мути и оставляют при 0°C на 15–18 ч. После этого смесь центрифугируют 20 мин при 12 000g.

Осадок растворяют в 1 мМ растворе ЭДТА, содержащем 0,2 мМ ДТТ. Нерастворившийся осадок отбрасывают, к раствору добавляют $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения 0,55. Раствор хранят несколько дней при +4°C, а затем центрифугируют.

К осадку добавляют полунасыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и хранят при +4°C.

Оформление работы. Записать методику очистки лактатдегидрогеназы, определить выход фермента и степень его чистоты.

8.3.5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Принцип метода. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу выделяют из скелетных мышц путем их гомогенизирования и многократного осаждения белков с помощью сульфата аммония. Фермент хранят при 0°C в полунасыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Оборудование: гомогенизатор; аналитические весы; рН-метр; центрифуга; водяная баня; холодная комната.

Посуда: колбы на 1 л — 2 шт.; стаканы на 100, 500 и 1000 мл; пипетки; пробирки.

Материалы и реактивы: скелетная мышечная ткань; диализный мешочек; 50 мМ раствор ЭДТА, содержащий 0,2 мМ дитиотреитол (ДТТ), рН 8,4; 5 мМ раствор ЭДТА, содержащий 0,2 мМ ДТТ, рН 7,6; кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Приготовление растворов. Сульфат аммония перекристаллизовывают в присутствии ЭДТА (1,5 мг/мл).

Раствор ЭДТА (14,61 мг/мл), содержащий ДТТ (0,03 мг/мл), готовят, растворяя соответствующие навески в б. в., доводят аммиаком до рН 8,4.

Раствор ЭДТА (1,46 мг/мл), содержащий ДТТ (0,03 мг/мл), готовят, растворяя соответствующие навески в б. в., доводят аммиаком до рН 7,6.

Ход работы. К 100 г измельченной и гомогенизированной мышечной массы при 0°C добавляют 100 мл 50 мМ раствор ЭДТА, содержащий 0,2 мМ ДТТ, рН 8,4. После перемешивания экстракцию проводят в течение 20 мин, а затем центрифугируют 20 мин при 1000g. Осадок повторно экстрагируют половинным объемом раствора ЭДТА в течение 5 мин и вновь центрифугируют. Супернатанты объединяют и измеряют рН, который должен быть равен 7,1. рН раствора поддерживается путем добавления аммиака.

Затем к супернатанту добавляют кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ из расчета 300 мг/мл. Через 60 мин, после добавления последней порции $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, смесь центрифугируют 20 мин 20 000g.

Осадок отбрасывают, а к супернатанту добавляют кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ из расчета 117 мг/мл. Через 60 мин смесь центрифугируют 30 мин при 20 000g.

К супернатанту добавляют сульфат аммония (13 мг/мл); оставляют на 15–18 ч при 0°C. В ходе фракционирования рН раствора поддерживается в пределах 7,3–7,6 путем добавления аммиака. Если на последней стадии осадок не образуется, добавляют еще кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (13 мг/мл). Затем смесь центрифугируют 30 мин при 20 000g.

Осадок растворяют в минимальном объеме 5 мМ раствора ЭДТА, содержащего 0,2 мМ ДТТ, pH 7,6. Раствор белка подвергают диализу против смеси того же состава, после чего к смеси добавляют кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,39 г/мл). При этом должен образоваться гелеобразный осадок, который через 60 мин отделяют центрифугированием 30 мин при 20 000g.

Осадок вновь растворяют в минимальном объеме 5 мМ раствора ЭДТА, содержащего 0,2 мМ ДТТ, pH 7,6, а затем диализуют против смеси того же состава, после чего к раствору добавляют кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,20 г/мл). Через 60 мин отделяют осадок центрифугированием 30 мин при 20 000g.

К супернатанту добавляют $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,15 г/мл). Через 60 мин отделяют гелеобразный осадок фермента центрифугированием 30 мин при 20 000g. В ходе повторного фракционирования постепенно исчезает красный цвет белковых фракций. Полученный препарат фермента хранят в виде суспензии в полунасыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в присутствии 20 мМ дитиотреитола при 0°C.

Оформление работы. Записать методику очистки глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, определить выход фермента и степень его чистоты.

8.3.6. МЕТОД ОЧИСТКИ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Принцип метода. Очистку фермента начинают с экстракции его из разрушенных клеток растительных тканей и выделения фермента в раствор. Для этого используют механическую мельницу. Все операции проводят при 0°C. Полученный гомогенат центрифугируют с целью удаления неразрушенных клеток и ядер. Присутствующий в супернатанте фермент осаждают сульфатом аммония, который способен при достижении 70%-ной концентрации осадить практически весь фермент. Осадок растворяют в буфере и для освобождения от низкомолекулярных примесей пропускают через колонку с сефадексом G-25 fine. Обессоленный раствор фермента наносится вначале на колонку

с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию проводят, используя ступенчатый градиент 0–0,3 М раствора KCl в элюирующем буфере. Фракции с наибольшей активностью фермента объединяют и лиофилизируют.

Оборудование: аналитические весы; спектрофотометр с проточной кюветой или Uvicord (ЛКВ, Швеция); коллектор фракций; механическая мельница; лиофильная сушка.

Посуда: стакан, пипетка на 5 мл, пробирки для сбора фракций элюции — 50 шт., хроматографические колонки (1,5×30 см) и (1,5×15 см).

Материалы и реактивы: зерновки пшеницы; 50 мМ *трис*-HCl буфер, pH 7,8, содержащий 1 мМ ЭДТА и 1%-ный 2-меркаптоэтанол; 10 мМ *трис*-HCl буфер, pH 7,8, содержащий 0,5 мМ ЭДТА и 1%-ный 2-меркаптоэтанол; 10 мМ *трис*-HCl буфер, pH 7,8, содержащий 0,5 мМ ЭДТА, 1%-ный 2-меркаптоэтанол и 0,2 М KCl; сульфат аммония; сефадекс G-25 fine; ДЭАЭ-целлюлоза.

Приготовление рабочих растворов. Раствор *трис*-HCl буфера готовят, смешивая 0,05 М растворы триса и HCl на pH-метре до pH 7,8, в который добавляют ЭДТА (0,292 мг/мл) и 2-меркаптоэтанол (10 мг/мл);

Раствор *трис*-HCl буфера готовят, смешивая 0,01 М растворы триса и HCl на pH-метре до pH 7,8, в который добавляют ЭДТА (0,146 мг/мл) и 2-меркаптоэтанол (10 мг/мл).

Раствор *трис*-HCl буфера готовят, смешивая 0,01 М растворы триса и HCl на pH-метре до pH 7,8, в который добавляют ЭДТА (0,146 мг/мл) и 2-меркаптоэтанол (10 мг/мл) и KCl (14,91 мг/мл).

Подготовка хроматографических колонок к работе. Хроматографическая колонка (1,5×20 см) наполняется сефадексом G-25 fine, который предварительно набухал в течение 24 ч при комнатной температуре в дистиллированной воде. Перед употреблением колонка промывается 10 мМ *трис*-HCl буфером, pH 7,8, содержащим 0,5 мМ ЭДТА и 1%-ный 2-меркаптоэтанол.

Навеску с ДЭАЭ-целлюлозой суспендируют в 50-кратном объеме д. в., перемешивают и оставляют набухать при 25°C 15–18 ч. После этого слой жидкости над ионообменником декантируют, снова заливают д. в., перемешивают

и через 2,0–2,5 ч верхний слой жидкости декантируют вместе с неосевшими мелкими частицами. К осадку приливают 50-кратный объем 0,5 М раствора NaOH, тщательно перемешивают и через час ионит фильтруют через воронку Бухнера. Осадок на воронке промывают д. в. до pH 7,0. Затем ионит перемешивают в 50-кратном объеме 0,5 М растворе HCl и через 30–60 мин отмывают д. в. до pH 5,0. ДЭАЭ-целлюлозу повторно обрабатывают 50-кратным объемом 0,5 М раствора NaOH, переводя ионит в OH⁻-форму, перемешивают и через час отмывают д. в. до pH воды.

Колонку заполняют суспензией ДЭАЭ-целлюлозой в элюирующем буферном растворе. Заполнение колонки можно проводить и суспензией ионита в д. в. и лишь после уплотнения слоя сорбента уравнивать колонку элюирующим буферным раствором. Над верхним слоем сорбента всегда должен оставаться слой жидкости не менее 1,5–2,0 см.

Построение калибровочного графика. В работе используют калибровочный график, построенный для определения белка по биуретовой реакции или методу Лоури.

Ход работы. Зерновки пшеницы гомогенизируют на механической мельнице до получения порошкообразной массы с размером частиц 1 мм. Затем добавляют 50 мМ *трис*-HCl буфер, pH 7,8, содержащий 1 мМ ЭДТА и 1% -ный 2-меркаптоэтанол, в соотношении 1:3 (на 1 г зерновок 3 мл буфера). После перемешивания гомогенат выдерживают 30 мин, а затем для удаления неполностью разрушенных клеток и ядер гомогенат центрифугируют 15 мин при 7000g.

В супернатант добавляют кристаллический сульфат аммония, выделяя фракцию, выпадающую в осадок при насыщении раствора (NH₄)₂SO₄ до 70%-ной концентрации, интенсивно встряхивают в течение 5 мин, смесь центрифугируют 10 мин при 7000g. Осадок растворяют в 1–2 мл 50 мМ *трис*-HCl буфера, pH 7,8, содержащего 1 мМ ЭДТА и 1% -ный 2-меркаптоэтанол.

Осадок после растворения наносят на колонку (1,5×30 см) с сефадексом G-25 fine, уравновешенную 10 мМ *трис*-HCl буфером, pH 7,8, содержащим 0,5 мМ ЭДТА и 1% -ный 2-меркаптоэтанол. Скорость элюции 20–25 мл/ч.

Светопоглощение элюируемых растворов измеряют при 280 нм с помощью прибора Uvicord (LKB, Швеция) или на спектрофотометре, оборудованном проточной кюветой. Фракции с наибольшей активностью и малым фоном объединяют и используют для дальнейшей очистки.

Концентрацию белка определяют по биуретовой реакции или методу Лоури, а активность фермента, как описано выше.

Хроматография фермента на ДЭАЭ-целлюлозе. Обесоленный раствор белка наносится вначале на колонку (1,5×15 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 10 мМ *трис*-HCl буфером, pH 7,8, содержащим 0,5 мМ ЭДТА и 1% -ный 2-меркаптоэтанол.

Элюцию проводят в линейном градиенте 10 мМ *трис*-HCl буфера, pH 7,8, содержащим 0,5 мМ ЭДТА и 1% -ный 2-меркаптоэтанол, используя ступенчатый градиент 0–0,3 М раствор KCl в элюирующем буфере. Скорость элюции — 20 мл/ч. Собирают фракции по 4 мл, определяют в них содержание белка и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Фракции с наибольшей активностью фермента объединяют и лиофилизируют.

Метод расчета. Результаты исследований записывают в таблицу 8.48.

Таблица 8.48

Результаты очистки полученных препаратов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы зерновок пшеницы

Стадии очистки	Общий белок, мг	Активность Г6ФДГ		Выход, %		Степень очистки
		общая E, мкмоль/мин	удельная E/мг	по белку	по активности	
Исходный препарат				100	100	1
После осаждения (NH ₄) ₂ SO ₄						
Хроматография на колонке с сефадексом G-25 fine						
Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой						

Заполнение таблицы проводят по следующим формулам:

$$\text{общий белок (мг)} = C_{\text{белка}} (\text{мг/мл}) \cdot V (\text{мл});$$

$$\text{общая активность } E (\text{мкмоль/мин}) = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_2}{6,22 \cdot l \cdot V_3 \cdot dt};$$

$$\text{удельная активность (Е/мг)} = E / \text{общий белок},$$

где $C_{\text{белка}}$ — концентрация белка в элюате (мг/мл); V — объем пробы (мл); dD — светопоглощение (усл. ед.); V_1 — общий объем элюата, мл; V_2 — общий объем пробы в пробирке, мл; V_3 — объем экстракта, вносимого в пробирку, мл; 6,22 — коэффициент микромолярного светопоглощения; l — ширина кюветы, см; 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.

Оформление работы. Заполнить таблицу, определить выход фермента и степень его чистоты.

8.3.7. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА АРГИНАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ

Принцип метода. Очистку фермента начинают с экстракции его из разрушенных клеток печени и выделения фермента в раствор. Для этого используют гомогенизатор. Все операции проводят при 0°C. Полученный гомогенат после действия высокой температуры центрифугируют с целью удаления неразрушенных клеток и ядер. Присутствующий в супернатанте фермент наносится на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию проводят, используя ступенчатый градиент 0–0,3 М раствора KCl в элюирующем буфере. Фракции с наибольшей активностью фермента объединяют и лиофилизируют.

Оборудование: аналитические весы; спектрофотометр с проточной кюветой или Uvicord (ЛКВ, Швеция); коллектор фракций; гомогенизатор; водяная баня; лиофильная сушка.

Посуда: стакан на 100 мл; колбы на 500 мл — 3 шт.; пипетка на 5 мл; пробирки для сбора фракций элюции — 20 шт.; хроматографические колонки (1×20 см).

Материалы и реактивы: печень животных; 5 мМ *трис*-глициновый буфер, pH 7,0; 5 мМ *трис*-глициновый буфер, pH 7,0, содержащий 0,3 М KCl; ДЭАЭ-целлюлоза.

Приготовление рабочих растворов. Раствор *трис*-глицинового буфера готовят, смешивая 0,005 М растворы триса и глицина на pH-метре до pH 7,0.

Раствор *трис*-глицинового буфера готовят, смешивая 0,005 М растворы триса и глицина на pH-метре до pH 7,0, в который добавляют KCl (14,91 мг/мл).

Раствор NaCl (9 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Ход работы. Печень (10 г) промывают 0,9%-ным раствором NaCl, удаляют кровь, сосуды и жировую ткань. После этого измельчают и гомогенизируют. К гомогенату добавляют 0,005 М *трис*-глициновый буфер, pH 7,0, в соотношении 1:10 (к 1 г печени 10 мл буфера). Гомогенат центрифугируют 15 мин при 3000g.

Осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость после определения содержания белка и активности фермента помещают в стакан объемом 100 мл, который на 10 мин погружают в водяную баню с температурой 70°C. При нагревании содержимое стакана постоянно перемешивают. Затем стакан охлаждают в бане со льдом. Раствор фермента центрифугируют 15 мин при 10 000g. В супернатанте определяют активность фермента и содержание белка.

Хроматография фермента на ДЭАЭ-целлюлозе. Раствор фермента (2 мл супернатанта) наносится на колонку (1×20 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 5 мМ *трис*-глициновым буфером, pH 7,0.

Элюцию проводят в линейном градиенте 5 мМ *трис*-глицинового буфера, pH 7,0, используя ступенчатый градиент 0–0,3 М раствор KCl в элюирующем буфере. Скорость элюции — 20 мл/ч. Собирают фракции по 4 мл, определяют в них содержание белка и активность аргиназы. Фракции с наибольшей активностью фермента объединяют и лиофилизируют.

Метод расчета. Результаты определения активности аргиназы и содержания белка, полученные на трех этапах очистки, записывают в таблицу 8.49. Выход фермента рассчитывают, принимая его содержание в исходном гомогенате за 100%. Степень очистки фермента во фракциях получают путем деления величин удельной активности аргиназы фракций на удельную активность исходного препарата.

Таблица 8.49

Результаты очистки полученных препаратов аргиназы печени

Фракции	Объем фракций, мл	Общая активность, Е	Концентрация белка, мг/мл	Удельная активность, Е/мг	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат						
Тепловая обработка						
Очистка на ДЭАЭ-целлюлозе						

Оформление работы. Записать методику очистки аргиназы, определить выход фермента и степень его чистоты.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие биогенные молекулы называются ферментами?
2. Какими свойствами обладают ферменты и их роль в функционировании живых организмов?
3. Раскройте роль ферментов как биокатализаторов.
4. Какими физическими и химическими свойствами обладают ферменты?
5. Рассказать об использовании ферментов в промышленном производстве.
6. Раскрыть значение основных каталитических констант (k_{cat} , K_m , V_m).
7. Раскрыть механизм действия ферментов.
8. Рассказать о методах определения активности ферментов.
9. Чем обусловлена специфичность ферментов?
10. Назвать основные классы ферментов и охарактеризовать их.
11. Какое биологическое значение имеет специфичность ферментов?
12. Описать строение активного центра фермента.
13. Назвать отличия в строении и действии каталитического и регуляторного центров фермента.

14. Написать уравнения и построить графики, с помощью которых можно определить основные каталитические константы (Лайнуивера — Берка, Иди — Хофсти, Диксона).

15. Раскрыть значение уравнения Михаэлиса — Ментен для описания механизма действия ферментов в условиях стационарной кинетики.

16. Какую концентрацию субстрата называют насыщающей?

17. Назвать и написать строение функциональных групп, входящих в состав активных центров ферментов.

18. Какой метод используется для выявления в составе активных центров карбоксильных групп?

19. Рассказать об использовании *o*-дианизидина и водорастворимого карбодиимида для количественного определения карбоксильных групп.

20. Какие реагенты используются для выявления функционально важных SH-групп алкогольдегидрогеназы?

21. Перечислить основные факторы, влияющие на активность ферментов.

22. Как влияет температура и pH среды на активность ферментов?

23. Описать влияние температуры на механизм действия ферментов.

24. Как определить оптимум температурной активности фермента?

25. Чем обусловлена термоллабильность ферментов?

26. Описать влияние pH среды на механизм действия ферментов.

27. Как определить оптимум pH для действия фермента?

28. При каких условиях достигается максимальная скорость ферментативной реакции?

29. Перечислить типы ингибирования и активирования ферментативных реакций.

30. Какие вещества относятся к ингибиторам ферментов?

31. Описать механизм действия активаторов.

32. Написать схему метода выделения гексокиназы из пекарских дрожжей.

33. Рассказать об использовании ионообменной хроматографии для очистки пероксидазы хрена.

34. Написать о практическом использовании пероксидазы.

35. Написать схему методов выделения алкогольдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из зерновок пшеницы.

36. Описать методы выделения и очистки лактатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из скелетных мышц.

В составе клеток растительных организмов можно определить соединения органической природы, участвующих в энергетических процессах или обеспечивающих их протекание. Разнообразие молекул повышает информационный потенциал биогенной системы, увеличивает запас внутренней энергии, способствует проявлению многообразия межмолекулярных взаимодействий.

К энергетическим биогенным соединениям относятся в первую очередь высокоэнергетические фосфаты, в составе которых присутствует один или несколько остатков фосфорной кислоты $\sim\text{PO}(\text{OH})_2$. Связь, образованная между остатками органической молекулы и фосфорильной группы, принято называть макроэргической связью. В зависимости от природы соединения энергия связи определяется запасом стандартной свободной энергии, величина которой выражается в значениях $(-\Delta G^\circ)$. Вычислить изменение стандартной свободной энергии можно, если известна величина константы равновесия (K_p) для химической реакции при заданной температуре.

При этом уравнение значения свободной энергии имеет следующее выражение: $\Delta G^\circ = -RT \ln K_p$ или $\Delta G^\circ = -2,3 RT \lg K_p$.

Зная значения константы равновесия (K_p) химической реакции при данной температуре, можно всегда вычислить изменения стандартной свободной энергии исследуемой химической реакции.

Таким образом, определенная величина стандартной свободной энергии для любого соединения есть количественный показатель свободной энергии связи, которая может высвободиться при ее разрушении. Знание этих величин

позволяет определить изменения стандартной свободной энергии химической реакции, протекающей с участием соединений, вступающих в реакцию. Особое значение в живых организмах имеют биогенные соединения, в составе которых остаток фосфорной кислоты. Все они имеют разные значения ΔG° .

К группе высокоэнергетических доноров фосфата относятся 2-фосфоенолпируват и 1,3-дифосфоглицерат, а к низкоэнергетическим акцепторам фосфата — глюкозо-1-фосфат, фруктозо-6-фосфат, глюкозо-6-фосфат, глицерол-3-фосфат, фруктозо-1-фосфат и др.

Высокоэнергетические соединения способны выполнять в клетке роль накопителей и переносчиков энергии в различные участки клетки и организма в целом. В живых организмах высокоэнергетические фосфаты способны проявлять регуляторное действие, участвуя в пусковых механизмах регуляторной системы (АТФ, ГТФ, цАМФ). Кроме того, они способны инициировать протекание и определять направленность некоторых метаболических процессов в клетке. Определяют протекание индивидуальных химических реакций, делая их практически необратимыми, вследствие высоких энергетических затрат, что характерно для реакций, катализируемых гексокиназой, фосфофруктокиназой, пируваткиназой и других, одним из субстратов которых служит АТФ. Реакции, протекающие в биогенных системах последовательно, называются сопряженными. При этом их суммарное изменение свободной энергии обеспечивает возможность образования конечного продукта. Направленность реакций определяется величиной свободной энергии. Так, если за реакцией, для которой величина ΔG° положительна, следует реакция, для которой величина ΔG° отрицательна, то вторая экзергоническая реакция может обеспечить протекание заданной последовательности реакций. Сопряженные реакции реализуются в гликолизе, цикле трикарбоновых кислот и др.

Высокоэнергетические соединения способны накапливать и переносить энергию в форме макроэргических связей, обеспечивая энергетический потенциал двигательной активности живых организмов.

К высокоэнергетическим фосфатсодержащим соединениям относятся нуклеозидмоно-, нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфаты. В их состав входят азотистые основания (аденин, гуанин, цитозин и урацил), остаток рибозы и один, два или три остатка фосфорной кислоты. Поэтому основными энергетическими соединениями считаются: АТФ (аденозин-5'-трифосфат), ГТФ (гуанозин-5'-трифосфат), УТФ (уридин-5'-трифосфат), ЦТФ (цитидин-5'-трифосфат), АДФ (аденозин-5'-дифосфат), ГДФ (гуанозин-5'-дифосфат), УДФ (уридин-5'-дифосфат), ЦДФ (цитидин-5'-дифосфат) и др.

Нуклеозидтрифосфаты относятся к соединениям способным запасать, переносить и отдавать энергию макроэргических связей, участвуя в различных химических реакциях. Причем основными переносчиками химической энергии в клетке служат АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ, которые присутствуют в каждой клетке живого организма в значительных количествах. При этом АТФ-зависимые реакции определяют направленность реакций как процессов синтеза, так и распада в клетках живых организмов. Все нуклеозидтрифосфаты хорошо растворимы в полярных растворителях.

Аденозинтрифосфат (АТФ) — сложное соединение, образованное из азотистого основания аденина, рибозы и последовательно соединенных трех остатков фосфорной кислоты. Основным местом синтеза АТФ служат митохондрии, где в результате реакций окислительного фосфорилирования образуется высокоэнергетическая молекула. Для протекания этих реакций необходимы НАДН и ФАДН₂. АТФ содержит макроэргические связи, гидролиз которых обеспечивает энергетические потребности, необходимые для протекания метаболических процессов в живых организмах. Продуктами расщепления АТФ в каталитических реакциях являются аденозиндифосфат (АДФ) и аденозинмонофосфат (АМФ). Полярность молекулы АТФ обеспечивается за счет четырех ОН-групп, способных к ионизации. Три из них имеют значение $pK \approx 2-3$ и при физиологических $pH \sim 7,4$ находятся полностью в диссоциированном состоянии. АДФ содержит три ОН-группы, способные к ионизации, две из которых полностью диссоциированы при

pH 7,0. В клетках АТФ и АДФ присутствуют в виде комплексов с ионами Mg^{2+} . Кроме ионов магния, с АТФ могут образовывать комплекс и ионы Mn^{2+} .

Величины стандартной свободной энергии гидролиза двух высокоэнергетических связей АТФ равны $-34,5 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$.

В ходе гидролиза АТФ фосфорилированная группа переносится на гидроксид-ион. Гидролиз концевой фосфорильной группы АДФ практически имеет такую же величину, тогда как энергия фосфоэфирной связи у нуклеозидмонофосфата в ~ 4 раза меньше и поэтому она практически не используется в химических реакциях биогенных систем.

В клетках живых организмов синтез АТФ может осуществляться в результате окисления органического субстрата метаболического процесса (гликолиз), в реакциях субстратного фосфорилирования. При этом происходит перенос остатка фосфорной кислоты с продукта окисления на АДФ. Такие реакции катализируют фосфоглицераткиназа и пируваткиназа. Кроме того, образование АТФ может протекать при участии ферментов, расположенных на внутренней мембране митохондрий, осуществляющих процесс окислительного фосфорилирования.

Другие нуклеозидтрифосфаты (УТФ, ГТФ и ЦТФ) выполняют в клетках узкоспециализированные функции, обеспечивая энергией только определенные химические реакции. Так, например, УТФ служит поставщиком энергии при синтезе крахмала, ЦТФ — при синтезе липидов, ГТФ — ускоряет образование пептидной связи при биосинтезе белков.

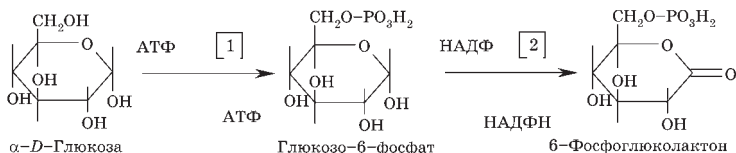
Важнейшими высокоэнергетическими соединениями клеток являются циклический 3',5'-аденозинмонофосфат (цАМФ) и циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат (цГМФ). Оба соединения найдены в клетках живых организмов. Синтезируются циклические монофосфаты из соответствующих нуклеозидтрифосфатов (АТФ и ГТФ). Реакции катализируют ферменты плазматических мембран — аденилатциклаза и гуанилатциклаза. Продуктом реакции является пиррофосфат. Циклические нуклеотиды выполняют в живых организмах роль регулятора метаболических процессов.

Кроме этого, в энергетических процессах организмов участвуют глутатион, S-аденозилметионин, креатинфосфат и другие соединения. При этом глутатион является трипептидом, в состав которого входят три последовательно соединенных аминокислотных остатка (глутаминовая кислота, цистеин, глицин). Глутатион служит донором водорода в окислительно-восстановительных процессах. В процессе окисления глутатиона образуется его окисленная форма (Г—S—S—Г). Количество восстановленного глутатиона может служить критерием жизнеспособности живых организмов.

S-Аденозилметионин служит основной формой метионина, участвующего в реакциях метилирования. Синтез S-аденозилметионина катализируется метионинаденозилтрансферазой, которая осуществляет присоединение *L*-метионина к АТФ. S-Аденозилметионин является донором метильных групп, которые специализированными метилтрансферазами могут быть перенесены на гуанидиноуксусную кислоту с образованием креатина. Кроме того, S-аденозилметионин может донировать метильную группу на фосфатидилэтаноламин с образованием фосфатидилхолина. S-аденозилметионин может участвовать в метилировании амида никотиновой кислоты с образованием N¹-метилникотинамида и др.

9.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АТФ И ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТА

Принцип метода. Для определения АТФ и глюкозо-6-фосфата в растительных тканях используется метод, в основе которого проявляется сопряженное действие двух ферментов: гексокиназы (1) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (2). Реакции протекают по следующей схеме:



На первом этапе гексокиназа катализирует реакцию фосфорилирования глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата. В реакции участвует АТФ. На втором этапе реакцию дегидрирования катализирует глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (Г6ФДГ), в ходе которой глюкозо-6-фосфат превращается в 6-фосфоглюколактон. Последняя реакция протекает в присутствии НАДФ, восстанавливающегося до НАДФН. Концентрацию восстановленной формы кофермента определяют при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Оборудование: спектрофотометр; холодильник; рН-метр; центрифуга; аналитические весы.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 100 мл — 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 4 шт., на 0,2 мл — 1 шт., 1,0 мл — 1 шт., 5,0 мл — 2 шт., центрифужные пробирки.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; 0,1 М *трис*-HCl буфер, pH 7,5; 6% -ный раствор HClO_4 ; 5 М раствор K_2CO_3 ; 0,1 М раствор MgCl_2 ; 7,5 мМ раствор НАДФ; 0,5 М раствор глюкозы; гексокиназа дрожжей (10 мг/мл); глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (20 Е/мл).

Приготовление растворов. Буферный раствор готовят из исходных 0,1 М растворов *триса* и HCl путем их смешивания на рН-метре до pH 7,5. Растворы HClO_4 (60 мг/мл), K_2CO_3 (691 мг/мл), глюкозы (90,1 мг/мл), MgCl_2 (9,52 мг/мл), НАДФ (5,58 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в.

Получение супернатанта. Навеску растительной ткани (1 г) измельчают, растирают до однородной массы и измеряют объем гомогената. Добавляют к гомогенату 6% -ную хлорную кислоту в соотношении 1:3 (на 1 г ткани 3 мл HClO_4). Смесь после перемешивания выдерживают 10 мин на холоду (0°C) и после этого центрифугируют 15 мин при 7000g. Супернатант (C1) переносят в центрифужную пробирку и в нее добавляют 5 М K_2CO_3 из расчета 0,05 мл K_2CO_3 на 1 мл кислого супернатанта. Добавленный K_2CO_3 должен нейтрализовать избыток кислоты в супернатанте. После перемешивания пробирку оставляют на 10 мин при 0°C, а затем центрифугируют в течение 10 мин 7000g. Полученный супернатант (C2) после измерения объема (V_1) используют в дальнейших исследованиях.

Ход работы. Для определения АТФ в кювету вносят 0,05 мл НАДФ, 0,35 мл $MgCl_2$, 2,5 мл *трис*-HCl буфера, рН 7,5, и 0,1 мл супернатанта (С2). После перемешивания измеряют светопоглощение раствора (D_1) при 340 нм и затем добавляют 0,05 мл Г6ФДГ. Через 5 мин измеряют светопоглощение раствора (D_2), которое обусловлено окислением глюкозо-6-фосфата, содержащегося в супернатанте (С2). После этого в кювету вносят 0,4 мл 0,5 М раствора глюкозы и через 0,5 мин вновь измеряют светопоглощение раствора (D_3). Затем добавляют 0,05 мл раствора гексокиназы, содержимое кюветы перемешивают и регистрируют светопоглощение раствора в течение 12–15 мин (D_4). Опыт повторяют 3–4 раза.

Метод расчета. *Количество АТФ* (мкмоль/г массы) в исследуемой пробе вычисляют по следующей формуле:

$$C_{\text{АТФ}} = \frac{dD_1 \cdot V_1 \cdot V_3}{\varepsilon \cdot l \cdot V_2 \cdot P},$$

где dD_1 — значение светопоглощения пробы, вызванное использованием АТФ в сопряженной системе ферментативных реакций ($dD_1 = D_4 - D_3$), усл. ед.; V_1 — общий объем супернатанта (С2), мл; V_2 — объем супернатанта (С2), вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; ε — коэффициент молярного светопоглощения НАДФН при 340 нм ($\varepsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$); l — ширина кюветы, см; P — навеска растительной ткани, г.

Количество глюкозо-6-фосфата (мкмоль/г массы) в исследуемой пробе вычисляют по следующей формуле:

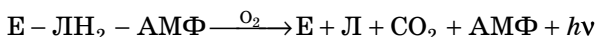
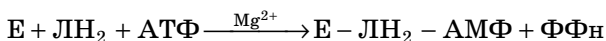
$$C_{\text{АТФ}} = \frac{dD_2 \cdot V_1 \cdot V_3}{\varepsilon \cdot l \cdot V_2 \cdot P},$$

где dD_2 — значения светопоглощения пробы, вызванное окислением глюкозо-6-фосфата, в реакции катализируемой Г6ФДГ ($dD_2 = D_2 - D_1$), усл. ед. Остальные значения приведены выше.

Оформление работы. Записать величины АТФ и глюкозо-6-фосфата, определенные в исследуемой растительной ткани.

9.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АТФ С ПОМОЩЬЮ ЛЮЦИФЕРАЗЫ (ПО УГАРОВОЙ И БРОВКО)

Принцип метода. В основе метода лежит хемилюминесцентная реакция, катализируемая люциферазой. С помощью этого фермента можно определять в биологических жидкостях микроколичества различных метаболитов клеток (АТФ, ФМН, НАД, НАДФ и др.), а также активность многих ферментов, катализирующих реакции с участием этих метаболитов. Люцифераза катализирует реакцию окисления люциферина в присутствии АТФ и Mg^{2+} . Реакция протекает по следующей схеме:



где E — люцифераза; LH_2 — люциферин; L — продукт окисления (оксилуциферин); $\Phi\Phi_n$ — пирофосфат.

Реакция абсолютно специфична по отношению к люциферину и АТФ и сопровождается излучением квантов света. Причем квантовый выход биолюминесценции близок к 1. Для измерения интенсивности биолюминесценции используют люминометр. АТФ в реакционную смесь впрыскивают с помощью разбавителя. Используя люциферазу можно определить содержание АТФ в концентрациях от 50 нм до 1 мМ или от 0,1 нмоль до 2 мкмоль в образце.

Активность люциферазы измеряют по величине максимальной интенсивности света, излучаемой в процессе ферментативной реакции при насыщающих концентрациях субстратов (1 мМ АТФ, 60 мкМ люциферин). Интенсивность света выражают в милливольтах. При измерении биолюминесценции используют пробирки ($\varphi = 10$ мм) из полистирола. Очищенные препараты люциферазы крайне нестабильны в растворе, поэтому лучше использовать иммобилизованные препараты фермента, которые обладают высокой активностью и стабильностью.

Оборудование: люминометр; центрифуга; аналитические весы; секундомер.

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

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; люцифераза; 0,02 М *трис*-ацетатный буфер, pH 7,8, содержащий 2 мМ ЭДТА; 0,6 мМ раствор люциферина; 0,1 М раствор MgSO_4 ; 4,0 мМ раствор АТФ.

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,02 М растворов триса и уксусной кислоты путем их смешивания на pH-метре до pH 7,8 с добавлением ЭДТА (0,585 мг/мл). Раствор люциферазы готовят перед употреблением путем растворения лиофилизированного препарата (33 мг/мл) в *трис*-ацетатном буфере. Раствор люциферина (0,168 мг/мл), MgSO_4 (12,04 мг/мл) и АТФ (2,03 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в.

Ход работы. В пробирку вносят 1,0 мл 0,02 М *трис*-ацетатный буфер, pH 7,8, содержащий 2 мМ ЭДТА, 0,2 мл 0,6 мМ раствора люциферина, 0,2 мл 0,1 М раствора MgSO_4 и 0,2 мл раствора люциферазы. После перемешивания реагентов пробирку с рабочим раствором помещают в кюветное отделение люминометра и начинают регистрировать интенсивность люминесценции. После записи фона ($I_{\text{фон1}}$) в течение 15 с в раствор быстро вносят 0,5 мл супернатанта, продолжая регистрировать интенсивность люминесценции ($I_{\text{оп}}$). Разность между фоновым и максимальным уровнем люминесценции является мерой активности люциферазы ($I_{\text{оп1}} = I_{\text{оп}} - I_{\text{фон1}}$), катализирующей биOLUMИнесцентную реакцию с участием АТФ супернатанта.

В качестве контроля используют биOLUMИнесцентную реакцию, которая протекает в аналогичных условиях, только вместо супернатанта в кювету вносят 0,5 мл 4,0 мМ раствора АТФ и затем измерения проводят так же, как и опытной пробы ($I_{\text{к}} = I_{\text{к1}} - I_{\text{фон2}}$).

Метод расчета. Содержание АТФ (C_x , мкмоль на 1 г сухой массы) рассчитывают по формуле

$$C_x = \frac{C_{\text{АТФ}} \cdot I_{\text{оп1}} \cdot V_1 \cdot V_2}{I_{\text{к}} \cdot P \cdot V_3},$$

где $C_{\text{АТФ}}$ — концентрация АТФ в контрольной пробе, мкмоль; $I_{\text{оп1}}$ — интенсивность люминесценции опытной

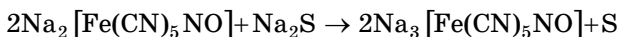
пробы ($I_{\text{оп1}} = I_{\text{оп}} - I_{\text{фон1}}$); $I_{\text{к}}$ — интенсивность люминесценции контроля ($I_{\text{к}} = I_{\text{к1}} - I_{\text{фон2}}$); V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — конечный объем пробы в кювете, мл; V_3 — объем супернатанта, вносимый в кювету, мл; P — навеска ткани, г.

Кроме того, при определении АТФ с помощью люциферазы можно использовать калибровочный график, варьируя концентрации аденозин-5'-трифосфата в пределах от 0,1 нМ до 0,1 мМ.

Оформление работы. Записать методику проведения опыта, определить содержание АТФ в исследуемой пробе и описать роль АТФ в метаболических процессах клеток растений.

9.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАТИОНА В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Принцип метода. В щелочной среде от глутатиона отщепляется сульфид натрия, который реагирует с нитропруссидом натрия.



Нитропруссид натрия

Окрашенный комплекс

В результате образуется комплекс, окрашивающий раствор в малиновый цвет.

Оборудование: фарфоровая ступка или гомогенизатор; аналитические весы; спиртовка; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетки на 2,0 мл — 2 шт.; пробирки — 2 шт.

Материалы и реактивы: проростки пшеницы; $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; аммиак концентрированный; нитропруссид натрия.

Приготовление растворов. 2% -ный раствор нитропрussa натрия готовят, растворяя навеску в д. в. Насыщенный раствор сульфата аммония готовят, растворяя навеску в д. в.

Для приготовления супернатанта 2 г проростков пшеницы растирают в фарфоровой ступке или на гомогенизаторе в присутствии 6 мл насыщенного раствора сульфата

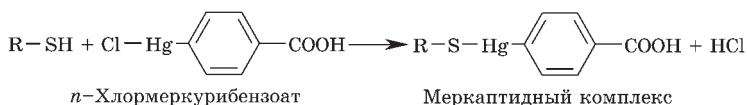
аммония. После перемешивания гомогенат центрифугируют 20 мин при 7000g.

Ход работы. В две пробирки (контроль и опыт) вносят по 2 мл супернатанта. Контрольную пробирку нагревают до кипения для денатурации белков и глутатиона, а затем охлаждают. После этого в обе пробирки добавляют по 2,0 мл аммиака и по 1,0 мл 2% -ного раствора нитропруссид натрия.

Оформление работы. Наблюдать за изменением окраски в каждой пробирке, отметить особенности протекания реакции.

9.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛУТАТИОНА МЕТОДОМ ТИТРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ *n*-ХЛОРМЕРКУРИБЕНЗОАТА

Принцип метода. Ртутьсодержащие соединения образуют со свободной сульфгидрильной группой глутатиона меркаптидный комплекс:



Полученный меркаптид имеет поглощение при 250 нм.

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы.

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

Материалы и реактивы: 1 мМ раствор глутатиона восстановленного; 0,5 мМ раствор *n*-хлормеркурибензоат натрия (*n*-ХМБ); 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,6.

Приготовление растворов. Буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов Na₂HPO₄ и NaH₂PO₄ путем их смешивания на pH-метре до pH 7,6.

Раствор глутатиона восстановленного (0,3073 мг/мл) и хлормеркурибензоат натрия (0,19 мг/мл) готовят, растворяя навески в 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,6.

Ход работы. В опытную кювету вносят 0,1 мл 1 мМ раствора глутатиона и 2,7 мл 0,1 М Na-фосфатный буфер,

pH 7,6. В контрольную кювету — 2,8 мл 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,6. В обе кюветы добавляют по 0,02 мл 0,5 мМ раствора *n*-ХМБ, тщательно перемешивают и через 2 мин измеряют светопоглощение опытного раствора при 250 нм против контроля. Затем последовательно еще 9 раз в кюветы добавляют по 0,02 мл 0,5 мМ раствора *n*-ХМБ. Данные записывают в таблицу 9.1. Можно величины светопоглощения растворов определить из спектров поглощения меркаптидного комплекса, которые записывают на спектрофотометре путем сканирования длин волн с 350 до 200 нм, со скоростью 100 нм/мин.

Таблица 9.1

Объемы и концентрации растворов *n*-ХМБ в кювете при проведении реакции с восстановленным глутатионом

№ измерений	Объем раствора <i>n</i> -ХМБ, вносимого в кювету, мл	Общий объем раствора <i>n</i> -ХМБ в кювете, мл	Концентрация раствора <i>n</i> -ХМБ в кювете, мкМ	Содержание <i>n</i> -ХМБ в кювете, мкмоль	Светопоглощение раствора <i>D</i> , усл. ед.
1	—	—	—	—	
2	0,02	0,02	3,55	0,01	
3	0,02	0,04	7,08	0,02	
4	0,02	0,06	10,49	0,03	
5	0,02	0,08	13,89	0,04	
6	0,02	0,10	17,24	0,05	
7	0,02	0,12	20,55	0,06	
8	0,02	0,14	23,81	0,07	
9	0,02	0,16	27,03	0,08	
10	0,02	0,18	30,20	0,09	
11	0,02	0,20	33,33	0,10	

Добавление реактивов продолжают до тех пор, пока не прекратится нарастание поглощения при внесении новых порций раствора *n*-ХМБ, что обусловлено связыванием всех SH-групп глутатиона.

Метод расчета. Константу связывания (K_s) можно определить из графика, построенного в координатах Скэтчарда (dD , dD/I). Для анализа данных светопоглощения

уравнение Скэтчарда можно представить в следующем виде:

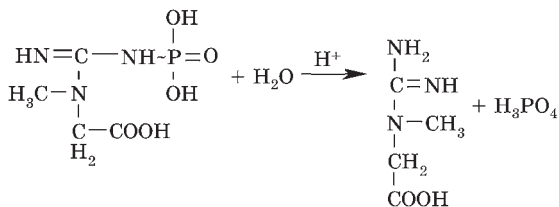
$$dD = dD_{\infty} - K_s \frac{dD}{I},$$

где dD — величина изменения светопоглощения при добавлении раствора n -ХМБ, усл. ед.; dD_{∞} — величина, характеризующая переход всего глутатиона в связанное состояние с n -ХМБ, усл. ед.; I — концентрация n -ХМБ, мкМ.

Оформление работы. Построить кривую зависимости светопоглощения меркаптидного комплекса (D , усл. ед.) от содержания n -ХМБ ($C_{\text{ХМБ}}$, мкмоль). Точка насыщения на кривой титрования глутатиона n -ХМБ должна соответствовать переходу всего глутатиона в связанное состояние.

9.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ В БИОГЕННЫХ ТКАНЯХ КРЕАТИНФОСФАТА ПО ФОСФОРУ

Принцип метода. Содержание креатинфосфата в биогенных тканях можно определять по фосфору, который накапливается в инкубируемой среде при кислых рН вследствие гидролиза фосфокреатина.



Содержание фосфора определяют по методу Фiske — Суббароу в безбелковом супернатанте. Белки осаждают с помощью ТХУ или хлорной кислоты. Неорганический фосфор, содержащийся в инкубируемой среде, образует с молибденовой кислотой фосформолибденовую кислоту. Последняя восстанавливается эйконогеном до ярко окрашенной молибденовой сини, имеющей максимум светопоглощения при 625 нм. Метод позволяет определить

содержание неорганического фосфора в гомогенате в пределах 0,2–2,0 мкмоль.

Оборудование: ФЭК; аналитические весы; центрифуга; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 6 шт., на 250 мл — 1 шт.; пипетки на 0,2 мл — 2 шт., на 1 мл — 3 шт., на 2 мл — 2 шт., на 5 мл — 4 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: мышечная ткань; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; NH_4Cl ; концентрированный аммиак; магниезиальная смесь; 96% -ный этиловый спирт ($\rho = 0,8014 \text{ г/см}^3$); 0,5% -ный раствор фенолфталеина; 0,5 М раствор хлорной кислоты; 2 М раствор КОН.

Приготовление растворов. Раствор магниезиальной смеси готовят, растворяя в 200 мл д. в. 20 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 40 г NH_4Cl и 20 мл концентрированного аммиака.

Раствор фенолфталеина готовят, растворяя 0,5 г навески в 118,5 мл 96% -ного этилового спирта.

Растворы хлорной кислоты и КОН готовят, растворяя навески в д. в.

Приготовление супернатанта. 0,5 г измельченной и гомогенизированной мышечной ткани помещают в предварительно охлажденный 0,5 М раствор хлорной кислоты, объем доводят до 10 мл и после перемешивания центрифугируют 15 мин при 7000g. К супернатанту добавляют 2 М раствор КОН до нейтральной pH среды. Раствор охлаждают, выпавший в осадок KClO_4 удаляют фильтрованием и в фильтрате определяют креатинфосфат.

Ход работы. К 1 мл фильтрата добавляют 1,5 мл магниезиальной смеси, 0,05 мл 0,5% -ного раствора фенолфталеина и проводят осаждение неорганического фосфата, как описано в методе Фiske — Суббароу. Осадок неорганического фосфата удаляют фильтрованием. Затем отбирают 1,5 мл фильтрата и проводят в нем определение фосфора. Количество креатинфосфата рассчитывают, используя калибровочный график для определения неорганического фосфора методом Фiske — Суббароу.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации креатинфосфата в исследуемой пробе.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие биогенные молекулы можно отнести к молекулам энергетических процессов?
2. Назвать основные биогенные молекулы энергетических процессов и рассказать об их биологической роли.
3. Какие вещества служат источниками энергии в работающей мышце?
4. Раскрыть роль АТФ и его производных в энергетике живых организмов.
5. Какую роль играют АТФ и другие макроэргические соединения в процессах синтеза биогенных соединений?
6. Описать свойства циклических нуклеозидмонофосфатов.
7. Сравнить между собой неэнзиматический и энзиматический методы определения АТФ.
8. В чем проявляется специфичность энзиматического метода определения АТФ?
9. Раскрыть роль глутатиона в формировании окислительно-восстановительного потенциала клеток живых организмов.
10. Написать уравнение химической реакции взаимодействия глутатиона с *n*-хлормеркурибензоатом.
11. Написать структурную формулу креатинфосфата и описать его участие в работе мышц.

ГЛАВА 10 БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛОКА

Молоко — это биологическая жидкость, вырабатываемая в молочной железе, содержащая все необходимые компоненты (витамины, белки, липиды, углеводы, макро-, микроэлементы и другие соединения), предназначенные для активного роста детенышей в постэмбриональный период, а также служит сырьем для выработки различных молочных продуктов (сметана, простокваша, кефир, творог, масло, сыры и др.). Качество и количество молока зависит от вида и породы животного, возраста, стадии лактации, условий кормления, содержания, состояния здоровья и др.

Состав молока во многом определяется рационом кормления животных, в корм которых в основном используются растения. Поэтому в молоке могут присутствовать различные вещества, синтезирующиеся в растениях и поступающие в организм животного с кормом. Кроме того, в составе молока присутствуют биогенные молекулы, синтез которых происходит в различных органах и тканях животных. Откуда они поступают в кровь, которая переносит их в клетки молочной железы. Однако основным местом синтеза специализированных биогенных молекул является молочная железа. Среди биогенных молекул, содержащихся в молоке, следует выделить следующие: аминокислоты, пептиды, белки (простые и сложные), азотистые основания (аденин, гуанин, цитозин, тимин, урацил), нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК), углеводы (моно-, олиго- и полисахариды), липиды (жирные кислоты, нейтральные липиды, фосфолипиды, сфинголипиды, стероиды), витамины, гормоны, биологически активные вещества. Причем составными частями молока является плазма и белково-липидные комплексы (мицеллы казеина и жировые шарики).

Основными соединениями, которые синтезируются только в клетках молочной железы являются казеины, β -лактоглобулин, α -лактоальбумин и лактоза, тогда как синтезируемые в лактоцитах липиды отличаются по составу от липидов плазмы крови и тканей животного.

Биосинтез основных составных частей молока происходит в лактоцитах — специализированных клетках молочной железы. При этом субстраты и метаболиты для синтеза биогенных молекул в лактоцитах поступают из крови в виде низкомолекулярных соединений (аминокислоты, жирные кислоты, глюкоза, витамины, элементы и др.), количественный и качественный состав которых определяет молочную продуктивность животного.

В целом молоко КРС представляет собой белую с желтоватым оттенком непрозрачную жидкость сладковатого вкуса и своеобразного запаха. Цельное молоко можно разделить на молочную плазму и белково-липидные комплексы. Последние представлены в молоке небольшими частицами, называемыми молочными или жировыми шариками. Размеры жировых шариков могут колебаться в пределах от 0,5 до 18 мкм (в среднем достигая размера 3 мкм). Молочная плазма — многокомпонентная система, содержащая разной степени дисперсности органические и минеральные вещества.

Химический состав молока животных очень сложный. Коровье молоко содержит 83–88% воды, 12–17% сухого вещества, в которое входит 3,8–6,0% липидов, 2,7–3,7% белков (2,2–2,9% казеина), 2–5% азотистых оснований, 4–5% молочного сахара (лактоза), 0,6–0,8% минеральных веществ, 0,1–0,2% лимонной кислоты.

Вода молока может находиться в свободном состоянии или в составе мицелл. Полярность воды обеспечивает формирование стабильных мицелл, в составе которых различные липиды расположены во внутренней части, а по периферии локализуются белки и углеводы. Кальций, присутствующий в молоке, образует связи с белками, придавая молоку свойства коллоида. Различают молоко парное, цельное и питьевое.

Парное молоко получается сразу после доения коров. Оно имеет температуру, близкую к температуре тела

животного. Однако при стоянии температура молока понижается и на его поверхность всплывают жировые шарики размером до 1,5 мкм, образуя слой сливок. С большим диаметром жировые шарики могут формировать отстой жира. Такое молоко называют цельным.

Питьевое молоко получают путем гомогенизации цельного молока, которое сопровождается раздроблением жировых шариков молока до 0,5–0,8 мкм, а также увеличением дисперсности белковых частиц. Гомогенизацию молока проводят с целью улучшения внешнего вида и вкуса, а также повышения консистенции и снижения расходов сырья. В гомогенизированном молоке не происходит агрегирования жировых шариков. Так как механизм агрегации обусловлен возникновением слабых межмолекулярных взаимодействий между аминокислотными остатками, поверхностных белков жировых шариков, которые при гомогенизации молока разрушаются.

После удаления из молока воды и липидов образуется сухой обезжиренный молочный остаток (СОМО), который используется как показатель качества молока. По госстандарту СОМО из молока КРС должно быть не менее 8,0%.

Кислотность молока определяется содержанием в его составе карбоновых и высших жирных кислот, лимонной и аскорбиновой кислот, солей, аминокислот, белков, аминов и др. Накопление в молоке молочной кислоты свидетельствует об активной деятельности молочнокислых бактерий, использующих молочный сахар в реакциях брожения. Общая кислотность молока выражается в градусах Тернера (°Т) или для масла в градусах Кеттстофера (°К). При этом один градус Тернера (°Т) соответствует объему 0,1 М водного раствора гидроксида натрия, необходимого для нейтрализации 100 г исследуемого продукта. Один градус Кеттстофера (°К) соответствует объему 0,1 М водного раствора гидроксида натрия, необходимого для нейтрализации 5 г сливочного масла или его жировой фазы, умноженный на два. Кислотность свежесквашенного коровьего молока колеблется в пределах 16–18°Т.

В отличие от общей кислотности, активная кислотность молока, определяется приборами (рН-метры), в основу

работы которых положен потенциометрический метод. рН — это отрицательный логарифм концентрации ионов водорода. Присутствие в молоке аминокислот, белков, карбоновых кислот и аминокислотосодержащих соединений обеспечивает постоянство рН молока и ее буферную емкость. рН свежего коровьего молока может быть равна 6,6–6,8.

Плотность молока КРС зависит от содержания липидов и СОМО. Плотность коровьего молока может колебаться в пределах 1,029–1,032 г/см³. Плотность обезжиренного молока равна 1,033–1,035 г/см³.

Молоко имеет осмотическое давление, которое по величине близко к осмотическому давлению крови и зависит от содержания в молоке углеводов и солей.

В молоке содержатся различные ионы, которые и будут определять величину электропроводности. Возрастание электропроводности отмечается при болезни животных, а понижение электропроводности возможно при разбавлении молока водой.

Вязкость молока обусловлена взаимодействием частиц молока при их перемещении относительно друг друга. Вязкость молока больше вязкости воды и зависит от содержания белков, липидов и солей. С повышением температуры вязкость молока понижается, но может возрасти с увеличением в молоке липидов и СОМО. Сгущение молока сопровождается повышением вязкости молока. Предел колебания вязкости молока от 1,6 до 2,1.

Поверхностное натяжение молока ниже воды, что обусловлено присутствием в молоке молекул белка и жировых шариков.

В молоке животных присутствуют следующие газы: углекислый газ, кислород, азот. При этом молоко в молочной железе коровы может содержать до 10% СО₂ от всего объема. Во время доения количество углекислого газа снижается до 4–5%, вследствие вспенивания молока в подойнике. После доения концентрация СО₂ снижается в течение нескольких часов до 3%.

Способность компонентов молока свертываться под действием сычужного фермента в определенных условиях

среды имеет значение при производстве сыра и является оценочным критерием молока на сыропригодность. Продолжительность свертывания молока зависит от его кислотности и температуры среды. В диапазоне низких и высоких температур отмечается понижение свертываемости компонентов молока за счет того, что при низких температурах понижается активность сычужного фермента, а высокие температуры (более 65°C) приводят к его денатурации, сопровождаемой утратой нативной структуры белковой глобулы. Оптимальной температурой для свертывания молока считается 40–42°C.

Продолжительность свертывания молока увеличиваетсся с возрастанием его кислотности. Свертываемость молока и качество сгустка напрямую зависят от условий кормления и содержания скота.

В молоке накапливаются биологически активные вещества, оказывающие влияние на протекание метаболических процессов в организме животного. Используя методы экстракции, достигается извлечение БАВ из животных тканей в раствор, тогда как молоко может быть подвергнуто исследованию после осаждения белково-липидных компонентов или путем экстракции его компонентов, в частности липидов с использованием неполярных растворителей. Перед экстракцией анализируют природу БАВ для определения состава экстракционной среды. Экстракцию проводят при оптимальных условиях с учетом следующих показателей (температура, pH, ионная сила, время экстракции, природа и концентрация растворителя). Экстракцию БАВ из тканей молочной железы лучше всего проводить при постоянном перемешивании смеси. По окончании экстракции удаляют неп полностью разрушенные клетки и ядра путем центрифугирования или фильтрованием. После центрифугирования надосадочную жидкость осторожно сливают, а осадок отбрасывают. Исследованию подвергаются вещества, содержащиеся в надосадочной жидкости. Для воспроизведения результатов исследования необходимо придерживаться точного описания методики эксперимента.

10.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛОТНОСТИ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Принцип метода. Под плотностью определяют величину, которая характеризует массу вещества, содержащуюся в единице его объема:

$$\rho = m/V,$$

где ρ — плотность, г/см³; m — масса вещества, г; V — объем, см³.

Плотность вещества зависит от температуры и обычно с повышением температуры плотность, как правило, уменьшается.

Зависимость плотности от температуры выражается уравнением Д. И. Менделеева:

$$\rho_T = \rho_0(1 - \alpha T),$$

где ρ_T — плотность при температуре T ; ρ_0 — плотность при 273 К; α — коэффициент; T — температура, К.

В повседневной практике измеряют плотность молока КРС или других животных. При этом установлено, что плотность молока зависит от содержания липидов и СОМО. Измерение плотности молока производят при постоянной температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Измерения плотности в заготавливаемом молоке производят не ранее чем через 2 ч после дойки, тогда как кисломолочные продукты анализируют в подготовленной смеси до сквашивания. Перед определением плотности молока с отстоявшимся слоем сливок их вначале нагревают до 37°C , а затем охлаждают до $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Плотность коровьего молока может колебаться в пределах 1,029–1,032 г/см³.

Плотность обезжиренного молока равна 1,033–1,035 г/см³. Плотность молока можно определять с помощью ареометрического и весового методов.

Оборудование: ареометры типа АМ и АМТ; аналитические весы.

Посуда: цилиндры объемом 250 и 500 мл; химические стаканы на 50 мл — 5 шт.

Материалы и реактивы: молоко коровье 500 мл.

Ареометрический метод. В аналитических исследованиях используют чистую, промытую дистиллированной водой посуду. Цилиндр с исследуемой пробой устанавливают на ровную горизонтальную поверхность и измеряют температуру пробы. После этого ареометр медленно опускают в цилиндр с молоком, оставляя его в плавающем состоянии, следя за тем, чтобы ареометр не касался стенок цилиндра.

Измерения производят через 2–3 мин после установления ареометра в неподвижном положении. Затем ареометр осторожно немного приподнимают и снова опускают, оставляя в свободно плавающем состоянии. После прекращения колебаний ареометра проводят повторный отсчет показаний плотности. Расхождение между повторными определениями плотности не должны превышать 3–5%. Результаты измерений заносятся в таблицу 10.1.

Т а б л и ц а 10.1

Значения температуры и плотности молока

п/п	Температура, °С	Плотность, г/см ³
1		
2		
3		
$\rho \pm \Delta\rho$		

Весовой метод. Для проведения исследований отбирают пять мерных стаканов на 50 мл. Вся посуда должна быть промыта дистиллированной водой и высушена. Каждый стакан должен быть предварительно взвешен. Результаты взвешивания должны быть занесены в таблицу 10.2. Затем последовательно мерными пипетками отбирают молоко по 10, 20, 30, 40, 50 мл в каждый стакан. После этого стаканы взвешиваются на точных аналитических весах с погрешностью ± 1 мг. Результаты измерений записывают в таблицу 10.2.

Метод расчета. Для вычисления плотности молока в стакане используйте следующую формулу:

$$\rho = \frac{(m_2 - m_1)}{V} = \frac{m_0}{V},$$

где m_1 — масса стакана, г; m_2 — масса стакана с молоком, г; m_0 — масса молока, г; ρ — плотность молока, г/см³; V — объем молока в стакане, мл (1 мл = 1 см³).

Таблица 10.2

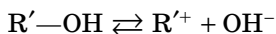
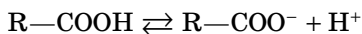
Значения определяемых параметров весовым методом

п/п	V , мл	m_1	m_2	m_0	ρ
1	10				
2	20				
3	30				
4	40				
5	50				

Оформление работы. Записать результаты измерений и сравнить данные между собой. Отметить удобства, доступность и точность измерений, полученные с помощью ареометрического и весового методов.

10.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРУЕМОЙ КИСЛОТНОСТИ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Принцип метода. Метод основан на нейтрализации кислот солей, белков, аминокислот, свободных кислот и других кислотных соединений молока раствором щелочи (NaOH). В водной среде кислоты диссоциируют с высвобождением протонов (H^+), а основания — гидроксид-ионов (OH^-).

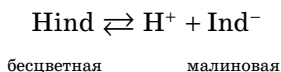


В основе кислотно-основного титрования лежит соединение протонов и гидроксид-ионов с образованием малодиссоциирующих молекул воды ($K_d = 1,82 \cdot 10^{-16}$).

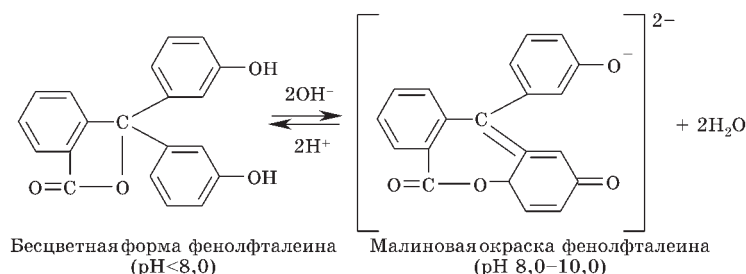


Концентрацию кислот определяют с помощью титрованных растворов щелочей. При этом точку эквивалентности

при нейтрализации определяют по изменению окраски индикатора (фенолфталеина). Фенолфталеин (HInd) относится к группе кислотных индикаторов, обладающих свойствами отдавать протоны.



При избытке щелочи в растворе, содержащем фенолфталеин, ионы OH^- начинают связывать протоны с образованием малодиссоциирующих молекул воды. При этом равновесие диссоциации индикатора сместится вправо и накопление анионов Ind^- вызовет окрашивание раствора в малиновый цвет.



Титруемую кислотность выражают в градусах Тернера ($^{\circ}\text{T}$) или для масла в градусах Кеттстофера ($^{\circ}\text{K}$).

Кислотность свежевыдоенного молока равна 16–18 $^{\circ}\text{T}$.

Оборудование: бюретки с резиновым затвором или со стеклянными кранами на 20–50 мл.

Посуда: колбы конические на 150 или 200 мл; пипетка на 10 мл.

Материалы и реактивы: молоко коровье; мороженое; сметана; творог; 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина; 0,16 М раствор CoSO_4 ; 0,1 М раствор NaOH ; эталонный раствор.

Приготовление рабочих растворов. Раствор гидроксида натрия готовят, растворяя 4 г навески в 1 л дистиллированной

воды; раствор фенолфталеина готовят, растворяя 1 г навески в 100 мл 70%-ного этилового спирта; раствор CoSO_4 готовят, растворяя 2,48 г навески в 100 мл дистиллированной воды.

Эталонный раствор готовят путем прибавления к 20 мл молока 0,5 мл 0,16 М CoSO_4 . Эталонный раствор необходимо использовать в течение суток.

Ход определения.

Титруемая кислотность молока. В коническую колбу на 150–200 мл вносят 10 мл молока, 20 мл дистиллированной воды и 3 капли фенолфталеина. Смесь перемешивают и титруют 0,1 М раствором NaOH до образования слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин. Титрование заканчивают после достижения цвета смеси окраски эталонного раствора. Результаты записывают в таблицу 10.3.

Таблица 10.3

Результаты титрования молока и молочных продуктов

Продукт	Объем 0,1 М раствора NaOH , мл	Титруемая кислотность, °Т
Молоко		
Мороженое		
Сметана		
Творог		

Метод расчета. Расчет титруемой кислотности молока в градусах Тернера подсчитывают по следующей формуле:

$$A = 10 \cdot V,$$

где A — титруемая кислотность молока, °Т; V — объем щелочи, пошедший на нейтрализацию 10 мл молока, мл.

Титруемая кислотность мороженого и сметаны. В колбу вместимостью 100 мл помещают 5 г продукта, добавляют 30 мл дистиллята и 3 капли фенолфталеина. После перемешивания пробу титруют, как описано выше при титровании молока.

Титруемая кислотность творога и творожных изделий. В фарфоровую чашку вносят 5 г продукта, тщательно перемешивают и растирают пестиком до однообразной массы. Затем прибавляют небольшими порциями 50 мл дистиллята, нагретого до 35–40°C, и 3 капли фенолфталеина. Смесь перемешивают и титруют, как описано выше при титровании молока.

Оформление работы. Записать результаты титрования молока, мороженого, сметаны, творога. Сравнить полученные величины между собой и с литературными данными.

10.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH МОЛОКА

Принцип метода. pH — это отрицательный логарифм концентрации ионов водорода ($\text{pH} = -\lg[\text{H}^+]$). pH молока поддерживается за счет содержащихся в нем фосфорной и карбоновых кислот, аминокислот, заряженных групп белков и аминокислотосодержащих соединений. pH свежего коровьего молока может быть равно 6,6–6,8.

Оборудование: pH-метр; магнитная мешалка.

Посуда: мерный стакан на 100 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: молоко коровье.

Ход определения. В мерный стакан наливают 50 мл молока и на глубину 1,0–1,5 см погружают в него электроды pH-метра. Выжидают в течение 1–2 мин и после этого записывают показания прибора. Измерения pH можно повторить после промывания электродов дистиллированной водой и просушивания их фильтровальной бумагой.

Метод расчета. Результаты нескольких измерений обрабатывают с помощью статистических методов и записывают в следующем виде:

$$x_{\text{ср}} \pm \Delta x.$$

Оформление работы. Записать величины pH молока и сравнить полученные данные с показателями титруемой кислотности молока. Объяснить различия в полученных величинах.

10.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ ВЛАГИ И СУХОГО ВЕЩЕСТВА В МОЛОКЕ, СМЕТАНЕ, МОРОЖЕНОМ, СЫРАХ, ТВОРОГЕ И ТВОРОЖНЫХ ИЗДЕЛИЯХ

Принцип метода. Метод основан на высушивании навески молочного продукта при температуре 105°C до постоянной массы. На основании полученных данных вычисляют массовую долю влаги и сухого вещества в молочном продукте.

Оборудование: сушильный шкаф; аналитические весы.

Посуда: стеклянные бюксы; стеклянная палочка; пипетка на 10 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: молоко коровье; мороженое; сыр; творог; сметана; песок; 1 М раствор HCl .

Приготовление рабочих растворов. Раствор 1 М HCl готовят, растворяя исходный 35,2%-ный (11,34 М) раствор соляной кислоты ($\rho = 1,175 \text{ г/см}^3$) в д. в.

Для исследований используют песок, который вначале просеивают через сито с диаметром отверстий 1–2 мм, а затем многократно промывают дистиллированной водой. После этого в песок заливают 1 М раствор HCl , перемешивают стеклянной палочкой и дают отстояться в течение 30 мин. Затем сливают раствор соляной кислоты и промывают песок дистиллированной водой до нейтральной реакции, используя для определения кислотности среды лакмусовую бумажку. Высушенный в сушильном шкафу песок хранят в банке с плотно закрытой пробкой.

Ход определения. В стеклянную бюксу насыпают 20–30 г песка. Затем помещают бюксу в сушильный шкаф и выдерживают в течение 30–40 мин при 105°C . После этого бюксу вынимают из сушильного шкафа, закрывают крышкой, охлаждают в эксикаторе в течение 40 мин и взвешивают на высокоточных аналитических весах с погрешностью ± 1 мг. В эту же бюксу вносят 10 мл молока, или 5–10 г мороженого, или 3–5 г сыра, или 10 г сметаны, закрывают бюкс крышкой и взвешивают. После этого содержимое бюксы перемешивают стеклянной палочкой до

получения однородной массы, Затем бюксу и крышку помещают в сушильный шкаф с температурой 105°C на 2 ч и после этого вынимают и закрывают крышкой, охлаждают в эксикаторе 40 мин и взвешивают. Высушивание бюксы проводят несколько раз до тех пор, пока не установится постоянный вес. Результаты взвешивания записывают в таблицу 10.4.

Т а б л и ц а 10.4

**Значения основных параметров
при определении массы влаги в продуктах питания**

п/п	Образцы	Время высушивания, ч	Масса, мг
1	Бюкса с песком и стеклянной палочкой	—	
2	Бюкса с песком, стеклянной палочкой и навеской до высушивания	—	
3	Бюкса с песком, стеклянной палочкой и навеской после высушивания	2	
4		3	
5		4	

Метод расчета. а) массовая доля сухого вещества (A , %):

$$A = \frac{(m_{\text{п}} - m_1)}{(m_2 - m_1)} \cdot 100,$$

где m_1 — бюкса с песком и стеклянной палочкой; m_2 — бюкса с песком, стеклянной палочкой и навеской до высушивания; $m_{\text{п}}$ — бюкса с песком, стеклянной палочкой и навеской до высушивания;

б) массовой доли влаги в продуктах (B , %):

$$B = 100 - A.$$

Оформление работы. Записать величины массовых долей влаги и сухого вещества исследованных молочных продуктов. Сравнить данные между собой.

10.5. МЕТОДЫ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВО-ЛИПИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ МОЛОКА

10.5.1. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВО-ЛИПИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ МОЛОКА С ПОМОЩЬЮ РАСТВОРА ХЛОРИДА КАЛЬЦИЯ

Принцип метода. Для осаждения белков в биохимии используют нейтральные соли $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{CaCl}_2, \text{CH}_3\text{COONa}, \text{CH}_3\text{COONH}_4$ и др.). При этом установлено, что ионы, обладающие одинаковой валентностью, вызывают равный эффект и их действие пропорционально величине ионной силы (μ). Последняя вычисляется согласно следующего уравнения:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_1^n C_i Z_i^2,$$

где C_i — концентрация, М; Z_i — валентность ионов в растворе, содержащем n ионов.

Белково-липидные комплексы (БЛК) молока в присутствии CaCl_2 начинают агрегировать. Процесс обусловлен тем, что ионы соли присоединяются к полярным группам белков ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CO}-\text{NH}-$ и др.), замещая молекулы воды. Процесс активно протекает при наличии денатурированных форм белков, которые образуют в присутствии ионов Ca^{2+} ассоциаты, выпадающие в осадок. Осаждение белков возрастает с увеличением концентрации ионов, а также зависит от валентности и размеров ионов. Образованию осадка способствует понижение температуры среды. Осадок отделяют от раствора центрифугированием. Процесс осаждения белков при центрифугировании обусловлен центробежной силой, возникающей при вращении ротора.

Вариант 1

Оборудование: ФЭК и спектрофотометр; водяная баня; центрифуга; штатив.

Посуда: колба на 100 мл — 1 шт.; пробирки — 4 шт.

Материалы и реактивы: молоко; 10% -ный раствор хлорида кальция.

Приготовление растворов. Раствор CaCl_2 готовят, растворяя 10 г навески в 90 мл д. в.

Ход работы. В четыре пробирки вносим по 1 мл молока, а затем в каждую из пробирок последовательно добавляем по 1, 2, 3, 4 мл 10% -ного хлорида кальция. Общий объем пробирок доводим до 5 мл дистиллированной водой, как показано в таблице 10.5.

Т а б л и ц а 10.5

Растворы хлорида кальция в молоке

п/п	Реактивы	Пробирки			
		1	2	3	4
1	Молоко, мл	1,0	1,0	1,0	1,0
2	10% -ный раствор хлорида кальция, мл	1,0	2,0	3,0	4,0
3	Вода дистиллированная, мл	3,0	2,0	1,0	—
4	Общий объем пробы, мл	5,0	5,0	5,0	5,0
5	D, усл. ед.				

После перемешивания пробирки помещаем в кипящую водяную баню (100°C) на 10 мин. После охлаждения пробирок в холодной воде растворы центрифугируем в течение 10 мин при $7 \cdot 10^3 g$. Затем надосадочную жидкость из центрифужных пробирок осторожно сливают в чистые пробирки. Измеряют оптическую плотность растворов пробы против контроля при красном светофильтре (630 нм). Контролем служат пробирки с 10% -ным раствором CaCl_2 . Пробы с меньшим поглощением супернатанта можно использовать для проведения биохимических исследований.

Оформление работы. Записать наблюдаемые изменения в исследуемых пробирках. Рассчитать концентрацию хлорида кальция в пробирке, необходимую для осаждения белков и белково-липидных комплексов молока. Описать механизм взаимодействия ионов кальция с белками и белково-липидными комплексами молока.

Вариант 2

Оборудование: ФЭК и спектрофотометр; водяная баня; центрифуга; штатив.

Посуда: колба на 100 мл — 1 шт.; пробирки центрифужные — 4 шт.; пробирки стеклянные — 4 шт.

Материалы и реактивы: молоко; хлорид кальция.

Ход работы. В четыре центрифужные пробирки последовательно вносят по 3 мл молока и по 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 г хлорида кальция (безводный) согласно таблице 10.6.

Таблица 10.6

Осаждение белково-липидных комплексов молока различными концентрациями хлорида кальция

п/п	Реактивы	Пробирки			
		1	2	3	4
1	Молоко, мл	3,0	3,0	3,0	3,0
2	Хлорид кальция, г	0,5	1,0	1,5	2,0
3	Концентрация CaCl_2 , г/мл	0,17	0,33	0,5	0,67
4	D, усл. ед.				

После перемешивания пробирки центрифугируют 15 мин при $7 \cdot 10^3 g$. Затем очень осторожно удаляют с поверхности раствора пленку белково-липидных комплексов, а содержимое переливают в новые пробирки. Пробирки с прозрачным раствором, это обычно 2 и 3, используют в аналитических исследованиях.

Оформление работы. Записать наблюдаемые изменения в исследуемых пробирках. Определить концентрацию хлорида кальция в пробирке, необходимую для осаждения белков и белково-липидных комплексов молока. Описать механизм взаимодействия ионов кальция с белками и белково-липидными комплексами молока.

10.5.2. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВО-ЛИПИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ МОЛОКА С ПОМОЩЬЮ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Принцип метода. При внесении уксусной кислоты в молоко возрастает кислотность среды, что инициирует процесс денатурации белков. В результате действия CH_3COOH

и температуры белки утрачивают свою нативную структуру и образуют ассоциаты, которые при длительном стоянии раствора начинают агрегировать, выпадая в осадок. Повышение температуры способствует ускорению денатурации белков, что обусловлено возрастанием кинетической энергии белковых молекул. Процесс осаждения ускоряется при понижении температуры среды. Осадок отделяют от раствора центрифугированием.

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; водяная баня; центрифуга; штатив.

Посуда: колба на 100 мл — 1 шт.; пробирки — 4 шт.

Материалы и реактивы: молоко; 1% -ный раствор уксусной кислоты.

Приготовление растворов. Раствор CH_3COOH готовят, растворяя 100% -ную уксусную кислоту в д. в.

Ход работы. В четыре пробирки вносим по 1 мл молока, а затем в каждую из пробирок последовательно добавляем по 1, 2, 3, 4 мл 1% -ной уксусной кислоты. Общий объем пробирок доводим до 5 мл дистиллированной водой, как показано в таблице 10.7.

Таблица 10.7

Осаждение белково-липидных комплексов молока с помощью уксусной кислоты

п/п	Реактивы	Пробирки			
		1	2	3	4
1	Молоко, мл	1,0	1,0	1,0	1,0
2	1% -ный раствор уксусной кислоты, мл	1,0	2,0	3,0	4,0
3	Вода дистиллированная, мл	3,0	2,0	1,0	—
4	Общий объем пробы, мл	5,0	5,0	5,0	5,0
5	D, усл. ед.				

После перемешивания пробирки помещаем в кипящую водяную баню (100°C) на 10 мин. После охлаждения пробирок в холодной воде растворы центрифугируем в течение 10 мин при $7 \cdot 10^3 g$. Затем надосадочную жидкость из центрифужных пробирок осторожно сливают в чистые пробирки. Измеряют оптическую плотность растворов пробы против

контроля при красном светофилтре (630 нм). Контролем служит проба с 1%-ным раствором уксусной кислоты. Пробы с меньшим поглощением супернатанта можно использовать для проведения биохимических исследований.

Оформление работы. Записать наблюдаемые изменения в исследуемых пробирках. Определить концентрацию уксусной кислоты в пробирке, необходимую для осаждения белков и белково-липидных комплексов молока. Описать механизм осаждения белков молока уксусной кислотой.

10.5.3. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВО-ЛИПИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ МОЛОКА С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЭТАНОЛА

Принцип метода. Белково-липидные комплексы молока преимущественно являются составными частями жировых шариков. В питьевом молоке БЛК равномерно распределяются во всем объеме. Однако при добавлении к молоку этилового спирта наблюдается процесс денатурации и коагуляции белков, который происходит за счет вытеснения полярных молекул воды и замещения их молекулами этанола. В присутствии молекул этилового спирта уменьшается растворимость белков, что обусловлено понижением диэлектрической проницаемости среды. При этом общая энергия сольватации молекул белков уменьшается. При определенной концентрации этилового спирта в среде белки утрачивают нативную конформацию, что способствует взаимодействию развернутых полипептидных цепей. Процесс образования ассоциатов и коагуляции белков ускоряется при повышении температуры среды. Агрегированные молекулы денатурированных белков выпадают в осадок. Последний отделяют от раствора центрифугированием.

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; водяная баня; центрифуга; штатив.

Посуда: колба на 100 мл — 1 шт.; пробирки — 4 шт.

Материалы и реактивы: молоко, 96%-ный раствор этилового спирта.

Ход работы. В четыре пробирки вносим по 2 мл молока, а затем в каждую из пробирок последовательно добавляем по 2, 3, 4, 5 мл 96%-ного этилового спирта (табл. 10.8).

Осаждение белково-липидных комплексов молока различными концентрациями этанола

п/п	Реактивы	Пробирки			
		1	2	3	4
1	Молоко, мл	2,0	2,0	2,0	2,0
2	96% -ный раствор этанола, мл	2,0	3,0	4,0	5,0
3	Дистиллированная вода, мл	3,0	2,0	1,0	—
4	D, усл. ед.				

После перемешивания пробирки центрифугируем в течение 10 мин при $7 \cdot 10^3 g$. Затем надосадочную жидкость из центрифужных пробирок осторожно сливаем в чистые пробирки. Измеряем светопоглощение растворов пробы против контроля при красном светофилтре (630 нм). Контролем служат пробирки с 96% -ным раствором этанола. Пробы с меньшим поглощением супернатанта можно использовать для проведения биохимических исследований.

Оформление работы. Записать наблюдаемые изменения в исследуемых пробирках. Определить концентрацию этилового спирта в пробирке, необходимую для осаждения белков и белково-липидных комплексов молока. Описать механизм осаждения белков и белково-липидных комплексов молока этанолом.

10.6. ВЫДЕЛЕНИЕ КАЗЕИНА ИЗ МОЛОКА

Принцип метода. Казеин является основным белком молока млекопитающих, относится к группе белков, называемых фосфопротеидами. В коровьем молоке содержится около 2,8–3,4% белка, на долю которого приходится до 80% казеина или 2,2–2,8% от общего содержания белков. Присутствует казеин в молоке в соединении с кальцием и фосфором. В присутствии ионов кальция вначале образуются субмицеллы казеина. Затем по мере насыщения субмицелл ионами Ca^{2+} и фосфатов субмицеллы могут сливаться, формируя мицеллы. Размер мицелл казеина может изменяться и зависит от времени года, породы и кормления животных и др. Стабильность казеиновых мицелл зависит от содержания

в молоке ионов кальция, фосфора, состава казеинов, pH молока, температуры среды. Увеличение в молоке содержания кальция, связанного с казеином, может приводить к понижению термоустойчивости казеиновых мицелл.

Казеин растворим в разбавленных растворах щелочей и в концентрированных кислотах. Однако казеин нерастворим в разбавленных кислотах, в присутствии которых он выпадает в осадок в виде творожного сгустка. Процесс ускоряется при нагревании.

Оборудование: центрифуга; водяная баня; эксикатор; аналитические весы.

Посуда: колба на 500 мл — 2 шт.; пипетка на 5 мл — 1 шт.; цилиндр на 500 мл.

Материалы и реактивы: молоко цельное; 100%-ная уксусная кислота ($\rho = 1,05 \text{ г/см}^3$); 96%-ный этиловый спирт.

Приготовление растворов. Раствор CH_3COOH готовят, растворяя 100%-ную уксусную кислоту в д. в.

Ход работы. К 100 мл цельного молока приливают 200 мл 1%-ной уксусной кислоты. После перемешивания молоко помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем осадок отделяют центрифугированием 15 мин при 10 000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок промывают 2–3 раза д. в., каждый раз центрифугируя раствор 15 мин при 10 000 об/мин. После последней промывки к осадку добавляют 5-кратный объем этилового спирта и после осаждения казеина спирт удаляют. Казеин сушат на воздухе или в эксикаторе и затем взвешивают. Выход продукта должен составить 2,0–2,5 г.

Оформление работы. Записать методику проведения опыта и определить выход продукта.

10.7. МЕТОДЫ РАСТВОРЕНИЯ ЛИПИДОВ МАСЛА

10.7.1. МЕТОДЫ РАСТВОРЕНИЯ ЛИПИДОВ СЛИВОЧНОГО МАСЛА В ЭТИЛОВОМ СПИРТЕ И ХЛОРОФОРМЕ

Принцип метода. Сливочное масло относится к пищевым продуктам животного происхождения и получается из цельного молока КРС. В составе сливочного масла

преимущественно присутствуют липиды. В состав основных компонентов сливочного масла входят: липиды — 82,5, вода — 16,0, лактоза — 0,81, белок — 0,57, минеральные вещества — 0,12%. К группе липидов относятся биогенные молекулы, нерастворимые в полярной среде, но растворимые в неполярных растворителях. Полярность среды коррелирует с величиной диэлектрической проницаемости (ϵ). Так, вода имеет значение ϵ , равное 78,5, глицерин — 42,5, этанол — 24,3, ацетон — 20,7, уксусная кислота — 6,19, этилацетат — 6,02, хлороформ — 4,7. Используя растворители различной полярности или их смеси, можно создать среду, в которой максимально растворятся компоненты сливочного масла.

Оборудование: водяная баня; центрифуга; штатив.

Посуда: колба на 100 мл — 2 шт.; пробирки центрифужные — 6 шт.; пробирки стеклянные — 6 шт.

Материалы и реактивы: масло сливочное; 96%-ный этиловый спирт, хлороформ.

Ход работы. Предварительно масло нагревали на водяной бане при температуре 50°C до образования жидкой консистенции. Затем в шесть пробирок последовательно вносят по 1 мл жидкого масла. 96%-ный раствор этанола и хлороформ добавляли к растопленному маслу согласно таблице 10.9.

Таблица 10.9

**Растворение липидов сливочного масла
в этанол-хлороформной смеси**

п/п	Реактивы	Пробирки					
		1	2	3	4	5	6
1	Масло, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2	Этанол 96%, мл	0	5,0	1,5	2,0	2,5	3,0
3	Хлороформ, мл	5,0	0	3,5	3,0	2,5	2,0
4	D, усл. ед.						

После перемешивания пробирки центрифугируют 15 мин при $7 \cdot 10^3 g$. Затем очень осторожно сливают верхний прозрачный раствор, отмечая степень растворимости

липидов в каждой из пробирок. Прозрачность растворов исследуют на ФЭКе при 605–730 нм,

Оформление работы. Записать наблюдаемые изменения в исследуемых пробирках. Определить концентрацию этанола и хлороформа в пробирке, необходимую для растворения липидов сливочного масла. Описать механизм наблюдаемого процесса.

10.7.2. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТВОРЕНИЯ ЛИПИДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА В ХЛОРОФОРМЕ И ЭТАНОЛЬНО- ХЛОРОФОРМНЫХ СМЕСЯХ

Принцип метода. Липиды растений в значительных количествах накапливаются в семенах и плодах, которые используются в производстве для получения растительных масел. Химический состав растительных масел разнообразен и в основном представлен жирными кислотами (насыщенными и ненасыщенными), нейтральными липидами, фосфо- и сфинголипидами и стероидами. Особенно богаты растительные масла ненасыщенными жирными кислотами (олеиновая, линолевая, линоленовая и арахидоновая), что обуславливает их жидкое состояние при комнатной температуре. Так, олеиновой кислоты в хлопковом масле содержится 31,0, соевом — 22,0, подсолнечном — 39,0, оливковом — 82,0, кукурузном — 24,0, льняном — 19,0%. При этом количество линолевой кислоты в хлопковом масле может быть 40,0, соевом — 49,0, подсолнечном — 46,0, оливковом — 4,0, кукурузном — 61,0, льняном — 16,0%. Растворимость компонентов масла будет определяться полярностью растворителей или их смесей. Используя неполярные растворители и их смеси, можно получить среду, в которой максимально растворяются компоненты исходного растительного масла.

Оборудование: ФЭК; водяная баня; центрифуга; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 2 шт.; цилиндр — 1 шт.; пробирки центрифужные — 8 шт.; пробирки стеклянные — 8 шт.

Материалы и реактивы: масло растительное; 96% -ный этиловый спирт; хлороформ.

Приготовление рабочих растворов. Этанол-хлороформную смесь готовят путем смешивания 96%-ного этилового спирта и хлороформа в соотношении 3:7 (3 части этанола и 7 частей хлороформа).

Ход работы. Предварительно масло нагревали на водяной бане при температуре 50°C. Затем в штатив устанавливают два ряда пробирок по 4 шт. в каждом (табл. 10.10). В пробирки первого и второго рядов последовательно вносят по 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 мл растительного масла. В первый ряд пробирок вносят по 6,0, 5,5, 5,0, 4,5 мл хлороформа, а во второй ряд добавляли по 6,0, 5,5, 5,0, 4,5 мл этанол-хлороформную смесь в соотношении 3:7 (3 части этанола и 7 частей хлороформа) (табл. 10.10).

Таблица 10.10

Растворение липидов растительного масла в хлороформе и этанол-хлороформной смеси

№ п/п	Реактивы	Пробирки			
		1	2	3	4
Первый ряд пробирок					
1	Масло, мл	1,0	1,5	2,0	2,5
2	Хлороформ, мл	6,0	5,5	5,0	4,5
3	D, усл. ед.				
Второй ряд пробирок					
1	Масло, мл	1,0	1,5	2,0	2,5
2	Этанол-хлороформная смесь, мл	6,0	5,5	5,0	4,5
5	D, усл. ед.				

После перемешивания пробирки центрифугируют 15 мин при $7 \cdot 10^3 g$. Затем анализируют растворы по степени прозрачности на ФЭКе при 605–730 нм, выявляют оптимальные условия для растворения растительного масла.

Оформление работы. Записать наблюдаемые изменения в исследуемых пробирках. Определить концентрацию хлороформа и этанолно-хлороформной смеси в пробирке, необходимую для наибольшего растворения липидов растительного масла.

10.8. АКТИВНОСТЬ ХИМОЗИНА ИЛИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО СЫЧУЖНОГО КОМПЛЕКСА

Принцип метода. Химозин (КФ 3.4.23.4) является гидролитическим ферментом, катализирующим гидролиз пептидной связи у казеинов, что обуславливает процесс свертывания молока. В механизме действия фермента проявляется специфичность, обусловленная тем, что подвергается разрыву всего лишь одна пептидная связь между фенилаланином (Фен-105) и метионином (Мет-106) в молекуле χ -казеина.

Фермент имеет молекулярную массу, равную 30 кДа, с изоэлектрической точкой при pH 4,5. Активность фермента проявляется в слабокислой среде (pH 5,0–5,3) в присутствии ионов кальция. В активном центре фермента содержится карбоксильная группа аспарагиновой кислоты. Химозин обладает низкой протеолитической активностью, но высокой молокосвертывающей активностью. Химозин способен гидролизовать казеин в составе мицелл. При этом казеин переходит в казеинат кальция, образуя створоженный сгусток.

Ферменты (пепсин и химозин) входят в единый сычужный ферментативный комплекс, в составе которого 60–70% химозина и 30–40% пепсина. Активность этих ферментов зависит от температуры. С возрастанием температуры активность ферментов увеличивается, достигая максимума при 40°C. Дальнейшее повышение температуры сопровождается денатурацией фермента и утратой ферментативной активности. При 10°C сычужный ферментативный комплекс малоактивен.

Активность ферментов выражается отношением 1 г навески к количеству свернувшегося молока в г, при 35°C в течение 40 мин при pH 6,2. Так, например, 1 г фермента активностью 100 тыс. единиц способен свертывать 100 тыс. г (100 кг) молока в течение 40 мин, при 35°C и pH 6,2.

Оборудование: термостат; pH-метр.

Посуда: пробирки — 6 шт.; колбы на 500 мл — 2 шт. и на 100 мл — 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 1 шт., на 1 мл — 1 шт., на 5 мл — 1 шт.

Реактивы: молоко коровье; образец сычужного порошка или раствор химозина 1 мг/мл в 0,1 М Na-ацетатном буфере pH 5,0.

Приготовление рабочих растворов. Раствор химозина готовят, растворяя 10 мг фермента в 10 мл 0,1 М Na-ацетатном буфере pH 5,0. Na-ацетатный буферный раствор готовят из исходных 0,1 М водных растворов CH_3COOH и CH_3COONa путем их смешивания на pH-метре до желаемой величины pH.

Ход определения. В 6 пробирок последовательно вносят 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,9 мл молока и затем в каждую пробирку по 0,1 мл 2% -ного хлорида кальция. Затем в первые 5 пробирок вносят последовательно по 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 мл фермента. После перемешивания пробирки устанавливают в термостат на 30 мин при 40°C. После этого отмечают образование молочного сгустка в каждой из пробирок.

Оформление работы. Записать наблюдаемые изменения в исследуемых пробирках. Определить эффективность образования молочного сгустка в каждой из пробирок. Описать механизм этого процесса.

10.9. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ПРИСУТСТВИЕ ПОСТОРОННИХ СОЕДИНЕНИЙ В МОЛОКЕ

Для обнаружения в молоке посторонних соединений (NaHCO_3 , NH_3 , H_2O_2 и CH_2O) используют специальные реакции, позволяющие обнаружить их присутствие за счет изменения окраски соответствующих реактивов, добавленных к молоку или молочной сыворотке.

10.9.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ СОДЫ В МОЛОКЕ

Принцип метода. Метод основан на изменении окраски раствора индикатора (бромтимолового синего) при добавлении его в молоко, содержащее карбонат или бикарбонат натрия.

Посуда: пробирка — 1 шт.; пипетка на 0,2 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: молоко коровье; 50% -ный водный раствор этанола; спиртовой раствор бромтимолового синего.

Приготовление рабочих растворов. 50% -ный водный раствор этанола; спиртовой раствор бромтимолового синего готовят путем растворения 40 мг индикатора в 100 мл 50% -ного раствора этанола.

Ход определения. В сухую пробирку наливают 5 мл исследуемого молока и осторожно по стенке добавляют 0,15 мл раствора бромтимолового синего, наслаивая на молоко. Через 10 мин наблюдают за окраской кольца на границе образовавшихся слоев. При желтой окраске сода в молоке отсутствует. Появление зеленой окраски свидетельствует о наличии следов соды в исследуемом молоке.

Оформление работы. Записать наблюдаемые изменения в исследуемой пробирке. Определить наличие следов соды в исследуемом молоке.

10.9.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ АММИАКА В МОЛОКЕ

Принцип метода. В основе метода лежит изменение цвета смеси, после добавления реактива Несслера к молочной сыворотке. Метод позволяет выявить присутствие в молоке 6–9 мг% аммиака.

Оборудование: водяная баня или термостат.

Посуда: колба на 100 мл — 1 шт.; пробирка — 1 шт.; пипетки на 10 мл — 1 шт., на 2 мл — 1 шт. и на 1 мл — 1 шт.

Реактивы: молоко коровье; 10% -ный раствор уксусной кислоты; реактив Несслера.

Приготовление рабочих растворов. 10% -ный раствор уксусной кислоты готовят из ледяной уксусной кислоты путем разбавления д. в. Реактив Несслера.

Ход определения. В колбу на 100 мл вносят 20 мл исследуемого молока, которое нагревают на водяной бане до температуры 40°C. После этого в колбу для осаждения казеина добавляют 1 мл 10% -ного раствора CH_3COOH , выдерживая ее на водяной бане в течение 10 мин. Из отстоявшегося слоя сыворотки отбирают 2 мл и переносят в пробирку, куда добавляют 1 мл реактива Несслера. После перемешивания

содержимого пробирки наблюдают за изменением окраски раствора. Окрашивание смеси в лимонно-желтый цвет свидетельствует об отсутствии в молоке аммиака, тогда как при его наличии окраска смеси становится желто-оранжевой.

Оформление работы. Записать наблюдаемые изменения в исследуемой пробирке. Определить наличие аммиака в исследуемом молоке.

10.9.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В МОЛОКЕ

Принцип метода. Реакция основана на взаимодействии H_2O_2 с KI с образованием в результате реакции йода, который, реагируя с крахмалом, дает синее окрашивание.

Посуда: термостойкий мерный стакан на 100 мл — 1 шт.; термостойкая колба на 100 мл — 1 шт.; пробирка — 1 шт.; пипетки на 10 мл — 1 шт., на 0,2 мл — 1 шт., на 0,1 мл — 1 шт.

Реактивы: молоко коровье; крахмал; KI ; раствор H_2SO_4 ; раствор KI и крахмальный раствор KI .

Приготовление рабочих растворов. Раствор серной кислоты готовят путем прибавления к дистиллированной воде серной кислоты (плотность 1,830–1,835 г/см³) в соотношении 3:1.

Раствор KI готовят, растворяя 3 г KI в 10 мл дистиллированной воды.

Крахмальный раствор KI готовят, растворяя вначале 3 г крахмала в 20 мл дистиллированной воды, а затем прибавляют к этому раствору 80 мл дистиллированной воды с температурой 100°C. После охлаждения до 20–23°C к крахмальному раствору добавляют 10 мл раствора KI . Раствор хранится при 4°C не более 5 сут.

Ход определения. Для проведения исследований в пробирку вносят 1 мл исследуемого молока, 0,05 мл раствора H_2SO_4 и 0,2 мл крахмального раствора KI . За окраской наблюдают в течение 10 мин. При появлении синего окрашивания можно говорить о присутствии перекиси водорода в молоке.

Оформление работы. Записать наблюдаемые изменения в исследуемой пробирке. Определить наличие перекиси водорода в исследуемом молоке.

10.9.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ФОРМАЛЬДЕГИДА В МОЛОКЕ

Принцип метода. Альдегиды в растворе концентрированных кислот окрашивают его в сине-фиолетовый цвет.

Посуда: пробирка — 1 шт.; пипетки на 5 мл — 2 шт.

Материалы и реактивы: молоко; раствор серной и азотной кислот.

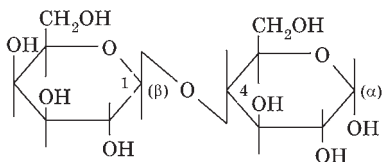
Приготовление рабочих растворов. Раствор кислот (серная и азотная кислоты) готовят путем добавления к 100 мл H_2SO_4 (плотность 1,820–1,825 г/см³) одной капли концентрированной HNO_3 (плотность 1,300 г/см³).

Ход определения. В пробирку наливают 3 мл раствора кислот и осторожно по стенке пробирки добавляют 3 мл молока путем насаивания его на раствор кислот. На границе двух жидкостей при наличии формальдегида появляется кольцо фиолетового или темно-синего цвета, а при его отсутствии кольцо имеет желтую или желто-бурую окраску.

Оформление работы. Записать наблюдаемые изменения в исследуемой пробирке. Определить наличие формальдегида в исследуемом молоке.

10.10. ВЫДЕЛЕНИЕ ЛАКТОЗЫ ИЗ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Принцип метода. Лактоза является дисахаридом, при гидролизе которого образуется глюкоза и галактоза. В составе лактозы молекулы α -D-глюкозы и β -D-галактозы связаны между собой 1,4- β -гликозидной связью.



В молоке содержится лактозы 40–50 г/л, что составляет 99,75% от общего содержания углеводов. Кроме того, в молоке может быть до 0,2% галактозы и 0,01–0,1% глюкозы. В незначительных количествах в молоке присутствуют

и другие олигосахариды: трисахариды, тетрасахариды, пентасахариды, гексасахариды и др.

Выделяют лактозу из молочной сыворотки. Для получения высокоочищенного препарата из молочной сыворотки необходимо удалить белки, минеральные вещества, пигменты, липиды и другие вещества. Для удаления белков используют методы тепловой денатурации в сочетании с кислотной коагуляцией. При температуре 90–95°C белки утрачивают свою нативную структуру и в условиях низкой кислотности среды начинают коагулировать, выпадая в осадок. Для удаления красящих веществ из сыворотки используют различные адсорбенты, а удаление избытка влаги из раствора лактозы производят в вакуум-выпарной установке при температуре 50–60°C, доводят концентрацию сухих веществ в растворе до 60–65%. Затем несколько повышают температуру раствора, чтобы получить перенасыщенный раствор молочного сахара. Понижая температуру среды, инициируют процесс кристаллизации лактозы. При этом кристаллы должны быть больших размеров и однородные по структуре. При проведении кристаллизации необходимо периодически перемешивать раствор для предупреждения срастания кристаллов. В процессе кристаллизации лактозы образуется также и меласса, которую отделяют с помощью центрифугирования. После этого лактозу сушат при температуре 65–70°C до содержания влаги в 1,5%. Готовый продукт должен представлять собой кристаллический порошок белого или слабо-желтого цвета, с содержанием лактозы до 99,1%, влаги 0,05%, при титруемой кислотности 10°Т, с массовой долей золы в 0,1%.

Оборудование: центрифуга; холодильник; водяная баня; эксикатор,

Посуда: термостойкий химический стакан на 500 мл; колба на 500 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы: молочная сыворотка.

Ход работы. В термостойкий химический стакан вливают 100 мл молочной сыворотки, который помещают на 30 мин в водяную баню при 90–95°C. Осадок удаляют центрифугированием 15 мин при 6000 об/мин. Надосадочную жидкость выливают в колбу, которую помещают в вакуум-

выпарную установку при 50–60°C. Удаление влаги производят до уменьшения объема раствора на 1/3. Затем колбу охлаждают и помещают в холодильник при + 4°C на 6 ч. Во время охлаждения раствор необходимо перемешивать. Выпавшие кристаллы лактозы отделяют центрифугированием 15 мин при 7000g. Лактозу сушат в эксикаторе до содержания влаги в 1,5%, а затем взвешивают.

Метод расчета. Содержание лактозы (A , г/л) молочной сыворотки определяют по следующей формуле:

$$A = \frac{m_0 - m_{\text{воды}}}{V},$$

где m_0 — масса лактозы после сушки, г; $m_{\text{воды}}$ — масса воды, г; V — объем молочной сыворотки.

Оформление работы. Записать методику проведения опыта и определить выход продукта.

10.11. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МОЛОКЕ

Принцип метода. В основе метода используется реакция аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом, который имеет синюю окраску с максимумом поглощения при pH = 7,0 на 615 нм ($\epsilon = 18 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) или розовую окраску в кислых pH.

В результате реакции аскорбиновой кислоты с 2,6-ДХФИФ происходит восстановление аскорбиновой кислотой 2,6-дихлорфенолиндофенолом, при этом раствор становится бесцветным. Величины молярных коэффициентов поглощения 2,6-дихлорфенолиндофенолом сильно зависят от pH среды. Поэтому реакцию необходимо проводить только в определенных условиях среды, при фиксированном значении pH.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; центрифуга.

Посуда: пробирки — 13 шт.; пипетки на 1 мл — 3 шт. и 5 мл — 1 шт.; колбы на 1 л — 1 шт., 0,5 л — 2 шт., 50 мл — 1 шт., 100 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы. Молоко; 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 37 мкМ раствор 2,6-дихлорфенолиндо-

фенола (0,1 мг/мл), 0,28 мМ раствор аскорбиновой кислоты (0,05 мг/мл).

Приготовление рабочих растворов. Растворы 2,6-дихлорфенолиндофенола и аскорбиновой кислоты готовят, растворяя по 5 мг навески в 50 и 100 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера (рН 7,0) соответственно. Перед исследованием белково-липидные комплексы молока осаждают 96% -ным этанолом.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используют два ряда пробирок по 5 шт. в каждом и одна пробирка для контроля. Первый ряд используется для разбавления исходного раствора аскорбиновой кислоты с исходной концентрацией 50 мкг/мл, как показано в таблице 10.11.

Таблица 10.11

**Приготовление растворов аскорбиновой кислоты
для построения калибровочного графика**

Пробирки	Исходный раствор аскорбиновой кислоты, мл	Раствор 96%-ного этанола, мл	Концентрация аскорбиновой кислоты в пробирке, мкг/мл	Светопоглощение D, усл. ед.
1	0,5	2,0	1,25	
2	1,0	1,5	2,50	
3	1,5	1,0	3,75	
4	2,0	0,5	5,00	
5	2,5	—	6,25	
Контроль	—	0,5	—	

Второй ряд пробирок служит для проведения качественной реакции. После проведения разбавления из каждой пробирки первого ряда отбирают по 0,5 мл калибровочного раствора и вносят последовательно в расположенные напротив пробирки второго ряда. Затем во все пробирки второго ряда последовательно добавляют по 3,0 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, рН 7,0, и 0,5 мл 37 мкМ 2,6-дихлорфенолиндофенола. После перемешивания пробирки второго ряда выдерживают 10 мин (время проведения реакции).

Контролем служит проба, в которую добавляют по 0,5 мл 96% -ного этанола и 3,5 мл Na-фосфатного буфера, рН 7,0.

Измерение поглощения проводят при 615 нм, записывая показания в таблицу. Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге, откладывая в координатах (D , C) изменения поглощения (ось ординат) от концентрации аскорбиновой кислоты (ось абсцисс).

Ход определения. В центрифужную пробирку последовательно вносили 1,0 мл молока и 1,0 или 2,0 мл 96% -ного этанола. После перемешивания пробирки центрифугировали в течение 15 мин при 7000g. Затем к 3,0 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, pH 7,0, прибавляли по 0,5 мл супернатанта и 0,5 мл 37 мкМ 2,6-дихлорфенолиндифенола. После перемешивания пробу выдерживали в течение 10 мин для проведения реакции.

Контролем служит проба, в которую добавляют по 0,5 мл супернатанта и 3,5 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, pH 7,0.

Измерение светопоглощения растворов проводят при 615 нм.

Метод расчета. Вычисление содержания антиоксидантов (мг/мл) проводят по формуле

$$AK = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot V_4},$$

где C — концентрация аскорбиновой кислоты, определенная по калибровочному графику, мг/мл; V_1 — объем пробы, мл; V_2 — объем молока, вносимого в пробирку, мл; V_3 — общий объем молока после разбавления, мл; V_4 — объем молока до разбавления, мл.

Оформление работы. Записать методику, построить на миллиметровке калибровочный график и с его помощью определить содержание аскорбиновой кислоты в исследуемой пробе молока. Сравнить полученные величины с литературными данными.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие физические воздействия могут повлиять на свойства молока?
2. Как изменяется состав молока при его охлаждении и замораживании?

3. Перечислить основные изменения в составе молока при нагревании.

4. Какие изменения возникают в составе молока при механических воздействиях?

5. Назвать основные кисломолочные продукты, получаемые из молока.

6. Перечислить технологические свойства молока.

7. Назвать технологические свойства молока, предназначенного для производства сыра.

8. Указать особенности в химическом составе молока, предназначенного для производства масла.

9. Описать свойства молока как высококачественного биологического продукта.

10. Охарактеризовать качественный состав молока, предназначенного для маслоделия.

11. Рассказать о структурно-механических свойствах масла.

12. Описать биохимические и химические изменения в составе масла в процессе хранения.

13. Перечислить основные пороки масла.

14. Какие факторы определяют структуру и консистенцию мороженого?

15. Указать пороки мороженого.

16. Рассказать об основных макро- и микроэлементах молока.

17. Назвать основные компоненты белково-липидных комплексов молока.

18. Раскрыть роль кальция в образовании мицелл казеина.

19. Указать основные условия денатурации белков.

20. Как может изменяться состав и свойства молока при различных физических воздействиях?

21. Рассказать о ферментах, входящих в состав молока.

22. Рассказать о строении и механизме действия ферментов сычуга.

23. Объяснить влияние температуры и pH на активность химозина и пепсина.

24. Раскрыть роль карбоновых кислот в деятельности молочной железы.

25. Написать структурные формулы основных липидов молока.

26. Назвать естественные антиоксиданты масла.

27. Перечислить причины прогоркания масла.

28. Описать окислительные процессы, происходящие во время хранения масла.

29. Описать процессы, способствующие образованию штаффа.

30. Рассказать об основных моно- и дисахаридах молока.

31. Какие витамины определяют в молоке?

32. Рассказать об особенностях определения аскорбиновой кислоты в молоке.

Мышцы являются частью опорно-двигательной системы, обеспечивающей сокращение конечностей, движение органов и систем и за счет этого работу и функционирование животных организмов. Мышцы поддерживают определенную ориентацию и перемещение тела в пространстве. Осуществляют дыхательные движения грудной клетки и диафрагмы, глотание, движение глаз, работу внутренних органов (сердца, кишечника, желудка и др.). Основу мышц составляют мышечные ткани, которые относятся к специализированным тканям, предназначенным для осуществления двигательной активности, в основе действия которых используется сократительная способность белков. Мышечные ткани подразделяют на гладкие (неисчерченные), поперечно-полосатые (исчерченные) и специализированные сократительные ткани. Поперечно-полосатая мышечная ткань подразделяется на скелетную и сердечную. К специализированным сократительным тканям относят миоэпителиальные клетки молочной, потовой и слюнных желез.

Химический состав мышц колеблется в зависимости от вида и возраста животного, типа и функционального состояния мышц и ряда других факторов. Химический состав основных биогенных соединений зависит от типа ткани, а состав мышечной ткани и от вида животного. Кроме того, химический состав мышц обусловлен их специализированной деятельностью, в основе которой заложены механизмы сокращения. В животном организме мышечная ткань составляет около 38–45% от общей массы. При этом до 70% приходится на скелетные мышцы, в которых содержание воды может составлять от 70 до 80%. Белки в сухом остатке

составляют 17–21% от общей массы мышц. Основными компонентами мышечной ткани являются белки миофибрилл, саркоплазмы и сарколеммы. Последняя содержит в своем составе белки соединительной ткани коллаген и эластин. В составе мышц белки: миозин, актин, тропомиозин, тропонин, Na^+ , K^+ -АТФазы, Ca^{2+} -АТФазы и др. Кроме того, в состав мышечной ткани входят азотосодержащие соединения: креатин, креатинфосфат, креатинин, мочеви́на, карнозин, анзерин, холин, аминокислоты, нуклеозиды, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты и др. Соединения, не содержащие азот, в основном представлены углеводами и липидами (гликоген, глюкоза, фруктоза, жирные кислоты, холестерин, триацилглицериды, фосфолипиды и др.). В составе мышечной ткани белки сарколеммы составляют 18–20, саркоплазматические — 30–35, а миофибрилл — 40–45%. Основными белками мышц служат миозин и актин, содержание которых составляет соответственно 60–70% и 20–25%. Среди азотсодержащих соединений в мышцах содержатся креатин (0,2–0,5%), карнозин (0,1–0,25%), анзерин (0,09–0,20%), карнитин (0,015–0,020%), глутаминовая кислота (0,05–0,08%), глутамин (0,08–0,10%), мочеви́на (0,015–0,025%), аминокислоты (0,7–0,8%), аденозинтрифосфорная кислота (0,12–0,15%). Доля минеральных веществ в мышечной ткани может составлять до 1,5% от общего состава. Среди ионов в мышечной ткани КРС держаться, мг%: K^+ — 340, Na^+ — 65, Mg^{2+} — 19, Ca^{2+} — 10. В мышечной ткани КРС, свиней и баранов содержится одинаковое количество витаминов. Так, содержание рибофлавина составляет 0,13–0,17, никотиновой кислоты — 3,9–6,7, фолиевой кислоты — 0,013–0,026, биотина — 3,4–4,6, тиамина 0,74–0,94, витамина В₆ — 0,42–0,50, пантотеновой кислоты — 0,7–2,0 мг%.

Липиды, входящие в состав мышц, представлены нейтральными липидами, фосфолипидами, стероидами и жирными кислотами. Качественный спектр жирных кислот в основном представлен соединениями с четным числом атомов углерода, чаще всего от 14 до 20. Из насыщенных жирных кислот в мышцах преобладают пальмитиновая и стеариновая кислоты.

11.1. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Принцип метода. Выделение митохондрий скелетных мышц проводят в холодной комнате при 0°C. Ткань измельчают ножницами и гомогенизируют до однородной массы. Последовательное центрифугирование позволяет избавиться от неразрушенных клеток, ядер и миофибрилл. Митохондрии очень чувствительны к замораживанию, которое может привести к их разрушению. Поэтому все процедуры проводят, избегая промерзания растворов. Выделение митохондрий необходимо производить быстро и использовать их в работе сразу же.

Оборудование: холодильная комната; гомогенизатор; аналитические весы; центрифуга; ножницы.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 100 мл — 1 шт.; стаканы на 50 мл — 2 шт., на 100 мл — 1 шт.; пипетка на 5 мл — 1 шт.; чашка Петри.

Материалы и реактивы: скелетная мышечная ткань; марля; 0,05 М *трис*-HCl буфер, pH 7,4, содержащий 0,1 М KCl и 1 мМ MgCl₂; 2% -ный раствор сывороточного альбумина; бычий сывороточный альбумин (БСА).

Приготовление растворов. Раствор *трис*-HCl буфера готовят, смешивая 0,05 М растворы триса и HCl на pH-метре до pH 7,4, добавляя KCl (7,46 мг/мл) и MgCl₂ (0,0953 мг/мл).

Раствор альбумина готовят, растворяя 2 г БСА в 98 мл д. в.

Ход работы. Скелетную мышечную ткань (10 г) вначале на чашке Петри освобождают от жира, сухожилий и нервов, а затем измельчают ножницами и гомогенизируют. Гомогенат переносят в охлажденный при 0°C стакан, в который после взвешивания добавляют 0,05 М *трис*-HCl буфер, pH 7,4, содержащий 0,1 М KCl и 1 мМ MgCl₂ в соотношении 1:4 (на 1 г ткани добавляют 4 мл буфера). Смесь еще раз гомогенизируют до однородной массы. Гомогенат центрифугируют при 0°C 7 мин при 600g. Осадок, содержащий неразрушенные клетки, ядра и миофибриллы, отбрасывают, а надосадочную жидкость центрифугируют 5 мин при 2000g для полного удаления миофибрилл. Супернатант

фильтруют через 4 слоя марли и центрифугируют 10 мин при 9000g.

Осадок дважды промывают 0,05 М *трис*-HCl буфером, удаляя верхний рыхлый слой, содержащий примесь саркоплазматического ретикулума. Затем к осадку добавляют 0,05 М *трис*-HCl буфер из расчета 0,05 мл на 2 г ткани для полярографических исследований или 0,4 мл — для манометрических.

Осадок суспендируют с помощью пипетки и переносят в стакан, где митохондрии осторожно растирают пестиком до гомогенного состояния.

К суспензии добавляют 2% -ный раствор альбумина до конечной концентрации 0,1% и хранят при 0°C.

Оформление работы. Записать методику и составить схему дифференцированного центрифугирования, используемую при выделении митохондрий.

11.2. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Принцип метода. Выделение митохондрий сердечной мышечной ткани лучше проводить в холодной комнате при 0°C. Ткань измельчают ножницами и гомогенизируют до однородной массы. Промывают ткань охлажденным до 0°C 0,12 М раствором KCl. Для выделения митохондрий используется 0,01 М буфер *трис*-HCl, содержащий 0,3 М сахарозу и 0,01 М ЭДТА. Последняя связывает ионы металлов, подавляя протекание свободнорадикальных реакций, тогда как сахароза обладает консервирующим эффектом для митохондрий. Последовательное центрифугирование позволяет избавиться от неразрушенных и частично разрушенных клеток, ядер и миофибрилл.

Оборудование: аналитические весы; центрифуга; гомогенизатор; ножницы.

Посуда: колбы на 500 мл — 3 шт., на 100 мл — 1 шт.; пипетка на 5 мл — 1 шт.; чашка Петри; пробирки.

Материалы и реактивы: сердце; фильтровальная бумага; 0,12 М раствор KCl; 0,01 М *трис*-HCl буфер, pH 7,5, содержащий 0,3 М сахарозы и 0,01 М ЭДТА.

Приготовление растворов. Раствор *трис*-HCl буфера готовят, смешивая 0,01 М растворы триса и HCl на рН-метре до рН 7,5, добавляя сахарозу (102,7 мг/мл) и ЭДТА (2,9 мг/мл).

Раствор KCl (9 мг/мл) готовят, растворяя навеску в б. в.

Ход работы. Сердце помещают в охлажденный до 0°C раствор 0,12 М KCl, хорошо промывают несколько раз, удаляют сосуды, соединительную ткань и жир. Вскрывают желудочки и удаляют сгустки крови. Ткань еще раз ополаскивают 0,12 М раствором KCl, помещают в чашку Петри и обсушивают фильтровальной бумагой. После взвешивания сердечную мышечную ткань (5 г) измельчают и гомогенизируют. К гомогенату добавляют 0,01 М буфер *трис*-HCl, содержащий 0,3 М сахарозы и 0,01 М ЭДТА, в соотношении 1:10 (на 1 г ткани 10 мл буфера). Смесь еще раз гомогенизируют до однородной массы. Гомогенат центрифугируют при 0°C 7 мин при 600g. Осадок, содержащий неразрушенные клетки, ядра и миофибриллы, отбрасывают, а надосадочную жидкость центрифугируют 15 мин при 11 000g. Надосадочную жидкость сливают, а осадок, содержащий митохондрии, растирают стеклянной палочкой в 2 мл 0,01 М буфера *трис*-HCl, содержащего 0,3 М сахарозу и 0,01 М ЭДТА. К суспензии добавляют еще 40 мл 0,01 М *трис*-HCl буфера и вновь центрифугируют 15 мин при 11 000g. К осадку добавляют 2 мл 0,01 М *трис*-HCl буфера, ополаскивая поверхность осадка. Жидкость сливают, плотный осадок суспендируют в 1,5 мл 0,01 М буфера и хранят при 0°C.

Оформление работы. Записать последовательность выполнения исследований и отметить особенности в методике выделения митохондрий из сердечной мышцы.

11.3. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Принцип метода. Основу мышц составляют мышечные ткани, которые относятся к специализированным тканям, предназначенным для осуществления двигательной

активности, в основе действия которых используется сократительная способность белков миофибрилл (актина, миозина, тропонина и тропомиозина). При этом миофибриллы окружены саркоплазмой, в состав которой входят сократительные белки, органеллы (ядра, митохондрии), включения, гиалоплазма.

Белки саркоплазмы хорошо растворяются в воде или в солевых растворах низкой концентрации, а для экстракции белков миофибрилл используют 0,7 М раствор KCl, так как они плохо растворяются в воде. Однако присутствие в растворе KCl мешает определению белка по методу Лоури, поэтому от хлорида калия избавляются путем осаждения белков с помощью ТХУ.

Оборудование: аналитические весы; ножницы; гомогенизатор; центрифуга; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетка на 10 мл — 1 шт.; чашка Петри; стаканы.

Материалы и реактивы: мышечная ткань; 0,5 М раствор хлорида калия; 0,1 М раствор NaOH; 0,6 М раствор ТХУ.

Приготовление растворов. Растворы KCl (52 мг/мл), NaOH (4 мг/мл) и ТХУ (98 мг/мл) готовят, растворяя соответствующие навески в воде.

Ход работы. Мышечную ткань (2 г) измельчают ножницами и гомогенизируют при 0°C до однородной массы. В гомогенат добавляют 0,7 М раствор хлорида калия в соотношении 1:5 (на 1 г мышц 5 мл раствора KCl). После перемешивания гомогенат центрифугировали 15 мин при 2000g. Осадок, содержащий неразрушенные и частично разрушенные клетки, волокна соединительной ткани, отбрасывают, а к супернатанту добавляют 0,6 М раствор ТХУ в соотношении 1:2 (на 1 мл супернатанта 2 мл раствора ТХУ). После перемешивания смесь центрифугируют 10 мин при 2000g. Надосадочную жидкость удаляют, а к осадку добавляют 10 мл 0,1 М раствора NaOH. После растворения осадка определяют содержание белка с помощью биуретовой реакции или метода Лоури.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта, определить концентрацию белка в растворе.

11.4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА МИОГЛОБИНА МЫШЦ

Принцип метода. Очистку миоглобина начинают с экстракции его из разрушенных клеток мышечных тканей и выделения функционального белка в раствор. Для этого мышцы измельчают ножницами, а затем гомогенизируют. Все операции проводят при 0°C. Полученный гомогенат центрифугируют с целью удаления неразрушенных клеток и ядер. Присутствующий в супернатанте миоглобин осаждают сульфатом аммония, который способен при достижении 70%-ной концентрации осадить более 90% миоглобина. Осадок растворяют в буфере и диализуют. Затем раствор миоглобина пропускают через колонку с КМ-целлюлозой. Элюцию проводят, используя ступенчатый градиент 0–0,3 М раствора KCl в элюирующем буфере. Фракции с миоглобином объединяют и лиофилизируют.

Оборудование: центрифуга; термостат; рН-метр; весы аналитические; спектрофотометр с проточной кюветой или Uvicord (LKB, Швеция); коллектор фракций; лиофильная сушка; прибор для ультрафильтрации белков.

Посуда: колбы на 500 мл — 2 шт., на 1 л — 3 шт.; пипетка на 5 мл; хроматографическая колонка (2,5×30 см); стаканы на 1 л.

Материалы и реактивы: мышечная ткань; диализный мешочек; фильтровальная бумага; КМ-целлюлоза; 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,4, содержащий 1 мМ раствор ЭДТА; 0,3 М раствор KCl; 0,15 М раствор NaCl.

Приготовление растворов. Фосфатный буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 путем их смешивания на рН-метре до рН 7,4, с добавлением ЭДТА (0,37 мг/мл).

Растворы KCl (22,4 мг/мл) и NaCl (8,8 мг/мл) готовят, растворяя соответствующие навески в д. в.

Ход работы. Замороженную мышечную ткань (0,1–0,2 кг) оттаивают 15–18 ч при 4°C. Затем промывают 0,15 М раствором NaCl, удаляют жир и соединительную ткань и взвешивают. Мышцы измельчают ножницами и гомогенизируют при 0°C до однородной массы. В гомогенат добавляют

0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 1 мМ ЭДТА, в соотношении 1:5 (на 1 г мышц 5 мл буфера). После перемешивания гомогенат центрифугировали 15 мин при 2000g. Осадок повторно экстрагируют половинным объемом буфера в течение 5 мин и вновь центрифугируют. Супернатанты объединяют и добавляют небольшими порциями $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 70%-ного насыщения (472 г на 1 л супернатанта). Через 30–40 мин после добавления последней порции $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ смесь центрифугируют 30 мин при 10 000g (+4°C).

Осадок растворяют в минимальном объеме 0,1 М Na-фосфатного буфера, pH 7,4. Затем раствор ставят на диализ при +4°C против 1 л того же буфера. Во время диализа буфер меняют 2–3 раза. Осадок, выпавший во время диализа, удаляют.

Хроматография миоглобина на КМ-целлюлозе. Раствор белка наносится на колонку (2,5×30 см) с КМ-целлюлозой. Элюцию проводят в линейном градиенте 0,1 М Na-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0–0,3 М раствор KCl. Скорость элюции — 50 мл/ч. Собирают фракции по 9 мл. Фракции, в которых обнаружен миоглобин, объединяют и прописывают спектр. Для этого в спектрофотометрическую кювету вносят 3,0 мл раствора миоглобина. Спектры поглощения миоглобина записывают на спектрофотометре путем сканирования длин волн с 700 до 250 нм, со скоростью 100 нм/мин. Контролем служит кювета с 0,1 М Na-фосфатным буфером, pH 7,4.

Метод расчета. Концентрацию миоглобина (C_{Mb} , ммоль/л) определяют по следующей формуле:

$$C_{\text{Mb}} = \frac{dD}{\varepsilon \cdot l},$$

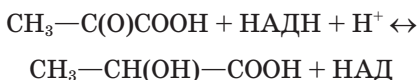
где dD — светопоглощение раствора миоглобина при 409 нм, усл. ед.; ε — коэффициент молярного поглощения ($\varepsilon_{409} = 164 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); l — ширина кюветы, см.

Кроме того, определяют содержание белка с помощью биуретовой реакции или метода Лоури. После этого раствор с миоглобином концентрируют с помощью ультрафильтрации, а затем лиофилизируют.

Оформление работы. Записать методику очистки миоглобина, нарисовать спектры поглощения миоглобина, определить выход функционального белка и степень его чистоты.

11.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ С ПОМОЩЬЮ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Принцип метода. Пировиноградная кислота служит субстратом лактатдегидрогеназы, которая катализирует реакцию ее восстановления до лактата. В реакции участвует НАДН, окисляющийся при участии ЛДГ до НАД. При этом количество использованного в реакции пирувата эквивалентно количеству окисленного НАДН, изменение концентрации которого регистрируют при 340 нм.



Оборудование: спектрофотометр; рН-метр; центрифуга; аналитические весы.

Посуда: колбы на 500 мл — 2 шт., на 100 мл — 3; пипетки на 0,1 мл — 2 шт., 0,2 — 1 шт., 1,0 мл — 1 шт., 2,0 мл — 2 шт., 5,0 мл — 1 шт.; центрифужные пробирки.

Материалы и реактивы: мышечная ткань; 0,6 М раствор хлорной кислоты; 5 М раствор K_2CO_3 ; 0,5 М триэтаноламинный буфер с 5 мМ ЭДТА, рН 7,6; 6 мМ раствор НАДН; препарат на продажу — лактатдегидрогеназы.

Приготовление рабочих растворов. Раствор HClO_4 готовят перед использованием путем разбавления концентрированной хлорной кислоты. Растворы K_2CO_3 (495,5 мг/мл) и НАДН (4 мг/мл) готовят, растворяя навески на бидистилляте. Буферный раствор готовят из исходных 0,5 М растворов триэтаноламина и HCl путем их смешивания на рН-метре до рН 7,6, а затем добавляют в буфер ЭДТА (1,46 мг/мл).

Получение супернатанта с пировиноградной кислотой. В центрифужную пробирку вносят 2 мл 0,6 М хлорной кислоты и 0,5 г замороженной мышечной ткани. Смесь

перемешивают и добавляют 2,5 мл HClO_4 до общего соотношения 9:1 (9 мл HClO_4 на 1 г ткани). После перемешивания смесь оставляют при 0°C на 15 мин для осуществления полной экстракции пирувата. После этого центрифугируют 10 мин при $3 \cdot 10^3 g$. Супернатант осторожно сливают и для удаления избытка кислоты добавляют 0,2 мл 5 М раствора K_2CO_3 . Пробу перемешивают и оставляют на 10 мин во льду для полного осаждения перхлората калия. После этого осадок отделяют центрифугированием 10 мин при $3 \cdot 10^3 g$, а супернатант нагревают до комнатной температуры и используют для проведения ферментативной реакции.

Ход определения. В две кюветы (контроль и опыт) вносят по 1,2 мл триэтаноламинового буфера и по 0,8 мл супернатанта. Пробу перемешивают и одну из них устанавливают в кюветное отделение спектрофотометра, считывая показания прибора. Затем в опытную кювету вносят 0,05 мл раствора НАДН и после перемешивания измеряют исходное значение поглощения раствора (D_1). После этого к пробе добавляют 0,05 мл препарата лактатдегидрогеназы, перемешивают и через 5–10 мин после прекращения ферментативной реакции, характеризующейся прекращением изменения поглощения при 340 нм, измеряют величину D_2 . Чтобы учесть изменение поглощения пробы, вызванное добавлением фермента, во вторую кювету (контроль) добавляют 0,05 мл препарата фермента, перемешивают и сразу измеряют поглощение D_3 .

Метод расчета. Содержание пировиноградной кислоты (мкмоль на 1 г сухой массы) рассчитывают по формуле

$$C = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_2}{\epsilon \cdot P \cdot V_3},$$

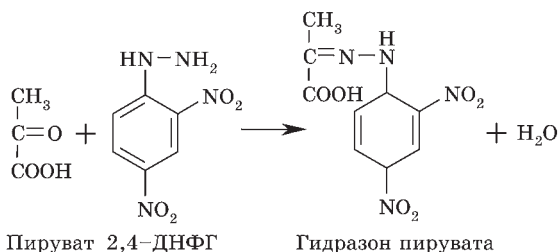
где dD — изменение поглощения пробы в ходе ферментативной реакции: $(D_1 - D_2) - (D_3 - D_2)$; V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 — конечный объем пробы в кювете, мл; ϵ — коэффициент молярного поглощения НАДН ($6,22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$); V_3 — объем супернатанта, вносимый в кювету, мл; P — навеска ткани, г.

Оформление работы. Записать методику проведения опыта, определить содержание пировиноградной кислоты

в исследуемой пробе и описать роль пирувата в метаболических процессах клеток.

11.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ С ПОМОЩЬЮ 2,4-ДИНИТРОФЕНИЛГИДРАЗИНА

Принцип метода. Пировиноградная кислота (ПВК) при взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) в кислой среде образует 2,4-динитрофенилгидразон пировиноградной кислоты.



В щелочной среде гидразон пирувата окрашивает раствор в желто-оранжевый цвет, интенсивность которого пропорциональна содержанию пировиноградной кислоты.

Оборудование: аналитические весы; гомогенизатор; центрифуга; ФЭК; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт.; пипетки на 1 мл — 6 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: мышечная ткань; 96% -ный этиловый спирт; концентрированная HCl; 0,1% -ный раствор 2,4-ДНФГ; 2,5% -ный спиртовой раствор КОН; раствор пирувата; 5% -ный раствор ТХУ.

Приготовление растворов. Раствор пирувата (50 мкг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в. Раствор 2,4-ДНФГ готовят, растворяя навеску в концентрированной HCl. Раствор КОН готовят, растворяя навеску в 96% -ном этиловом спирте.

Приготовление супернатанта. 3 г мышечной ткани мелко измельчают ножницами и гомогенизируют до однородной массы. Гомогенат помещают в центрифужную пробирку

и центрифугируют 15 мин при 7000g. Затем в чистую центрифужную пробирку отбирают 1 мл супернатанта 1 и добавляют равный объем 5% -ного раствора ТХУ. Содержимое пробирки перемешивают и центрифугируют 15 мин при 7000g. Супернатант 2 в дальнейшем используют для определения содержания пировиноградной кислоты.

Построение калибровочного графика. В семь пробирок последовательно вносят по 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 мл стандартного раствора пировиноградной кислоты, содержащего 50 мкг пировиноградной кислоты в 1 мл, и д. в., как показано в таблице 11.1.

Таблица 11.1

Данные к построению калибровочного графика для определения содержания пировиноградной кислоты

№ пробирки	Объем ПВК, мл	Объем д. в., мл	Содержание ПВК, мкг	Светопоглощение D , усл. ед.
1 (контроль)	—	1,0	—	
2	0,1	0,9	5,0	
3	0,2	0,8	10,0	
4	0,4	0,6	20,0	
5	0,6	0,4	30,0	
6	0,8	0,2	40,0	
7	1,0	—	50,0	

Во все пробирки вносят по 1,0 мл 2,5% -ного раствора КОН и после перемешивания добавляют 0,5 мл 0,1% -ного раствора 2,4-ДНФГ. Снова перемешивают содержимое пробирок и оставляют на 15 мин при комнатной температуре. Измеряют светопоглощение растворов на ФЭК при 465 нм против контроля с д. в. Полученные значения поглощения записывают в таблицу.

Калибровочный график строят, откладывая по оси ординат значения светопоглощения растворов (D , усл. ед.), а на оси абсцисс — соответствующее ей содержание пировиноградной кислоты (C , мкг). График используют для определения содержания пировиноградной кислоты в исследуемой пробе.

Ход работы. В две пробирки (опыт и контроль) вносят соответственно 1 мл супернатанта 2 и 1 мл д. в. После перемешивания в обе пробирки добавляют по 1,0 мл 2,5% -ного раствора КОН и по 0,5 мл 0,1% -ного раствора 2,4-ДНФГ. Снова перемешивают содержимое пробирок и оставляют на 15 мин при комнатной температуре. Измеряют светопоглощение растворов на ФЭК при 465 нм против контроля.

Метод расчета. Содержание пировиноградной кислоты (мкг/г влажной массы) в исследуемой пробе определяют по следующей формуле:

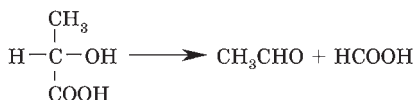
$$C_{\text{ПВК}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot V \cdot V_1}{P \cdot V_2 \cdot V_3},$$

где $C_{\text{ст}}$ — содержание пировиноградной кислоты, определенное по калибровочному графику, мкг; V — объем гомогената, мл; V_1 — общий объем супернатанта 2, мл; V_2 — объем супернатанта 1, мл; V_3 — объем супернатанта 2, вносимого в пробирку, мл; P — навеска ткани, г.

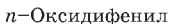
Оформление работы. Записать условия проведения опыта, построить калибровочный график и определить содержание пировиноградной кислоты в исследуемой пробе.

11.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ С ПОМОЩЬЮ *n*-ОКСИДИФЕНИЛА

Принцип метода. При нагревании раствора минеральных кислот с молочной кислотой происходит разложение лактата на ацетальдегид и муравьиную кислоту:



В дальнейшем ацетальдегид взаимодействует с двумя молекулами *n*-оксидифенила. В результате образуется окрашенное соединение диоксифенилэтан.



Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы; центрифуга; водяная баня; термостат; штатив.

Материалы и реактивы: гомогенат мышечной ткани; 0,25 мМ раствор молочной кислоты; 1,5%-ный раствор *l*-оксидифенила; 5%-ный раствор NaOH; концентрированная H_2SO_4 ($\rho = 1,84 \text{ г/см}^3$); 20%-ный раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 4%-ный раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; CaO (порошок); 0,9%-ный раствор NaCl; 10%-ный раствор CCl_3COOH .

Осаждение белков. Навеску замороженной и растертой мышечной ткани 0,5 г помещают в центрифужную пробирку с охлажденным раствором 10%-ной ТХУ так, чтобы соотношение ткань — кислота составляло 1:10. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и ставят для экстракции на лед на 20 мин. После этого пробирку центрифугируют 15 мин при 7000*g*.

11.7. Определение содержания молочной кислоты

20%-ного раствора медного купороса, доводят объем до 5 мл, добавляют 0,5 г СаО и тщательно перемешивают. Через 30 мин пробирку центрифугируют 15 мин при 7000g, а затем 0,5 мл супернатанта отбирают в опытную пробирку. В стандартную и контрольную пробирки вносят соответственно по 0,5 мл 0,25 мМ раствора молочной кислоты и 0,9%-ный раствор NaCl. Остальные растворы вносят в пробирки, как показано в таблице 11.2.

Таблица 11.2

Реактивы и порядок их внесения в пробирки при определении содержания молочной кислоты в биологических тканях

Реактивы	Пробирки		
	опыт	стандарт	контроль
Супернатант, мл	0,5	—	—
0,25 мМ раствор молочной кислоты, мл	—	0,5	—
0,9%-ный раствор NaCl, мл	—	—	0,5
4%-ный раствор CuSO ₄ , мл	0,05	0,05	0,05
Концентрированная H ₂ SO ₄ , мл	3,0	3,0	3,0

Перед внесением 4%-ного раствора CuSO₄ пробирки помещают в ледяную воду, а затем растворы медленно перемешивают и добавляют в каждый по 3 мл концентрированной серной кислоты. Пробирки ставят в кипящую водяную баню на 5 мин. После этого пробирки охлаждают до 20°C в холодной воде и затем добавляют в каждую по 0,05 мл 1,5%-ного раствора *n*-оксидифенила. Осторожно перемешивают растворы и помещают на 30 мин в термостат при 30°C. Затем пробирки погружают точно на 90 с в кипящую водяную баню, охлаждают до комнатной температуры. Измеряют светопоглощение опытной и стандартной проб на спектрофотометре при 574 нм против контроля.

Метод расчета. Содержание молочной кислоты (мг/г влажной массы) определяют по следующей формуле:

$$C_{\text{опыт}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot D_{\text{оп}} \cdot V_1 \cdot V_2}{D_{\text{ст}} \cdot P \cdot V_3},$$

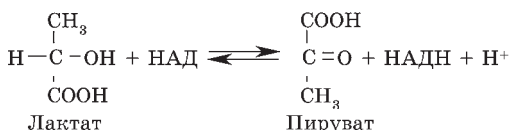
где $D_{\text{оп}}$ — светопоглощение опытной пробы, усл. ед.;
 $D_{\text{ст}}$ — светопоглощение стандартной пробы, усл. ед.;

$C_{\text{ст}}$ — концентрация молочной кислоты в стандартной пробе, мг/мл; V_1 — объем гомогената, мл; V_2 — общий объем в пробирке, мл; V_3 — объем вносимой пробы в пробирку, мл; P — навеска ткани, г.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта и значение определенной концентрации молочной кислоты в исследуемой пробе.

11.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В БИОГЕННЫХ ТКАНЯХ ЭНЗИМАТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Для определения содержания молочной кислоты в биологических тканях используется лактат-дегидрогеназа, катализирующая обратимо реакцию окисления молочной кислоты до пировиноградной. В реакции участвует НАД, который восстанавливается до НАДН.



Для протекания реакции используется гидразин-глициновый буфер, pH 9,5. Образовавшийся в результате реакции НАДН регистрируют при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Содержание молочной кислоты в печени крысы составляет 1,9; в сердце — 2,0; в почках — 1,7 мкмоль/г сухой массы.

Оборудование: спектрофотометр; аналитические весы; центрифуга; водяная баня.

Посуда: колбы на 100 мл — 2 шт., на 500 мл — 2 шт., на 1 л — 1 шт.; пипетки на 0,1 мл — 1 шт., на 0,2 мл — 3 шт., на 1 мл — 1 шт., 2 мл — 1 шт., 5 мл — 1 шт.; пробирки.

Материалы и реактивы: гомогенат мышечной ткани; 0,6 М раствор HClO_3 ; 5 М раствор K_2CO_3 ; 0,2% -ный раствор натриевой соли ЭДТА; 0,4 М раствор гидразин; 1 М раствор глицина; гидразин-глициновый буфер, pH 9,5; 0,05 М раствор НАД; раствор ЛДГ.

Приготовление растворов. Раствор гидразина (12,8 мг/мл) и глицина (75,1 мг/мл) готовят, растворяя навески в 0,2% -ном растворе натриевой соли ЭДТА. Буферный раствор готовится из исходных 0,4 М раствора гидразина и 1 М раствора глицина, путем их смешивания на рН-метре до рН 9,5. Растворы НАД (33,17 мг/мл) и ЛДГ (5 мг/мл) готовят перед употреблением, растворяя навески в б. в. Раствор хлорной кислоты (60 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Осаждение белков. В центрифужную пробирку вносят 1 мл 0,6 М раствора HClO_3 и 0,5 г замороженной и растертой мышечной ткани. После перемешивания к пробе добавляют 0,6 М раствор HClO_3 до соотношения 1:4 (на 1 г ткани должно быть 4 мл 0,6 М раствора HClO_3). Пробу оставляют на 10 мин при 0°C, а затем центрифугируют 15 мин при 3000g. Осадок отбрасывают, а к супернатанту добавляют 5 М раствор K_2CO_3 до соотношения 20:1 (на 1 мл супернатанта 0,05 мл 5 М раствора K_2CO_3). Раствор K_2CO_3 используется для нейтрализации избытка хлорной кислоты. После нейтрализации осадок перхлората калия отделяют центрифугированием в течение 5 мин при 3000g. Супернатант нагревают до 25°C.

Ход работы. Для определения содержания молочной кислоты в кювету вносят 0,2 мл 0,05 М раствора НАД, 2,0 мл гидразин-глициновый буфер, рН 9,5, и 0,2 мл супернатанта. После перемешивания измеряют светопоглощение раствора при 340 нм (D_1). Затем в кювету добавляют 0,05 мл раствора ЛДГ, перемешивают и измеряют вновь светопоглощение раствора при 340 нм (D_2). Реакцию окисления молочной кислоты регистрируют до момента прекращения возрастания светопоглощения при 340 нм. Контролем служит проба, в которую вместо 0,2 мл супернатанта добавляют 0,2 мл д. в. Светопоглощение контроля измеряют при 340 нм (D_3).

Метод расчета. Содержание молочной кислоты (мкмоль/г массы сухой ткани) определяют по следующей формуле:

$$C_{\text{лактат}} = \frac{dD \cdot V_1 \cdot V_2}{6,22 \cdot V_3},$$

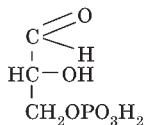
где dD — светопоглощение опытной пробы ($dD = (D_2 - D_1) - D_3$); V_1 — общий объем супернатанта, мл; V_2 —

объем супернатанта, вносимого в кювету, мл; V_3 — конечный объем пробы в кювете, мл; 6,22 — коэффициент молярного поглощения НАДН при 340 нм.

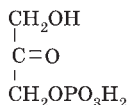
Оформление работы. Определить содержание молочной кислоты в исследуемой ткани. Раскрыть роль молочной кислоты в метаболизме мышечных тканей животных.

11.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОТРИОЗ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Принцип метода. Фосфотриозы (глицеральдегидфосфат и диоксиацетонфосфат) легко подвергаются гидролизу с отщеплением неорганического фосфата в щелочной среде при комнатной температуре.



3-Фосфоглицериновый альдегид



Фосфодиоксиацетон

Поэтому изменение количества неорганического фосфата в опытной пробе по сравнению с контрольной позволяет определить количество фосфотриоз в мышечной ткани.

Оборудование: аналитические весы; гомогенизатор; центрифуга; ФЭК; штатив.

Посуда: колбы на 100 мл — 3 шт., на 1 л — 2 шт.; пипетки на 1 мл — 7 шт., на 10 мл — 1 шт.; пробирки; чашка Петри.

Материалы и реактивы: мышечная ткань; концентрированная HCl; 2 М раствор NaOH; 2 М раствор HCl; 1%-ный раствор аммония молибденовокислого; 56,8 мМ раствор аскорбиновой кислоты; 0,5 мМ раствор KH_2PO_4 .

Приготовление растворов. Раствор молибденовокислого аммония готовят, растворяя 10 г молибденовокислого аммония $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ в горячей д. в., охлаждают, переносят в мерную колбу на 1 л и доводят д. в. до метки.

Растворы NaOH (80 мг/мл) и аскорбиновой кислоты (10 мг/мл) готовят, растворяя навески в д. в.

Раствор соляной кислоты готовят, разбавляя конц-НСl д. в.

Стандартный раствор KH_2PO_4 (0,068 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в. В 1 мл полученного раствора содержится 0,0155 мг фосфора.

Построение калибровочного графика. В семь пробирок последовательно вносят по 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 мл стандартного раствора KH_2PO_4 и д. в., как показано в таблице 11.3.

Таблица 11.3

Данные к построению калибровочного графика для определения содержания фосфора

№ пробирки	Объем раствора KH_2PO_4 , мл	Объем д. в., мл	Содержание фосфора, мг/мл	Количество фосфора, мкмоль/мл	Свето-поглощение D , усл. ед.
1 (контроль)	—	1,0			
2	0,1	0,9			
3	0,2	0,8			
4	0,4	0,6			
5	0,6	0,4			
6	0,8	0,2			
7	1,0	—			

Затем в каждую пробирку вносят 1 мл 2 М раствора NaOH и 1 мл 2 М раствора HCl. После перемешивания растворов добавляют в пробирки по 0,5 мл 1%-ного раствора аммония молибденовокислого и по 0,5 мл 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты. Общий объем смеси во всех пробирках доводят до 10 мл д. в. и оставляют на 10 мин при 23°C. После этого измеряют светопоглощение растворов на ФЭКе при 670 нм против контроля.

При построении калибровочного графика по оси ординат откладывают данные светопоглощения растворов (D , усл. ед.), а по оси абсцисс — концентрацию фосфора (C , мкмоль/мл).

Ход работы. Мышечную ткань (0,5 г) измельчают ножницами и гомогенизируют. К гомогенату добавляют 5 мл охлажденного 2,5%-ного раствора ТХУ. Смесь

интенсивно перемешивают 10 мин и после добавления 5 мл д. в. центрифугируют 15 мин при 7000g. Затем в опытную пробирку последовательно вносят 1 мл супернатанта и 1 мл 2 М раствора NaOH. Содержимое опытной пробирки перемешивают и выдерживают при 23°C в течение 20 мин. После этого в опытную пробирку добавляют 1 мл 2 М раствора HCl для нейтрализации щелочи и раствор перемешивают.

В контрольную пробирку вносят 1 мл 2 М раствора NaOH и 1 мл 2 М раствора HCl. После перемешивания растворов добавляют 1 мл супернатанта и смесь снова перемешивают.

Затем в опытную и контрольную пробирки добавляют 0,5 мл 1%-ного раствора аммония молибденовокислого и 0,5 мл 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты. Общий объем смеси в обеих пробирках доводят до 10 мл д. в. и оставляют на 10 мин при 23°C. После этого измеряют светопоглощение растворов на ФЭКе при 670 нм против контроля.

Метод расчета. Содержание фосфотриоз (мкмоль/г влажной массы) в исследуемой пробе определяют по следующей формуле:

$$C = \frac{C_{\text{ст}} \cdot V \cdot V_1}{P \cdot V_2},$$

где $C_{\text{ст}}$ — количество фосфора, определенное по калибровочному графику, мкмоль/мл; V — объем гомогената, мл; V_1 — общий объем раствора в пробирке при нейтрализации щелочи, мл; V_2 — объем супернатанта, вносимого в пробирку, мл; P — навеска ткани, г.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта, построить калибровочный график и определить содержание фосфотриоз в исследуемой пробе.

11.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТАНОЛА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Принцип метода. Этанол является энергетическим метаболитом мышечных тканей, может образовываться

в реакциях декарбоксилирования молочной кислоты — продукта анаэробного окисления углеводов или в реакциях, катализируемых АДГ. В мышечных тканях уровень эндогенных алифатических спиртов и альдегидов регулируется с помощью дегидрогеназной системы, состоящей из двух ферментов — алкоголь- и альдегиддегидрогеназ. При физиологических рН среды равновесие алкогольдегидрогеназной реакции сдвинуто в сторону образования этанола.

В данной работе предлагается определять содержание этанола в биологическом материале после предварительной его микроперегонки. Концентрация этанола определяется по накоплению НАДН в ходе реакции его окисления в присутствии алкогольдегидрогеназы.

Оборудование: термостат или водяная баня; ФЭК или спектрофотометр; рН-метр; аналитические весы.

Посуда: колба на 500 мл; пипетки на 0,1 мл — 4 шт., на 5,0 мл — 1 шт.

Материалы и реактивы. Мышечная ткань; 0,1 М глицин-NaOH буфер, рН 10; водный раствор НАД (24 мг/мл); раствор иоднитротетразолия фиолетового (0,25 мг/мл); раствор алкогольдегидрогеназы (активность фермента составляет около 24 МЕ) из семян пшеницы; 0,082 М раствор этанола; супернатант мышечной ткани.

Приготовление рабочих растворов. Раствор алкогольдегидрогеназы готовят перед употреблением путем растворения лиофилизированного препарата из расчета 20 мг на 1 мл бидистиллированной воды; раствор ИНТФ готовят, растворяя 3,8 мг навески в 1 мл бидистиллированной воды; раствор этанола готовят, добавляя к 0,5 мл 16,4 М (96%-ного) этанола 195 мл бидистиллированной воды; буферный раствор готовится из исходных 0,1 М растворов глицина и NaOH путем их смешивания на рН-метре до рН 10,0; отгон получают путем микроперегонки этанола из биологического материала.

Пример конкретного выполнения. 3,0 мл супернатанта помещают в пенициллиновый флакон. Туда же помещают стеклянные или пластмассовые открытые капсулы, объемом 0,8–1,0 мл, так чтобы верхний слой капсулы был на

2–3 см выше уровня супернатанта во флаконе. В капсулы опускают наконечники охлаждающей системы. Нагревают флаконы на водяной бане при 80°C в течение 1 ч. Пары летучих жидкостей, включая этанол, конденсируются на охлаждающих наконечниках микроперегонки и стекают в капсулу, объем конденсата в капсуле составляет 0,3–0,5 мл. При этом достигается отделение этанола от белков и многих других веществ гомогената растительных тканей, а также его концентрирование. Измеряют точный объем собранного конденсата в капсуле. Подготовленная проба может храниться в закрытой капсуле несколько дней.

Построение калибровочного графика. Калибровочный график строят, используя раствор этанола с известной концентрацией от 1,64 до 6,56 мМ. Для этого определяют зависимость начальной активности фермента приготовленного перед измерением раствора алкогольдегидрогеназы от концентрации стандартных растворов этанола.

Определение этанола в отгоне. В спектрофотометрическую кювету последовательно вносят 1,9 мл 0,1 М глицин- NaOH буферного раствора, рН 10, 0,1 мл 36 мМ водного раствора НАД, 0,1 мл ИНТФ (0,25 мг/мл) и 0,2 мл отгона из капсулы. После перемешивания смеси в кювете реакцию инициируют введением 0,2 мл раствора алкогольдегидрогеназы. За изменением поглощения раствора в кювете следят при 510 нм на спектрофотометре или ФЭКе.

Метод расчета. По калибровочной кривой находят концентрацию этанола в кювете. Затем рассчитывают концентрацию этанола (мкмоль/г влажной массы) в супернатанте крови по формуле

$$\text{ЭТАНОЛ} = C \cdot A \cdot B / P,$$

где C — концентрация этанола, определенная по калибровочному графику, мкмоль; B — коэффициент концентрирования при отгоне этанола из супернатанта, равный отношению объема взятого гомогената к объему отгона в капсуле; A — коэффициент разведения отгона в кювете; P — навеска растительной ткани, г.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Химический состав мышц и мяса.
2. Биохимические процессы после убоя.
3. Особенности выделения митохондрий из скелетных мышц.
4. Выделение митохондрий из сердечной мышцы.
5. Строение белков мышечной ткани.
6. Описать метод выделения белков мышечной ткани.
7. Назвать и охарактеризовать гемсодержащие белки мышц.
8. Описать метод выделения и очистки миоглобина мышц.
9. Раскрыть специфичность ферментативных методов определения пировиноградной и молочной кислот с помощью лактатдегидрогеназы.
10. Какое значение имеет величина pH среды при проведении реакции с участием лактатдегидрогеназы?
11. В каких метаболических процессах образуются фосфотриозы?
12. Рассказать о роли этанола в метаболических процессах клеток растений и животных.
13. Написать реакцию окисления этанола, катализируемую алкогольдегидрогеназой.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

СПОСОБЫ РАСЧЕТА СОДЕРЖАНИЯ БИОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ИССЛЕДУЕМЫХ ЖИДКОСТЯХ И ТКАНЯХ

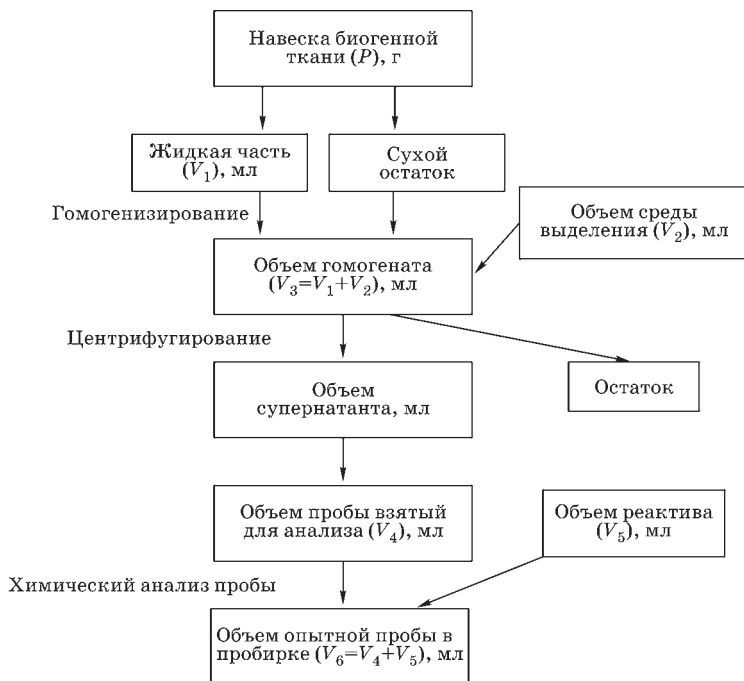


Рис. П1

Схема исследований биогенных соединений
в растительных тканях

Формула расчета содержания исследуемого вещества
(мг/г сухой ткани) в биогенной ткани:

$$C_0 = \frac{C_{\text{к}} \cdot V_3 \cdot V_6}{P \cdot V_4},$$

где C_k — концентрация вещества, определенная по калибровочному графику, мг/мл; V_3 — объем гомогената, мл; V_6 — объем пробы в пробирке, мл; P — навеска ткани, мг; V_4 — объем пробы, взятой для анализа, мл; V_6/V_4 — разбавление пробы в пробирке.

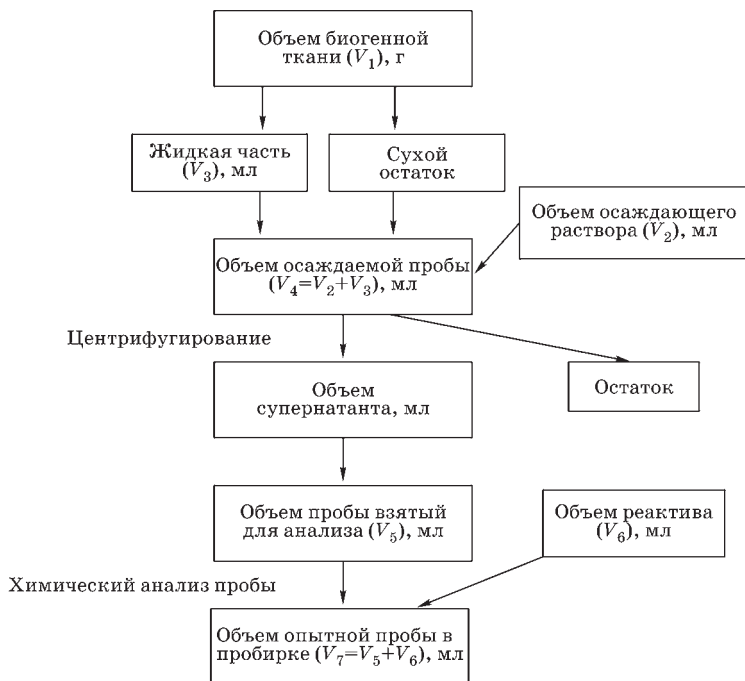


Рис. П2

Схема исследований соединений в различных биогенных жидкостях

Формула расчета содержания (мг/мл) исследуемого вещества в биологической жидкости:

$$C_0 = \frac{C_k \cdot V_1 \cdot V_4 \cdot V_7}{V_2 \cdot V_5},$$

где C_k — концентрация вещества, определенная по калибровочному графику, мг; V_1 — объем биологической жидкости, взятой для анализа, мл; V_2 — объем раствора для осаждения белков, мл; V_4 — общий объем осаждаемой пробы, мл;

V_2 — объем пробы, взятой для анализа, мл; V_5 — объем опытной пробы в пробирке, мл; V_4/V_2 — разбавление биогенной жидкости при осаждении белков; V_7/V_5 — разбавление раствора в пробирке.

Приложение 2

ВЕЛИЧИНЫ БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ И ИХ КИСЛОТНЫЕ И ЩЕЛОЧНЫЕ КОМПОНЕНТЫ

Буферный раствор	Диапазон pH	Кислый компонент	Щелочной компонент
Фосфатно-цитратный*	2,2–8,0	Лимонная кислота	Na_2HPO_4
Глицин — HCl	2,2–3,6	HCl	Глицин
Лимонная кислота — Na_2HPO_4	2,6–7,6	Лимонная кислота	Na_2HPO_4
Боратный	3,0–5,8	Янтарная кислота	Бура ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)
Цитратный	3,0–6,2	Лимонная кислота	Цитрат-3Na
β, β' -Диметилглутаровая кислота — NaOH	3,2–7,6	β, β' -Диметилглутаровая кислота	NaOH
Ацетатный	3,6–5,6	Уксусная кислота	Ацетат-Na
Сукцинатный	3,8–6,0	Янтарная кислота	NaOH
Малеатный	5,2–6,8	Малеиновая кислота	NaOH
<i>трис</i> -Малеат	5,4–8,4	Малеиновая кислота	Трис
Na-фосфатный	5,8–8,0	NaH_2PO_4	Na_2HPO_4
К-фосфатный	5,8–8,0	KH_2PO_4	KOH
Имидазольный	6,2–7,8	HCl	Имизадол
5,5-Диэтилбарбитуратный (вероналовый)	6,8–9,6	HCl	Диэтилбарбитурат натрия
2,4,6-Триметилпиридин — HCl	6,4–8,3	HCl	2,4,6-Триметилпиридин

Буферный раствор	Диапазон pH	Кислый компонент	Щелочной компонент
N-Этилморфолин — HCl	7,0–8,2	HCl	N-Этилморфолин
Триэтаноламиновый	6,8–8,6	HCl	Триэтаноламин
трис-HCl	7,2–9,1	HCl	Трис
Боратный	7,4–9,0	Борная кислота	Бура ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)
Диэтаноламиновый	8,0–10,0	HCl	Диэтаноламин
Боратный	9,3–10,1	Бура ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)	NaOH
Глициновый	8,6–10,6	Глицин	NaOH
Бикарбонатный	9,2–10,8	NaHCO_3	Na_2CO_3
Карбонатный	9,7–10,9	NaHCO_3	NaOH
Фосфатный	11,0–11,9	Na_2HPO_4	NaOH
KCl — NaOH	12,0–13,0	KCl	NaOH

* Этот буфер нельзя использовать, если в растворе присутствуют ионы кальция или магния.

Приложение 3

ЗНАЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС ОСНОВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Название	Структурная или брутто формулы вещества	Молекулярная масса, г/моль
Аденозин-5'-дифосфат (АДФ)	—	427,2
АДФ- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	—	507,2
Аденозин-5'-трифосфат (АТФ)	—	507,2
АТФ- $\text{Na}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	—	605,2
Аденозин-5'-фосфат (АМФ)	—	347,2
АМФ- H_2O	—	365,2
Азид натрия	NaN_3	65,01
Аланин	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	89,1
Алкогольдегидрогеназа печени	—	84000,0
Альбумин (бычьей сыворотки)	—	67000,0
Аммоний ванадиевокислый	NH_4VO_3	116,98
Аммоний молибденовокислый	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1235,86
Аргинин	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_4$	174,2
Аскорбиновая кислота	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	176,1
Аскорбат- Na	$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$	198,1
Аспарагиновая кислота	$\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_4\text{N}$	133,1
АТФ, динатриевая соль $3\text{H}_2\text{O}$	—	605,2
АТФ, дикалиевая соль $1,5\text{H}_2\text{O}$	—	610,4
Ацетальдегид	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$	44,0
Ацетат натрия	CH_3COONa	136,09
Ацетон	CH_3COCH_3	58,1
Ацетонциангидрин	$\text{C}_4\text{H}_7\text{ON}$	85,0
Бензойная кислота	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	122,1
Борная кислота	H_3BO_3	61,84
Бура	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	201,28
Вольфрамвокислый натрий	Na_2WO_4	293,9
Гемин-Cl (хлороферринпротопор- фирин)	$\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{N}_4\text{FeCl}$	652,0

Название	Структурная или брутто формулы вещества	Молекулярная масса, г/моль
Гем	$C_{34}H_{32}O_4N_4Fe$	616,0
Гемоглобин	—	64458,0
Гидразин	NH_2-NH_2	32,06
Гидразин гидрат	$NH_2-NH_2 \cdot H_2O$	50,06
Гидразинсульфат	$H_6N_2O_4S$	130,12
Гидразин солянокислый	$N_2H_6 Cl_2$	104,97
Гидроксид натрия	$NaOH$	40,0
Гидроксид калия	KOH	56,89
Гидроксиламин сернокислый	$H_8N_2O_6S$	164,14
Гидроксиламин солянокислый	$NH_2OH \cdot HCl$	69,49
Глицеральдегид-3-фосфат	$C_3H_7O_6P$	170,1
Глицерин	$C_3H_8O_3$	92,1
Глицин (аминоуксусная кислота)	H_2NCH_2COOH	75,1
Глицил-глицин	$C_4H_8O_3N_2$	132,12
γ -L-глутамил-p-нитроанилид	$C_7H_8O_2N_4$	180,0
Глюкоза	$C_6H_{12}O_6$	180,2
Глюкозо-1-фосфат	$C_6H_{13}O_9P$	260,1
Глюкозо-6-фосфат	$C_6H_{13}O_9P$	260,1
Глюкозо-6-фосфат дикалиевая соль	$C_6H_{11}O_9PK_2$	336,3
Глюкозо-6-фосфат динатриевая соль	$C_6H_{11}O_9PNa_2$	304,1
Глюкозо-6-фосфат монокалиевая соль	$C_6H_{12}O_9PK$	28,2
Глюкозо-6-фосфат мононатриевая соль	$C_6H_{12}O_9PNa$	282,1
Глюкозо-1,6-дифосфат	$C_6H_{14}O_{12}P_2$	340,1
o-Дианизидин (3,3'-диметоксибен- зидин)	$C_{14}H_{16}O_2N_2$	244,0
Диацетилмонооксим	$C_4H_7O_2N$	101,11
Дигидрокверцетин	$C_{15}H_{12}O_7$	304,25
Дигоксин	$C_{42}H_{55}O_{14}$	783,0
β, β' -Диметилглутаровая кислота	$C_7H_{12}O_4$	160,2
Диметилсульфоксид	$(CH_3)_2SO$	78,13
2,4-Динитрофенилгидразин	$C_6H_6O_4N_4$	198,15
2,4-Динитрофенол	$C_6H_4O_5N_2$	184,1
1,4-Дитиотреитол	$C_4H_{10}O_2S_2$	154,3
Дифенилкарбазон	$C_6H_5N =$ $= NCONHNHC_6H_5$	240,27
Диэтаноламин	$HN(C_2H_4OH)_2$	105,1

Название	Структурная или брутто формулы вещества	Молекулярная масса, г/моль
5,5-Диэтилбарбитурат натрия (веронал натрия)	$C_8H_{11}N_2O_3Na$	206,2
Диэтиловый эфир	$C_4H_{10}O$	74,0
Додецилсульфат натрия (ДСН)	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	288,38
Изоцитрат натрия	$Na_3C_6H_5O_7$	258,09
Индолил-3-уксусная кислота	$C_{10}H_9O_2N$	175,2
Железо сульфат	$FeSO_4$	151,9
Железо хлорид (II)	$FeCl_2$	126,9
Железо хлорид (III)	$FeCl_3$	162,4
Калия гидроксид	KOH	56,11
Калия иодид	KJ	166,0
Калия карбонат	K_2CO_3	138,21
Калия нитрат	KNO_3	101,1
Калия сульфат	K_2SO_4	174,25
Калия фосфат (однозамещенный)	KH_2PO_4	136,09
Калия фосфат (двухзамещенный)	K_2HPO_4	174,2
Калия хлорид	KCl	74,55
Калия цианид	KCN	65,12
Кальция нитрат	$Ca(NO_3)_2$	164,09
Кальция хлорид	$CaCl_2$	111,08
Кверцетин	$C_{15}H_{10}O_7$	302,0
А-Кетоглутарат	$C_5H_6O_5$	146,1
КоА-SH	—	767,6
Креатинфосфат	—	211,1
Лимонная кислота (цитрат)	$C_6H_8O_7$	192,14
Люциферин	$C_{11}H_8O_3N_2S_2$	280,1
Магния ацетат	$Mg(CH_3COO)_2$	142,41
Магния сульфат	$MgSO_4$	120,36
Магния сульфат (гидрат)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,47
Магния хлорид	$MgCl_2$	95,21
Малат натрия	$C_4H_5O_5Na$	156,1
Малеиновая кислота	$C_4H_4O_4$	116,1
Малоновый диальдегид	$C_3H_4O_2$	72,0
Марганца хлорид	$MnCl_2$	125,84
2-Меркаптоэтанол	$HSCH_2CH_2OH$	78,1
Мочевина	NH_2CONH_2	60,1
Натрия гидрокарбонат	$NaHCO_3$	84,01
Натрий фосфат (однозамещенный)	NaH_2PO_4	142,1

Название	Структурная или брутто формулы вещества	Молекулярная масса, г/моль
Натрий фосфат (двухзамещенный)	Na_2HPO_4	141,98
Натрий фосфат (трехзамещенный)	Na_3PO_4	164,13
Натрий хлор	NaCl	58,44
Никотинамидадениндинуклеотид окисленный (НАД)	$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{O}_{14}\text{N}_7\text{P}_2$	663,4
Никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (НАДН)	$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_{14}\text{N}_7\text{P}_2$	665,4
Никотинамидадениндинуклеотид фосфат окисленный (НАДФ)	$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_{17}\text{N}_7\text{P}_3$	743,4
Никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный (НАДФН)	$\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{O}_{17}\text{N}_7\text{P}_3$	745,4
<i>п</i> -Нитроанилин	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2\text{N}_2$	138,0
<i>п</i> -Нитрофенилфосфата натрия	$\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_6\text{NPNa}$	263,1
<i>п</i> -Нитрофенол	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_3\text{N}$	139,0
Ортофосфорная кислота	H_3PO_4	98,0
Орцин (3,5-дигидрокситолуин, 5-метилрезорцин)	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	124,14
Орцин	$\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3-1,3-(\text{OH})_2\text{H}_2\text{O}$	142,16
Перекись водорода	H_2O_2	34,0
Пикриновая кислота	$\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7\text{N}_3$	229,1
Пирокатехин	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	110,1
Пировиноградная кислота	CH_3COCOON	88,1
Пиронин	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}$	302,8
Пируват калия	CH_3COCOOK	126,2
Пируват натрия	$\text{CH}_3\text{COCOONa}$	110,0
Ртуть азотнокислая	$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	561,22
Рутин	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	610,0
Сахароза	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	342,3
Сегнетовая соль	$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$	210,1
Серная кислота	H_2SO_4	98,1
Соляная кислота	HCl	36,5
Сульфат меди	CuSO_4	159,6
Тиаминпирофосфат	—	425,3
Тиобарбитуровая кислота	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2\text{N}_2\text{S}$	144,0
Тиогликолевая кислота	HSCH_2COOH	92,1
Тиомочевина	NH_2CSNH_2	76,1
Тиосемикарбазид	$\text{NH}_2\text{CSNHNH}_2$	91,1
α -Токоферол	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$	430,7

Название	Структурная или брутто формулы вещества	Молекулярная масса, г/моль
α -Токоферолацетат	$C_{31}H_{52}O_3$	472,0
<i>o</i> -Толуидин	C_7H_5N	103,0
2,4,6-Триметилпиридин	$C_8H_{11}N$	121,18
Трис (гидроксиметил)аминометан	$NH_2C(CH_2OH)_3$	121,14
Трихлоруксусная кислота	CCl_3COOH	163,38
Триэтаноламин	$N(C_2H_4OH)_3$	149,2
Уксусная кислота	CH_3COOH	60,0
<i>o</i> -Фенантролин	$C_{12}H_8N_2$	180,2
<i>n</i> -Фенилендиамин солянокислый	$C_6H_4(NH_2)_2 \cdot 2HCl$	181,06
Феррицианид калия	$K_3Fe(CN)_6$	329,25
Ферроцианид калия	$K_4Fe(CN)_6$	367,8
3-Фосфоглицериновая кислота	$CH_2(OPO_3H_2)CH(OH)COOH$	186,1
6-Фосфоглюконовая кислота	$C_6H_{13}O_{10}P$	276,1
Фосфодиоксиацетон	$C_3H_7O_6P$	170,1
Фосфоенолпируват	$CH_2 = C(OPO_3H_2)COOH$	168,0
Фруктозо-6-фосфат	$C_6H_{13}O_9P$	260,1
Фруктозо-1,6-дифосфат- Na_3	$C_6P_{11}O_{12}P_2Na_3$	406,10
Фруктозо-1,6-дифосфат- Na_4	$C_6P_{11}O_{12}P_2Na_4$	428,00
<i>n</i> -Хлормеркурибензоат- Na	—	379,14
Хлорная кислота	$HClO_4$	100,46
Хлороформ	CH_3Cl	50,5
Холестерин	$C_{27}H_{46}O$	386,6
<i>L</i> -Цистеин	$HSCH_2CH(NH_2)COOH$	121,2
Цитрат натрия трехзамещенный	$Na_3C_6H_5O_7$	258,09
Этанол	C_2H_6O	46,0
Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	292,2
ЭДТА динатриевая соль	$C_{10}H_{14}O_8N_2Na_2 \cdot 2H_2O$	336,21
1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (ЭДПК)	$C_8H_{18}N_3Cl$	191,7
<i>N</i> -Этилморфолин	$C_6H_{13}ON$	115,17
Яблочная кислота (малат)	$C_4H_6O_5$	134,1
Янтарная кислота (сукцинат)	$C_4H_6O_4$	118,09

Приложение 4

ОСНОВНЫЕ ПРИБОРЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Название прибора	Основные показатели
Спектрофотометр УФ/Вид	Диапазон длин волн 190–950 нм. Дифракционная решетка или призма, полоса пропускания 5–10 нм, разрешение 1 нм. Источником видимого света служит галогенная лампа, в УФ используются водородные или дейтериевые лампы. Скорость сканирования 10, 20, 50, 100 и 400 нм/мин
Фотоэлектроколориметр	Длина волны 315–980 нм, <i>интерференционные светофильтры</i> с шириной полосы пропускания в пределах 6–20 нм
Люминометр EMILITE 1005	Спектральный диапазон: 350–950 нм; диапазон измерения, фотонов/с: 10^5 – 10^{12} ; дисплей: жидкокристаллический; выход сигнала: 1–9999 мВ; размер кюветы: 12×55 мм
ИК-спектрофотометр	Диапазон длин волн: от 4000 до 600 см^{-1} . Скорость сканирования: 3, 6, 12 или 24 мин. 0,5 нм монохроматор с голографической решеткой (75 линий/мм). Детектор с неигроскопическим окном. Номинальное разрешение: 2–2000 см^{-1} . Точность по длине волны: 4 см^{-1} . Фотометрический диапазон от –0,1 до 2,0 поглощения с RMS пределом шума 1% при 2900 см^{-1}
ИК-Фурье спектрометр AVATAR Thermo Nicolet	ИК-Фурье спектрометр Avatar 330 Thermo Nicolet, имеющий разрешение 0,4 см^{-1} , DTGS детектор (7800–375 см^{-1}), оптику «pinned-in-place» не требующую юстировки, обеспечивающую высокую стабильность и воспроизводимость результатов при изменении условий окружающей среды, динамическая настройка интерферометра и автоматическая оптимизация энергии излучения, светоделитель KBr, источник Ever-Glo Mid-IR, герметичное оптическое отделение, программное обеспечение EZ Omnic CD Software для управления прибором, сбора и обработки данных, математических операций, создания библиотек ИК-спектров и поиска по библиотекам, демобиблиотеки 600 спектров. Комплект для пробоподготовки включает: пресс для получения таблеток 7 мм; агатовая ступка (65 мм) и пестик; спектрально чистый KBr (100 г); разборная жидкостная кювета (0,015–0,5 мм) для анализа

Название прибора	Основные показатели
	жидкостей с окошками КВг. Комплект для автоматической валидации спектрометра в соответствии с международными требованиями ASTM 1421-99 test protocols, программа Omnic/Val-Q Software для автоматической валидации прибора с выдачей протокола валидации, автоматическая карусель с комплектом стандартов для внутренней валидации с управлением программой Omnic/Val-Q
Рентгенофлюоресцентный анализатор HORIBA MESA-500W	В основе действия прибора используются токи рентгеновской трубки, которая автоматически устанавливается на оптимальный уровень, переключая напряжения рентгеновской трубки с 15 на 50 кВ. Это позволяет оптимизировать условия измерения. Чувствительность анализа легких элементов обеспечивается автоматическим выбором режима вакуумной откачки. Программное обеспечение MESA-500W предназначено для работы в среде MS Windows. Используемый в HORIBA MESA-500W детектор из особого чистого кремния (технология Xerophy®) устраняет необходимость в непрерывной подаче жидкого азота. При этом азот нужен только во время проведения анализа
Весы аналитические	Внутренняя калибровка, тринадцать единиц измерения, возможность измерения плотности веществ и работы с магнитным материалом, программное обеспечение WINCT, встроенный стандартный интерфейс RS-232C, CD с программным обеспечением, объемом памяти на 200 измерений, наличие вспомогательной памяти, блок аккумуляторных батареек, сетевой адаптер, самодиагностика, автоматическая компенсация измерений окружающей среды. Единицы измерения: g, mg, pcs, %, oz, ozt, dwt, ct, mom, GN
Лабораторная молотковая дробилка	Производительность измельчения 50–60 г/мин. Номинальное число оборотов ленточного молотка 12 200 об/мин. Размеры частиц измельченного материала 1–2 мм
Центрифуги	Аналитические, рефрижераторные и др.
Аминокислотный анализатор А 200	Автосамплер на 120 образцов (1,5 мл) с охлаждением; программируемый ввод пробы 1–50 мкл с шагом 1 мкл; двухплунжерный насос, инертные титановые плунжеры (подача 0,001–9,9 мл/мин, давление до 400 бар); микрофотометр фильтровый: 570 и 440 нм; два уровня чувствительности (низкая, высокая); термостат колонок программируемый, на четырех элементах Peltier (20–100°C); постколоночный реактор программируемый, на четырех элементах Peltier (50–150°C); блок для автоматического переключения элюентов и реагентов; программное обеспечение EuroChrom 2000 или ChromGate(GLP); управление от внешнего персонального компьютера

Название прибора	Основные показатели
Биохимические анализаторы	Автоматический, полуавтоматический
Система для экстренной токсикологии и лекарственного мониторинга REMEDi	Автоматический анализатор, основанный на использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для анализа можно использовать сыворотку или плазму крови, мочу. Объем любого из образцов одинаковый — 500 мкл, и никаких изменений параметров при анализе того или иного образца не требуется. Могут быть проанализированы также образцы цельной крови и тканей. С этими образцами, однако, необходимо провести стадии предварительной пробоподготовки. Единственной стадией пробоподготовки является добавление 100 мкл смеси внутренних стандартов к 500 мкл образца и их перемешивание
Амплификатор Mastercycler GRADIENT (Eppendorf, Germany)	Амплификатор представляет собой твердотельный термостат для микропробирок 0,2/0,5 мл. Универсальный термоблок для 96×0,2 мл и 77×0,5 мл пробирок, нагреваемая крышка, градиент температуры от 1 до 20°C в пределах блока; температурный диапазон от 4,0 до 99,0°C; погрешность поддержания температуры ±0,2°C; разброс температуры по блоку ±0,4°C; средняя скорость изменения температуры нагрева 3,0°C/с; охлаждения — 2,0°C/с; число программ 100; максимальное число циклов 99
Гомогенизаторы	MSK Cell homogenizer — шаровая мельница для быстрой и наиболее эффективной гомогенизации клеток и тканей: дезинтеграция дрожжей, грибов, одноклеточных водорослей, макромолекул, подготовка органического материала для дальнейших исследований (например, 2-D-электрофорез). Возможность охлаждения (CO ₂) предотвращает денатурацию белков и теплочувствительных материалов; Скорость встряхивания 2000 или 4000 мин ⁻¹ ; сосуды для встряхивания из стекла и стали и стеклянные шарики для различных задач; допускает использование одноразовых емкостей; Potter S — прибор для быстрой и деликатной гомогенизации клеток и тканей. Двигатель 150–1500 мин ⁻¹ ; плунжеры из ПТФЭ или стекла; сосуды от 2 до 60 мл различного исполнения для каждой задачи; система охлаждения образца во время гомогенизации. Mikro-Dismembrator U — шаровая мельница для твердых и замороженных образцов: семена растений, пигменты, волосы, ногти, кости, хрящи, замороженные ткани и клетки, минералы. Высокая эффективность и быстрая гомогенизация образца — скорость до 3000 мин ⁻¹ ; программируемый режим работы (контролируемая частота от 50 до 3000 мин ⁻¹ , таймер) обеспечивает воспроизводимость процесса гомогенизации; большой выбор емкостей из тефлона и стали от 3 до 20 мл и шариков из стекла, агата, карбида вольфрама или стали

Название прибора	Основные показатели
pH-метр	На микропроцессорах, оборудован выходом, позволяющим регистрировать данные на принтере или на компьютере. Пределы измерений 0–14 pH. Относительная точность $\pm 0,01$
Кондуктометр	Диапазоны: 0,0–199,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 0–1999 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 0,00–19,99 mS/cm , 0,0–199,9 mS/cm . Погрешность $\pm 1\%$
Термостат	Компрессор с воздушным охлаждением, обеспечивает работу в температурных пределах от $-50/30^\circ\text{C}$ до $+150/200^\circ\text{C}$. Используется для циркуляции в открытых или закрытых банях
Газовый хроматограф «Цвет-800»	Конструктивно состоит из аналитического блока со встроенным контроллером управления; 2-канального разнополярного 21-разрядного АЦП; блока подготовки газов БПГ-186Н для работы с набивными колонками и в универсальном варианте — с насадочными и капиллярными колонками; блока ионизационного детектирования БИД-45-02 для предварительного усиления слабых электрических сигналов детекторов и питания детекторов высоким постоянным напряжением
Хроматомасс-спектрометр TRACE GC 2000	Диапазон масс — от 2 до 1023 а. е. м. Разрешающая способность — до 2500 на массе 1000 а. е. м. Стабильность шкалы масс — $\pm 0,1$ а. е. м. за 12 часов. Условия — использовалась капиллярная колонка $15\text{ м} \times 0,25\text{ мм} \times 0,25\text{ мкм}$. Объем пробы — 1 мкл, ввод без деления потока. Стандартные растворы: октафторнафталин (1 пг/мкл) и бензофенон (10 пг/мкл) в нормальном гептане. Режим электронного удара (EI): сканирование от 200 до 300 а. е. м. за 0,2 с; измерение по массе 272. Режим химической ионизации положительными ионами (CI^+): сканирование от 50 до 350 а. е. м. за 0,5 с; измерение по массе 183. Режим химической ионизации отрицательными ионами (CI^-): сканирование от 200 до 300 а. е. м. за 0,2 с; измерение по массе 272
Высокоэффективный микроколоночный жидкостной хроматограф	Насосы плунжерного (шприцевого) либо поршневого типов. Инжектор в виде петлевого дозатора. Колонки — толстостенные трубки из нержавеющей стали. Для жидкостной хроматографии низкого давления используют толстостенные стеклянные колонки. Постоянство температуры обеспечивается термостатом. Оптическую плотность регистрируют с помощью УФ-детектора с проточной кюветой. В составе регистрирующей системы: дифференциальный усилитель, самописец и интегратор, позволяющие рассчитывать относительные площади получаемых пиков
Аппарат для электрофореза	Приборы для вертикального и горизонтального электрофореза. платиновые электроды: диаметром 0,3 мм, напряжение 10–200 В (постоянное), ток 4–100 мА, точность на выходе: $\pm 2,5\%$ от установленного значения

Название прибора	Основные показатели
Денситометр HYRYS 2 HIT фирмы SEBIA	Сканирование в проходящем свете на прозрачной или непрозрачной основе. Сканирование в отраженном свете при измерении флуоресценции (дополнительная возможность): облучение 340 нм — отражение 525 нм. Источник света: галогеновая лампа 12 В, 20 Вт; не отражающие линзы на 320–650 нм. Интерференционные фильтры 420 нм, 540 нм и 570 нм. Диапазон измерения 0–6 А. Размер щели: 0,15×0,5 мм, разрешение 150 мкм. Частота измерений: переменная (1 измерение каждые 100 мкм). Программируемый или автоматический ноль
Мешалки	Верхнеприводные и магнитные
Роторный испаритель	Тип холодильника диагональный, охлаждаемая поверхность 1050 см ² , диапазон скоростей 20–270 об/мин, объем колб 100–3000 мл, температура: 30–100°C
Лиофильные сушики	FD 1.0 (Heto-Holten) компактная настольная модель, емкость конденсора 2 л, производительность 1 кг/24 ч, насос: 33 л/мин, 5×10 ⁻⁴ mbar; выпускается две модели: с температурой конденсора –60°C и –110°C. Консоль с 4 портами, разветвитель для 16 ампул (вставляется в кран порта), ненагреваемые камеры без закупорки и с закупоркой, под вакуумом (механической или автоматической), электрически нагреваемая камера с закупоркой под вакуумом. LP3 (Jouan) напольная модель, вакуумный насос 100 л/мин; максимальная, вакуум 2,5×10 ⁻⁴ mbar; указатель температуры конденсора и вакуума; температура конденсора –45°C, максимальная емкость конденсора 3 л, производительность 1,5 кг/24 ч, 8 портов для сосудов с наружным диаметром горлышка 18–33 мм или внутренним диаметром 25–30 мм; габариты 59×60×58 см, масса — 30 кг, консоль с портами для 40 ампул, камера с тремя полками (для 90 флаконов по 10 мл), камера с системой закупорки под вакуумом
Автоматические пипетки	Пипетки с переменным и фиксированным объемами от 0,1 до 5000 мкл
Морозильные камеры	Температура от –20 до –50°C, автоматическая коррекция, погрешность ±1°C
Дистиллятор	Производительность (4, 10, 30, 60, 90 л/ч). Номинальная мощность, кВт 5,9–10,5. Максимальная постоянная нагрузка тока, 16 А. Удельная потребляемая мощность, 720 + 70 Вт/л д. в. Общая потребность питательной воды с температурой 9–12°C, 110–150 л/ч

Название прибора	Основные показатели
Бидистиллятор	Производительность 2–4 л/ч; полностью автоматический стеклянный дистиллятор для двойной перегонки воды, проводимость дистиллята 2,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ при 25 °C; проводимость бидистиллята 1,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ при 25 °C; электронный контроль уровня в течение всего процесса дистилляции; электронный датчик загрязнений запускает промывку и очистку испарителя дистиллятора
Система очистки воды NANO pure Diamond и Infinity	Производительность до 50 л в день, с большим набором картриджей. В зависимости от целей системы могут комплектоваться анализатором общего органического углерода, двухволновым (185/254 нм) УФ-облучателем, возможностью ультрафильтрации для удаления пирогенов. Подаваемая вода: <5 $\mu\text{S}/\text{cm}$; общий органический углерод: <2 ppb; пироген: <0,005 EU/ml; микроорганизмы: <1 cfu/ml; сопротивление: >18,2 M Ω ×cm; производительность: 1,3–1,5 л/min
Моечная машина	Ультразвуковая с подогревом

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

А

АДЕНОЗИНТРИФОСФАТ (АТФ) — сложное соединение, образованное из азотистого основания аденина, рибозы и последовательно соединенных трех остатков фосфорной кислоты; АТФ содержит макроэргические связи, гидролиз которых обеспечивает энергетические потребности, необходимые для протекания метаболических процессов в живых организмах; при расщеплении АТФ последовательно образуются АДФ и АМФ.

АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ — низкомолекулярные азотистые соединения, основными структурными элементами которых являются пиримидин и пурин; а. о. входят в состав РНК и ДНК, определяя их принадлежность; так, в составе ДНК аденин, гуанин, цитозин и тимин, а в РНК вместо тимина присутствует урацил.

АКТИВАТОР — вещество, действие которого проявляется в возрастании скорости ферментативной реакции; различают неконкурентную ($\alpha = 1, \beta > 1$), синергистическую ($\alpha < 1, \beta = 1$) и смешанные ($\alpha \neq 1, \beta \neq 1$) типы активирования.

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.

АЛЛЕЛЬНЫЕ ГЕНЫ — различные формы одного и того же гена в гомологичных хромосомах; например

гены, контролирующие окраску желтозерных и зеленозерных сортов гороха или белую и красную окраску цветков роз и т. д.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ — наблюдается в разных тканях одного и того же РНК-предшественника, приводящий к образованию разных РНК, содержащих разные наборы экзонов; в результате а. с. РНК, транскрибируемые с одного гена, будут кодировать белки с разными свойствами; выбор путей сплайсинга РНК-предшественника — это способ регуляции активности генов в разных клетках и тканях организма.

АМИНОКИСЛОТЫ — низкомолекулярные органические соединения, относящиеся к группе карбоновых кислот, в составе которых присутствует аминогруппа ($-\text{NH}_2$).

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.

АНТИКОНКУРЕНТНЫЙ ТИП ИНГИБИРОВАНИЯ — этот тип ингибирования проявляется при связывании ингибитора только с фермент-субстратным комплексом; при связывании в активном центре фермента ингибитора останавливается каталитический процесс.

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 (дигидрохверцетин, хверцетин, аскорбиновая кислота и др.) используются в качестве пищевых добавок или входят в состав уже готовых пищевых продуктов: молока, масла, сливок, сметаны, сыров и др.

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.

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.

АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ — проявление реакционной способности соединений подавлять активность свободных радикалов и, в частности, активных форм кислорода.

АНТИГЕННАЯ ДЕТЕРМИНАНТА — участок на поверхности белковой глобулы антигена, с которым специфично связываются антитела.

АНТИКОДОН — триплет, содержащийся в составе молекулы тРНК, комплементарный какому-нибудь кодону иРНК.

АПОПТОЗ — это запрограммированная смерть клетки, протекает при участии активных форм кислорода (АФК): $^1\text{O}_2$ (синглетный кислород), O_2^- (супероксидный анион-радикал), HO_2^- (гидроперекисный радикал), OH^- (гидроксильный радикал), RO^- (алкоксильный радикал), RO_2^- (перекисный радикал); условием развития являются нарушения, возникшие в клетках в процессе жизнедеятельности организма.

АПОФЕРМЕНТ — белковая часть холофермента.

АССИМИЛЯЦИЯ (реакции пластического обмена) — процессы направленного синтеза биогенных молекул в живых организмах, протекающие с затратой энергии (АТФ и других высокоэнергетических молекул); к процессам а. можно отнести биосинтез белка, гликонеогенез — синтез гликогена, липогенез — синтез жирных кислот и т. д.

АУКСИНЫ — это группа фитогормонов, синтезирующаяся в клетках образовательных тканей; под действием а. ускоряются рост и регенерация органов, например корнеобразование при вегетативном размножении.

Б

БЕЛОК — высокомолекулярное соединение, образованное за счет последовательного соединения α -L-аминокислот в полипептидную цепь, связанных между собой пептидной связью ($-\text{CO}\sim\text{NH}-$), согласно генетической информации, хранящейся в гене, и обладающих 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.

БЕЛОК-РЕПРЕССОР — белок, выполняющий посреднические функции в регулировании активности гена; б.-р. имеет сродство к гену-оператору и обратимо связывается с ним в комплекс, образование которого блокирует процесс синтеза пре-РНК; т. е. функция б.-р. заключается в том, что он регулирует активность структурных генов, ответственных за синтез пре-РНК; при этом на поверхности белковой глобулы б.-р. имеется участок, в котором специфически могут связываться низкомолекулярные регуляторные молекулы-индукторы.

БЕСКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ — при этом типе ингибирования субстрат и ингибитор способны связываться в активном центре фермента, имея разные участки связывания; в присутствии ингибитора превращение субстрата несколько затрудняется, хотя его связывание несколько улучшается; т. е. ингибитор улучшает связывание субстрата, но ухудшает его превращение.

В

ВЕКТОР — молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК любого происхождения и обеспечивать ее встраивание в ДНК клетки; ими могут быть бактериофаги или плазмиды.

ВИТАМИНЫ — это 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 гиповитаминозов, а их избыток — гипервитаминозы; в. условно можно разделить на растворимые в полярных (водорастворимые: В₁, В₂, В₃, В₄, В₅, В₆, В₈, В₁₂, В₁₃, В₁₅, В_с, С, Р, РР, Н, U, N, убихинона, ПАБК) и неполярных (жирорастворимые: А, D, Е, К) растворителях.

ВОСКИ — сложные эфиры высших многоатомных спиртов и высших жирных кислот.

ВТОРИЧНАЯ 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.

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК — комплементарное расположение двух полинуклеотидных цепей, связанных между собой водородными связями молекул пуриновых и пиримидиновых оснований; пары (А = Т и Т = А) образуют по две водородные связи, а пары (Г \equiv Ц и Ц \equiv Г) — три водородные связи.

Г

ГАНГЛИОЗИДЫ — гликолипиды, в состав которых входит сиаловая кислота.

ГЕН — элементарная единица наследственности, в которой заключена информация обо всех белках и рибонуклеиновых кислотах, участвующих в метаболических процессах, входящих в структуру мембран клеток.

ГЕН-РЕГУЛЯТОР — участок в структуре ДНК, регулирующий активность структурных генов (экспрессию),

содержащий и передающий информацию о белке-репрессоре.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД — набор триплетов в ДНК, представленных тремя последовательно соединенными мононуклеотидами, содержащих информацию о первичной структуре белков, синтезируемых на рибосоме.

ГЕНОМ — совокупность генов, входящих в состав ДНК.

ГИББЕРЕЛЛИНЫ — группа фитогормонов, обладающих самым сильным активирующим действием на рост стебля; поэтому г. используются для получения высокорослых продуктивных кормовых и технических растений.

ГИДРОЛАЗЫ — класс ферментов, катализирующих расщепление связей с участием молекулы воды в качестве нуклеофила.

ГИДРОФИЛЬНОСТЬ (*гр.* гидро — вода, *филео* — люблю, *букв.* любящий воду) — свойства веществ, материалов интенсивно взаимодействовать с водой, хорошо растворяться в воде.

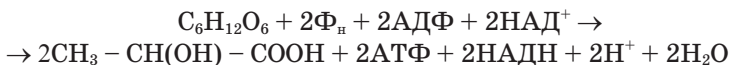
ГИДРОФОБНОСТЬ (*гр.* гидро — вода, *фобос* — страх, боязнь, *букв.* боящийся воды) — свойства веществ, материалов слабо взаимодействовать с водой, плохо растворяться в воде.

ГИДРОФОВНЫЕ 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 локализуются внутри белковой глобулы, избегая контакта с молекулами воды.

ГИСТОНЫ — небольшие щелочные белки (12–30 кДа), преимущественно расположенные в ядре животных и растений и играющие важную роль в структуре хроматина.

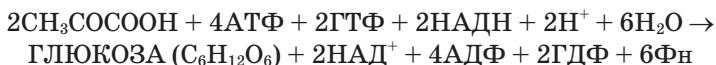
ГЛИКОЛИЗ — анаэробный процесс расщепления одной молекулы глюкозы до двух молекул молочной кислоты при участии ферментов цитоплазмы; в результате г. синтезируются четыре молекулы АТФ, две из которых расходуются в реакциях фосфорилирования глюкозы — гексокиназой и фруктозы-6-фосфат фосфофруктокиназой; три стадии г.

необратимы, они катализируются АТФ-зависимыми ферментами: гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой; суммарная реакция превращения глюкозы в пируват имеет следующий вид:



ГЛИКОКАЛИКС — структурное образование поверхностной мембраны клетки, состоящее из гликолипидов, полярные головки которых вместе с углеводными остатками белков (гликопротеинов) образуют наружное покрытие плазматической мембраны.

ГЛИКОНЕОГЕНЕЗ — процесс синтеза глюкозы из пировиноградной кислоты или производных аминокислот при участии ферментов цитоплазмы; некоторые реакции г. являются общими с реакциями гликолиза; для осуществления г. требуются четыре новые реакции — в обход необратимых, соответствующих реакций гликолиза; эти реакции катализируются пируваткарбоксилазой, фосфоенолпируваткарбоксикиназой, фруктозо-1,6-дифосфотазой и глюкозо-6-фосфотазой; суммарное уравнение реакций г. следующее:



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 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.

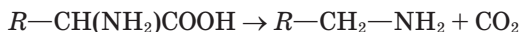
ГЛУТАТИОН (Г—SH) — трипептид, в состав которого входят три последовательно соединенных

аминокислоты (глутаминовая кислота, цистеин, глицин); г. служит донором водорода в окислительно-восстановительных процессах; в организме животных г. является субстратом глутатионпероксидазы, окисление которого сопровождается образованием окисленной формы (Г—S—S—Г); количество восстановленного глутатиона может служить критерием жизнеспособности живых организмов.

Д

ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА (ДНК) — это высокомолекулярное соединение, образованное за счет последовательного связывания нуклеотидов в полинуклеотидную цепь, в упорядоченном расположении которых заложена индивидуальная информация о живом организме, реализуемая через упорядоченный синтез белков и формирование специализированных клеточных структур, определяющих индивидуальные признаки организма; ДНК является полинуклеотидом (биополимер), в составе которого азотистое основание (аденин, гуанин, цитозин и тимин), моносакхарид (дезоксирибоза) и остаток фосфорной кислоты.

ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ — тип ферментативных реакций, сопровождающихся отщеплением от аминокислоты CO_2 с последующим образованием аминов



Реакции декарбоксилирования аминокислот катализируются ферментами, относящимися к классу лиаз (КФ 4), подклассу углерод — углерод лиазы (КФ 4.1), подподклассу карбокси — лиазы (КФ 4.1.1); например, пируваткарбоксилаза, оксалаатдекарбоксилаза, оксалоацетатдекарбоксилаза, ацетоацетатдекарбоксилаза и т. д.

ДЕНАТУРАЦИЯ — представляет собой внутримолекулярное изменение пространственного расположения по отношению друг к другу отдельных пептидных фрагментов в белковой макромолекуле или 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 утрате функциональной активности.

ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ — белки под действием высокой температуры ($50-60^{\circ}\text{C}$) и кислотности среды ($4,0 > \text{pH} > 10,0$) начинают изменять свою пространственную структуру, 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.

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.

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.

ДОМЕНЫ — локализованные участки белковой глобулы, структурно и функционально обособленные и соеди-

ненные между собой короткими участками полипептидной цепи.

И

ИЗОМЕРАЗЫ — это класс ферментов, катализирующих внутримолекулярные превращения (рацемизация или эпимеризация); в названии фермента присутствует слово «рацемаза» (аланин-рацемаза, метионин-рацемаза, гидроксипролин-рацемаза, лактат-рацемаза и др.), «эпимераза» (альдоза-1-эпимераза, рибулозофосфат-4-эпимераза, UDP-глюкуронат-4-эпимераза и др.), «изомераза» (рибозофосфат-изомераза, ксилозофосфат-изомераза, глюкозаминфосфат-изомераза и др.), «таутомераза» (фенилпируват-таутомераза, оксалоацетат-таутомераза), «мутаза» (фосфоглицерат-мутаза, метиласпартат-мутаза и др.): и. подразделяются на 5 подклассов.

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, каталитическими константами), вследствие генетически обусловленных небольших различий в первичной структуре, которые проявляются при формировании нативной структуры ферментов.

ИНГИБИРОВАНИЕ — процесс, при котором ферментативная реакция в присутствии ингибитора замедляется или полностью останавливается, в зависимости от типа ингибирования.

ИНГИБИТОР — вещество, замедляющее или полностью останавливающее скорость ферментативной реакции, которое по той или иной причине частично или полностью препятствует образованию продуктивного фермент-субстратного комплекса; ингибиторами могут быть лекарственные препараты, яды и другие вещества.

ИНТРОН (вставка) — участок в первичной последовательности ДНК и транскрибируемый в структуру пре-РНК, информативность которого пока не установлена, вырезаемый ферментами в процессе сплайсинга из пре-РНК.

К

КАТАБОЛИЗМ (катаболические пути) — процессы ферментативного расщепления биологических молекул (углеводов, жиров и белков), сопровождающиеся выделением свободной энергии и запасением ее в форме энергии фосфатных связей АТФ.

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ КОНСТАНТА (k_{cat}) — величина, показывающая эффективность превращения субстрата в активном центре фермента; при этом чем большие значения принимает к. к., тем быстрее и эффективнее превращается субстрат в активном центре фермента, в ходе каталитического процесса.

КИНЕТОХОР — белковый комплекс, собирающийся на специализированной последовательности хромосомной ДНК (центромера), к которому присоединяются микротрубочки веретина, образующиеся во время деления клетки.

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 слои 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.

КЛЕТОЧНЫЙ ЦЕНТР — органоид, находящийся вблизи ядра клеток; состоит из двух маленьких телец цилиндрической формы (центриолей), расположенных под прямым углом друг к другу; к. ц. содержат ДНК и относятся к самовоспроизводящимся органоидам цитоплазмы; к. ц. участвуют в делении клетки, с них начинается рост микротрубочек, формирующих веретено деления.

КОДОН — это три последовательно соединенных мононуклеотида в иРНК, кодирующих определенную

аминокислоту; генетический код для аминокислот является вырожденным, так как некоторые аминокислоты закодированы 2–6 кодонами; всего имеется 64 кодона, три из которых не кодируют никакой аминокислоты; УАГ, УАА и УГА — обозначают конец матрицы: на этих триплетах обрывается дальнейшее наращивание пептидной цепи — терминирующие триплеты.

КОМПАРТМЕНТЫ — отдельные специализированные элементы системы; так, например, в клетках это органоиды, мультиферментные комплексы и т. д.

КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ ДНК — специфическое расположение азотистых оснований двух цепочек ДНК, избирательно соединенных между собой водородными связями ($A = T, G \equiv C$), обеспечивающее взаимную повторяемость нуклеотидов в цепях ДНК в обратной последовательности.

КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ — это тип ингибирования, когда субстрат и ингибитор конкурируют за участок связывания в активном центре фермента, причем связывание ингибитора препятствует последующему связыванию субстрата и его превращению.

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.

КОНСТАНТА МИХАЭЛИСА (K_m) — 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.

КОФАКТОР (кофермент) — низкомолекулярное соединение небелковой природы, связанное с апобелком нековалентными связями в активном центре и участвующее в каталитическом процессе; в отсутствие кофермента фермент не активен и каталитическая реакция не протекает; к коферментам относятся: НАД, НАДФ, ФАД, ТПФ и др.;

предшественниками некоторых к. являются витамины (B_1 (тиамин) \rightarrow ТПФ (тиаминпирофосфат), B_2 (рибофлавин) \rightarrow ФАД (флавинадениндинуклеотид), B_3 (пантотеновая кислота) \rightarrow SH-КоА, B_5 (никотиновая кислота) \rightarrow ФП (фосфопиридоксин), B_{12} (цианокобаламин) \rightarrow МК (метилкобаламин), B_c (фолиевая кислота) \rightarrow ТГФК (тетрагидрофолиевая кислота), Н (биотин) \rightarrow КБ (карбоксибиотин).

КЭП — группировка в составе гена и иРНК, начинающаяся с 7-метилгуанозина; к. необходим для стабилизации иРНК, предохраняя ее от расщепления 5'-эндонуклеазами.

Л

ЛИАЗЫ — это класс ферментов, катализирующих реакции разрыва $C-C$, $C-O$, $C-N$ и других связей в субстрате без присоединения молекулы воды или окисления.

ЛИГАЗЫ (синтетазы) — это класс ферментов, катализирующих реакции соединения двух и более молекул, используя АТФ.

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 другие органические соединения при внутриклеточном пищеварении; л. обеспечивают постоянство состава веществ в клетке; л. 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.

ЛИПИДЫ — это гетерогенная группа органических веществ, нерастворимых или плохо растворимых в полярных растворителях, но хорошо растворимых в неполярных растворителях; различают следующие группы липидов: жирные кислоты, нейтральные липиды, фосфолипиды, сфинголипиды, воска, стероиды.

ЛИПОГЕНЕЗ — процесс синтеза жирных кислот; протекает в цитоплазме клетки, в качестве восстановителя при

л. используется НАДФН, образующийся в пентозофосфатном цикле; синтез жирных кислот происходит при участии ацилпереносящего белка.

ЛИПОЛИЗ — процесс окисления высших жирных кислот под действием ферментов митохондриального матрикса; л. протекает в митохондриях, куда жирные кислоты доставляются с помощью переносчика — карнитина; в процессе л. происходят циклические превращения молекул жирных кислот с отщеплением от них двухуглеродных производных КоА ($\text{CH}_3\text{—CO—SКоА}$) (β -окисление жирных кислот) или одноуглеродных производных КоА (α -окисление жирных кислот); протекание одного цикла окисления жирной кислоты сопровождается синтезом по одной молекуле ФАДН и НАДН; л. является важнейшим энергетическим процессом в клетке, который обеспечивает синтез самого большого количества АТФ; например, при окислении одной молекулы пальмитата ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$), образуется 131 молекула АТФ, две из которых используются для активации пальмитата.

ЛИПОПРОТЕИНЫ — это 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).

М

МАКРОЭЛЕМЕНТЫ — это элементы биогенных систем, присутствующие в организме животных и человека в миллимолярных и выше концентрациях; к этой группе элементов можно отнести Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Р, Cl⁻, S; при этом их действие проявляется только в составе белков и биологически активных соединений или биогенных структур.

МАТРИЧНАЯ (информационная) РНК — синтезируется в процессе транскрипции и содержит точную копию генетической информации, закодированной в определенном участке ДНК; информация об аминокислотах, которые

будут включены в первичную структуру полипептидной цепи, передается с помощью кодонов (триплетов) в составе иРНК.

МЕМБРАНЫ (от *лат.* membrana — перепонка) — специализированные структурные элементы клетки и ее органоидов, состоящие из липидов (фосфолипидов, насыщенных и ненасыщенных жирных кислот), стерина, гликолипидов и белков; м. выполняют следующие основные функции: барьерную, транспортную, осмотическую, электрическую, биосинтетическую, секреторную, пищеварительную, рецепторно регуляторную и др.

МЕТАБОЛИЗМ (обмен веществ) — совокупность биохимических процессов, протекающих в организме и обеспечивающих его жизнеспособность.

МЕТАБОЛИТЫ — промежуточные продукты ферментативных реакций, протекающих в клетке.

МЕТАБОЛОН — надмолекулярный комплекс ферментов, катализирующих последовательные стадии метаболического пути и структурных элементов клетки, т. е. в состав м. включается не только комплекс ферментов, выполняющих определенную метаболическую функцию, но и опорный участок клеточной структуры (участок мембраны, цитоскелет и т. п.), на котором комплекс адсорбирован; примером такого м. может служить комплекс гликолитических ферментов вместе с белками в мембране эритроцитов или актин в составе цитоскелета.

МИКРОЭЛЕМЕНТЫ — к группе микроэлементов относят Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mo^{2+} , I^- , Cr^{3+} , F^- , Br^- ; действие элементов проявляется только в составе белков и биологически активных соединений.

МИТОХОНДРИИ (от *греч.* mitos — нить, chondrion — 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 ДНК.

МИЦЕЛЛЫ — это упорядоченные структуры гетерогенного состава, чаще всего шарообразной формы и различных размеров, формирующиеся неполярными молекулами в полярной среде или полярными молекулами в неполярной среде (обращенные мицеллы), стабилизированные за счет слабых связей (гидрофобных, гидрофильных, ионных, водородных и др.) в ассоциированные образования, под воздействием молекул растворителя и условий среды (температура, рН, ионная сила и др.).

МОБИЛЬНЫЕ ДИСПЕРГИРОВАННЫЕ ГЕНЫ (МДГ) — гены, представленные в ДНК в виде нескольких копий и перемещающиеся (мигрирующие элементы ДНК) из одной части генома в другие.

Н

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.

НЕКОНКУРЕНТНАЯ АКТИВАЦИЯ — проявляется в случае, если субстрат и активатор связываются независимо в различных участках активного центра фермента; при этом образуется тройной комплекс, в составе которого фермент — субстрат — активатор; связывание активатора ускоряет протекание каталитического процесса.

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.

НИКИ — одонитевидные разрывы в структуре ДНК.
НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИД (НАД⁺) — сложное биологически активное соединение, функционально активной частью которого является никотинамид — амидированное производное витамина РР; НАД⁺ выполняет роль акцептора протонов и электронов в реакциях, катализируемых окислительно-восстановительными ферментами, восстанавливаясь до НАДН; в митохондриях при окислении одной молекулы НАДН синтезируются три молекулы АТФ.

НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДФОСФАТ (НАДФ⁺) — фосфорилированная форма НАД⁺; участвует в катализируемых окислительно-восстановительными ферментами реакциях в качестве кофермента; восстановленная форма НАДФН генерируется преимущественно ферментами пентозофосфатного цикла и используется в процессе синтеза жирных кислот — липогенезе.

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.

НУКЛЕОЗИДЫ — соединения, в которых азотистые основания (пурины и пиримидины) связаны N-гликозидной связью с рибозой или дезоксирибозой (аденозин, гуанозин, тимидин, уридин, цитидин).

НУКЛЕОТИДЫ — фосфорные эфиры нуклеозидов; например, адениловая кислота (АМФ), гуаниловая кислота (ГМФ), цитидиловая кислота (ЦМФ), уридиловая кислота (УМФ), тимидиловая кислота (ТМФ), а также могут называться как аденозин-5'-фосфат, гуанозин-5'-фосфат, цитидин-5'-фосфат, уридин-5'-фосфат, тимидин-5'-фосфат.

О

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ — процесс образования АТФ (процесс фосфорилирования АДФ), сопряженного с транспортом электронов по цепи переносчиков от НАДН или ФАДН к О₂ (процесс окисления).

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС — стресс, возникающий у организмов, под воздействием свободных радикалов кислорода; живые организмы активно потребляют кислород, который может вызывать окислительное повреждение тканей; в развитии окислительного стресса играют роль активные формы кислорода (АФК): O_2^- , H_2O_2 , $HO\cdot$, $HOCl$ и др.; накопление АФК в клетках приводит к нарушению протекания процессов транскрипции и репликации, изменяет состав липидов мембран; супероксидные радикалы модифицируют белки, нарушают структуру ДНК, разрушают гормоны и другие функционально активные вещества.

ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ — это 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, ксантиноксидаза, пируватоксидаза, оксалатоксидаза, оксидаза *L*-аминокислот, аминоксидоксидаза и др.); представителями оксидоредуктаз в молоке являются ферменты: пероксидаза, каталаза.

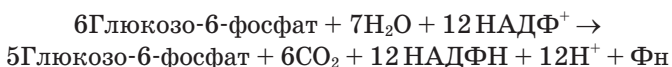
ОЛИГОСАХАРИДЫ — производные углеводов, содержащие от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных *о*-гликозидной связью; основными о. являются лактоза, сахароза, мальтоза, целлобиоза, трегалоза.

ОПЕРАТОР — регуляторный участок ДНК, служащий местом связывания репрессоров — белков, контролирующих синтез пре-РНК.

ОПЕРОН (транскриптон) — это участок в структуре гена, являющийся элементарной единицей транскрипции, ограниченный промотором и терминатором, участвующий в процессе биосинтеза молекулы пре-РНК у прокариот и эукариот; в структуре оперона различают два участка: информативный и неинформативный.

П

ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ — процесс, в котором происходит ступенчатый окислительный распад гексоз до пентоз и других сахаров с более короткой цепью; значение п. п. о. у. состоит в том, что он генерирует в цитоплазме НАДФН, необходимый для синтеза жирных кислот и стероидов; активность пентозофосфатного пути особенно высока в клетках печени, молочной железы, жировой ткани и коре надпочечников; п. п. о. у. поставляет пентозофосфаты для синтеза нуклеиновых кислот и нуклеотидов; суммарное уравнение реакций п. п. о. у. имеет следующий вид:



в п. п. о. у. АТФ не синтезируется и не расходуется.

ПЕПТИДНАЯ СВЯЗЬ — ковалентная полярная связь, образованная между углеродом одной аминокислоты и азотом другой, при соединении двух аминокислот между собой; п.с. относится к ковалентной полярной связи, обеспечивает стабильность первичной структуры белков ($-\text{NH}-\text{CO}-$).

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ — последовательное соединение α -аминокислот в полипептидную цепь, связанных между собой за счет пептидной связи, согласно генетической информации, заложенной в ДНК.

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК — структура, образованная за счет последовательного соединения мононуклеотидов в полинуклеотидную цепь, связанных между собой сложноэфирной связью, образованной фосфатными остатками ($3',5'$ -фосфодиэфирная связь) одного мононуклеотида.

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ — процесс окисления ненасыщенных жирных кислот продуктами свободнорадикального окисления.

ПЛАЗМАЛЕММА — клеточная мембрана.

ПЛАЗМИДЫ — добавочные маленькие кольцевые молекулы ДНК, присутствие которых необязательно для жизни клетки; п., содержащиеся в цитоплазме многих

бактерий, способны автономно размножаться, стабильно наследоваться, т. е. сохраняться без специфической селекции во внехромосомном состоянии; кроме бактерий, п. иногда содержат сине-зеленые водоросли, а из эукариотических организмов — дрожжи.

ПОЛИСАХАРИДЫ — высокомолекулярные полимерные производные углеводов, образованные из последовательно соединенных моносахаридов, связанных между собой *о*-гликозидной связью; основными представителями п. являются: крахмал, гликоген, целлюлоза, клетчатка, хитин, агар-агар.

ПОЛИНДРОМЫ (перевертыши) — участки ДНК, содержащие последовательности нуклеотидов, повторяющиеся в обратном порядке.

ПРАЙМАЗА — фермент, синтезирующий затравки (праймеры).

ПРАЙМЕР — небольшой участок ДНК, используемый в качестве затравки при ее синтезе.

ПРИЗНАК — это совокупность показателей живого организма, проявляющих его индивидуальные свойства и особенности строения.

ПРОМОТОР — участок ДНК, служащий местом связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы, участвующий в регуляции синтеза пре-РНК.

ПРОПЛАСТИДЫ — незрелые пластиды, содержащиеся в эмбриональных клетках растений; п. имеют оболочку, состоящую из двух цитоплазматических мембран, и полость, заполненную бесструктурным матриксом; внутренняя мембранная структура п. развита очень слабо, представлена обычно одиночными цистернами или трубочками и пузырьками, расположенными без определенной ориентации; п. могут превращаться в лейкопласты, хлоропласты и хромопласты.

ПРОСТЕТИЧЕСКАЯ ГРУППА — низкомолекулярное соединение небелковой природы, прочно связанное с апо-белком, выполняющее активную роль в ферментативном катализе, при отсутствии которой фермент не активен; к п. г. относятся: гем в пероксидазе и каталазе, изоаллоксациновое кольцо в флавиновых ферментах и др.

ПРОТЕОЛИЗ — процесс гидролитического разрушения нативной структуры белков; большинство внутриклеточных белков заканчивают существование в результате протеолитического гидролиза, превращаются в небольшие пептиды и свободные аминокислоты, которые утилизируются в синтезе новых белков.

ПРОЦЕССИНГ (посттранскрипционная модификация) — процесс формирования зрелых молекул РНК (тРНК, иРНК, рРНК) из неактивного предшественника (пре-РНК) в эукариотической клетке; в результате п. происходят следующие действия: отрезание «лишних» концевых последовательностей; расщепление длинных первичных транскриптов, вырезание их частей, транскрибированных с интронов; добавление нуклеозидов к 3'-концу транскрипта; добавление нуклеотидов к 5'-концу транскрипта; модификация оснований в транскрипте; при этом конечным этапом п. является метилирование мРНК, в результате которого на каждые 400 остатков аденинов приходится один остаток 6-метиладенина.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) — это метод, который позволяет найти в исследуемом клиническом материале небольшой участок генетической информации любого организма среди огромного количества других участков и многократно размножить его; метод ПЦР основан на принципе естественной репликации ДНК, включающем расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК и комплементарное дополнение обеих.

Р

РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК — это белок, полученный искусственным путем, в состав полипептидной цепи которого введены чужеродные аминокислоты.

РЕКОМБИНАНТНАЯ ДНК — это измененные, химерные молекулы ДНК, составленные из фрагментов разного происхождения, или в структуру нативной ДНК введены чужеродные последовательности или новые гены.

РЕПАРАЦИЯ — процесс восстановления поврежденных участков ДНК.

РЕПЛИКАЦИЯ — процесс синтеза ДНК путем ее удвоения; синтез одной дочерней цепи происходит в направлении от $5' \rightarrow 3'$, осуществляется непрерывно, в то время как синтез второй цепи в направлении от $3' \rightarrow 5'$ происходит прерывисто путем соединения коротких фрагментов, называемых фрагментами Оказаки, синтезируемых в противоположном направлении.

РЕПРЕССИЯ ГЕНОВ — ингибирование процесса транскрипции (или трансляции) белком-репрессором за счет его специфического связывания с регуляторным участком в структуре ДНК или РНК.

РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ — это участки клеточного генома, в которых закодированы обратные транскриптазы.

С

САЙТ — короткая последовательность нуклеотидов в составе ДНК, РНК или аминокислот в белке.

САТЕЛЛИТНАЯ ДНК (от *лат.* *satellit* — спутник, сопровождающий) ДНК эукариот, содержащая многократно повторяющиеся последовательности нуклеотидов.

СВИВЕЛАЗЫ — ферменты, устраняющие суперспирализацию ДНК, разрывая одну из цепей ДНК, благодаря чему становится возможным раскрытие этой цепи с последующим замыканием разрыва.

СВОБОДНЫЙ РАДИКАЛ — атом или молекула, содержащая неспаренный электрон; с. р. обладают высокой реакционной способностью, ядовиты для живых организмов, могут вызывать мутации; представителями с. р. являются: O_2^- — супероксидрадикал, $OH\cdot$ — гидроксид радикал, HO_2 — гидропероксидный радикал и др.

СИНЕРГИСТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ — наблюдается в том случае, если связывание активатора в активном центре фермента увеличивает сродство фермента к субстрату, проявляемое в понижении величины константы связывания (K_s или K_m); при этом значение k_{cat} не меняется, а график в координатах Лайнуивера — Берка имеет вид семейства прямых с точкой пересечения на оси ординат.

СМЕШАННЫЕ ТИПЫ ИНГИБИРОВАНИЯ — проявляются в случае взаимного влияния субстрата и ингибитора

как при их связывании, так и при превращении субстрата; при этом графики в координатах Лайнуивера — Берка принимают вид семейства прямых, с общей точкой пересечения в правом верхнем, левом верхнем или левом нижнем квадрате; постоянные α и β характеризуют степень влияния ингибитора на каталитический процесс.

СПЛАЙСОСОМА — специализированная внутриядерная многокомпонентная структура, включающая десятки белков и набор малых ядерных РНК, предназначенных для осуществления сплайсинга.

СТЕРИДЫ — эфиры стеринов и высших жирных кислот.

СТЕРИНЫ — стероиды, имеющие от 8 до 10 углеродных атомов в боковой цепи у C-17 и свободную гидроксильную группу в положении 3; основным представителем с. является холестерин.

СТЕРОИДЫ — это группа функционально активных соединений, основным компонентом которых является пергидрофенантренциклопентан; к с. относятся соединения, синтезируемые растениями: сердечные гликозиды, алкалоиды, регуляторы роста растений.

СТРУКТУРНЫЕ ГЕНЫ — гены, несущие информацию о структуре специфических белков.

СПЕЙСЕР (от *англ.* spacer — промежуток) — участок ДНК, отделяющий один ген от другого; с. не кодирует белки.

СПЛАЙСИНГ — конечный процесс формирования функционально активной иРНК из пре-РНК, путем вырезания из первичного транскрипта интронных (вставочных) участков с последующим соединением между собой экзонов.

СУБСТРАТ — вещество, которое претерпевает химические изменения в процессе химической реакции, катализируемой ферментом; например, глюкоза является субстратом фермента гексокиназы, пируват — пируватдекарбоксилазы, молочная кислота — лактатдегидрогеназы и т. д.

СФИНГОЛИПИДЫ — сложные эфиры, составными частями которых являются ненасыщенный аминоспирт сфингозин или дигидросфингозин, жирные кислоты, фосфат и полярная группировка, в составе холина, или этаноламина, или серина и др.

Т

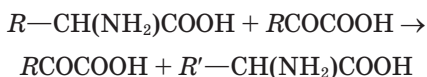
ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ В ДНК (от *англ.* tandem — расположенные гуськом) — многократно повторяющиеся гены, кодирующие транспортные тРНК, и гены, кодирующие белки-гистоны и отдельные цепи иммуноглобулинов.

ТЕЛОМЕРАЗА (РНК-зависимая ДНК-полимераза или обратная транскриптаза) — фермент, синтезирующий тандемно повторяющиеся сегменты ДНК, из которых состоит G-цепь теломерной ДНК.

ТЕЛОМЕРЫ (от *греч.* телос — конец и мерос — часть) — это специализированные концевые районы линейной хромосомной ДНК, состоящей из многократно повторяющихся коротких нуклеотидных последовательностей; т. построены из дезоксинуклеопротейдов (комплексов ДНК с белком).

ТИАМИНПИРОФОСФАТ (кокарбоксилаза, ТПФ) — фосфорилированное производное витамина В₁ (тиамина); участвует в реакциях декарбоксилирования α-кетокислот, а также в расщеплении и синтезе оксикетонов; тиамин зависимыми ферментами являются пируватдекарбоксилаза, фосфокетолаза, транскетолаза и др.

ТРАНСАМИНИРОВАНИЕ (впервые процесс т. был открыт российским ученым А. Е. Бранштейном) — тип ферментативных реакций, катализируемых трансаминазами (КФ 2.6.1), которые осуществляют перенос аминокислоты с аминокислоты на кетокислоту.



Коферментом трансаминаз служит фосфопиридоксаль, альдегидная группа которого используется для переноса аминокислоты с аминокислоты на кетокислоту.

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ — растения, у которых в геном встраивают чужеродные фрагменты ДНК, проявляющие свойства, не характерные для данного организма в природе.

ТРАНСКРИПЦИЯ (от *англ.* transcription — переписывание) — процесс синтеза пре-РНК, путем переписывания информации с ДНК.

ТРАНСЛЯЦИЯ (от *англ.* translation — перевод) — процесс перевода информации, заложенной в последовательности нуклеотидов иРНК, в последовательность аминокислотных остатков полипептидной цепи.

ТРАНСПОЗОНЫ (Тп-элементы) — сегменты ДНК, содержащие гены, не имеющие непосредственного отношения к транспозиции; т. могут нести гены устойчивости к антибиотикам, гены токсинов или гены дополнительных ферментов клеточного метаболизма.

ТРАНСПОРТНАЯ РНК (тРНК) — небольшие последовательности (75–90) мононуклеотидов, содержащие антикодон из 3 мононуклеотидов, комплементарный кодону для аминокислоты в информационной РНК, расположенный в тРНК в месте локализации антикодоновой петли, недалеко от вариабельной петли; функция тРНК состоит в том, чтобы транспортировать аминокислоты к рибосоме и вставлять их в определенные участки полипептидной цепи при ее биосинтезе (процесс трансляции), переводя последовательность нуклеотидов в кодоне иРНК в последовательность аминокислотных остатков первичной структуры белка.

ТРАНСФЕРАЗЫ — это класс ферментов, катализирующих реакции переноса различных групп (метильные, гидроксиметильные, формильные, карбоксильные, карбамойльные, альдегидные, ацильные, алкильные, аминные и др.) от одного субстрата (донор) к другому (акцептор).

ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА — определенное расположение полипептидной цепи в пространстве, стабилизированное в основном за счет слабых (гидрофобных, гидрофильных и ионных), а также несколькими ковалентными дисульфидными ($-S-S-$) связями.

ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК — определенное пространственное расположение двух полинуклеотидных цепей ДНК, комплементарно связанных между собой за счет водородных связей, приобретающих устойчивую структуру, стабилизированную нековалентными связями с белками (гистонами).

ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНЫ (нейтральные липиды) — сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот.

У

УГЛЕВОДЫ — вещества органической природы, основными компонентами которых являются альдегиды и кетоны многоатомных спиртов, а также полимеры этих соединений; у. условно делят на три группы: моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

УРАВНЕНИЕ ИДИ — это один из способов алгебраического преобразования уравнения Михаэлиса — Ментен

$$v_0 = V_m - K_m \frac{v_0}{S_0};$$

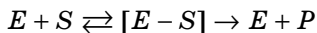
при построении графика экспериментальных данных в координатах Иди ($v_0, v_0/S_0$) полученная прямая линия пересекает ось ординат в точке V_m с тангенсом угла наклона $-K_m$.

УРАВНЕНИЕ ЛАЙНУИВЕРА — БЕРКА — это способ алгебраического преобразования уравнения Михаэлиса — Ментен с последующей линеаризацией экспериментальных данных в двойных обратных величинах

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{S_0};$$

график зависимости в координатах Лайнуивера — Берка ($1/v_0, 1/S_0$) имеет вид прямой линии, пересекающей ось абсцисс и ординат в точках $-1/K_m$ и $1/V_m$ соответственно.

УРАВНЕНИЕ МИХАЭЛИСА — МЕНТЕН — основное уравнение ферментативной кинетики; впервые выведено в 1913 г.; описывает поведение субстрата в случае простой односубстратной двухстадийной ферментативной реакции, анализируя начальную скорость ферментативного процесса, при условии, что $S \approx K_s \approx K_m$, по следующей общепринятой схеме:



$$v_0 = \frac{k_{\text{cat}} E_0 S_0}{K_m + S_0};$$

у. м-м. устанавливает зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата и фермента и проявляет величины каталитических констант (k_{cat}, K_m) в случае преобразования его в координатах Лайнуивера — Берка.

Ф

ФАТОМЕРА (от *лат.* *fatum* — судьба) — это одна из структур эукариотического генома, способная контролировать клеточные детерминации и, следовательно, дальнейшую судьбу любой данной группы клеток, формирующих ту или иную морфологическую структуру; т. е. это участок генома, ответственный за проявление определенного анатомического признака.

ФЕНОТИП — сумма всех развивающихся признаков и свойств организма в конкретных условиях его онтогенеза; фенотип формируется на основе генотипа под влиянием факторов внутренней и внешней среды.

ФЕРМЕНТЫ (энзимы, от *англ.* *enzyme*) — белки, обладающие каталитической активностью, способные ускорять протекание химических реакций в живых организмах.

ФИТОГОРМОНЫ — низкомолекулярные биологически активные вещества (ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизины и др.), регулирующие процессы запуска и протекание различных биохимических процессов в растительной клетке; ф. контролируют процессы роста растений, созревание, старение, транспорта и т. д.

ФЛАВИНАДЕНИНДИНУКЛЕОТИД (ФАД) — сложное биологическое соединение, предшественником которого является витамин В₂ (рибофлавин); ФАД выполняет роль донора и акцептора электронов и протонов в окислительно-восстановительных реакциях, катализируемых специфическими 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 синтезируются две молекулы АТФ.

ФОЛДИНГ — процесс сворачивания полипептидной цепи в пространственную высокоспецифическую структуру, которая формируется полностью после завершения биосинтеза полипептида на рибосоме; в результате фолдинга в водных растворах у водорастворимого полипептида уменьшается свободная энергия, гидрофобные остатки аминокислот упаковываются преимущественно внутри молекулы,

а гидрофильные остатки располагаются на поверхности белковой глобулы; ф. в клетках эукариот обеспечивается специфическими белками, называемыми шаперонами, которые необходимы для эффективного формирования третичной структуры полипептидных цепей других белков, но не входят в состав конечной белковой структуры; новосинтезированные белки после выхода с рибосом для правильного функционирования должны укладываться в стабильные трехмерные структуры и оставаться такими на протяжении всей функциональной жизни клетки.

ФОСФОЛИПИДЫ — сложные эфиры трехатомного спирта глицерина с высшими жирными кислотами и фосфорной кислотой; последняя соединяется сложноэфирной связью с полярной группировкой, в составе которой может быть холин, этаноламин, серин, инозит и др.

ФОТОСИНТЕЗ — окислительно-восстановительный процесс, в котором вода служит восстановителем, при этом сама окисляется (фотодиссоциация воды), а CO_2 выступает в качестве окислителя, при этом восстанавливается до углевода.

ФРАГМЕНТЫ ОКАЗАКИ — небольшие участки нуклеотидов, образующиеся на обеих цепях матричной ДНК в процессе ее синтеза, размером в 1–2 тыс. нуклеотидов, которые с течением времени укрупняются, образуя непрерывные дочерние цепи ДНК; наличие фрагментов Оказаки указывает на то, что синтез ДНК происходит прерывисто, отдельными фрагментами.

Х

ХЕЛИКАЗЫ — ферменты, расплетающие двойную спираль ДНК и удерживающие ее одиночные цепи от воссоединения.

ХЕМОТРОФЫ — организмы, получающие энергию в результате окислительно-восстановительных реакций.

ХЕМОСИНТЕЗ — процесс ассимиляции (усвоения) CO_2 за счет энергии, выделяемой при окислении неорганических соединений.

ХИРАЛЬНЫЙ АТОМ УГЛЕРОДА — атом углерода, у которого все четыре заместителя различаются между собой.

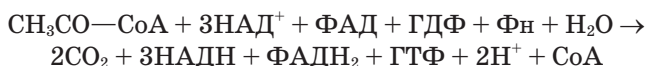
ХОЛОФЕРМЕНТ — эта активная форма фермента, состоящая из кофермента и белка (белковой части фермента).

ХРОМОПЛАСТЫ — незеленые пигменты, окрашенные преимущественно в желто-красный цвет; х. имеют двухслойную мембрану, в матриксе которых содержатся каротиноиды и биологически активные вещества, придающие им характерную окраску и функцию; содержание х. в лепестках и плодах придает им своеобразную окраску.

ХРОНОМЕРА — это концевая теломерная фатомера, не подвергающаяся амплификации и ответственная за измерение биологического времени в ходе онтогенеза.

Ц

ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ (цикл Кребса) — аэробный процесс окисления биологических молекул (аминокислот, жирных кислот и углеводов) до CO_2 и H_2O ; ц. т. к. протекает в митохондриях, обеспечивая генерацию восстановленных коферментов (НАДН и ФАДН₂); суммарная реакция ц. т. к. имеет следующий вид:



Ч

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА — структура, сформированная из двух и более субъединиц (мономерных полипептидных цепей, имеющих третичную структуру), с образованием единого функционально активного комплекса, стабилизированного за счет нековалентных связей (гидрофобных, гидрофильных и ионных) и выполняющих специфичную функцию.

Ш

ШАПЕРОНЫ (от *англ.* chaperone) — белки про- и эукариотических клеток, управляющие процессом правильной нековалентной укладки полипептидной цепи или полипептидсодержащих структур *in vivo* в упорядоченные третичные структуры.

Э

ЭКЗОНЫ — участки в структуре ДНК и пре-РНК, несущие генетическую информацию о структуре белка и чередующиеся с интронами; в процессе сплайсинга интронные участки вырезаются, а экзоны сшиваются между собой, образуя функционально активную иРНК; считывание информации с иРНК происходит на рибосоме, обеспечивая упорядоченный синтез полинуклеотидной цепочки белка.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ — активирование процессов транскрипции, т. е. биосинтеза пре-РНК, на одной из полинуклеотидных цепочек ДНК и трансляции — биосинтеза белка на мРНК.

ЭНХАНСЕРЫ — последовательности ДНК, усиливающие транскрипцию при взаимодействии со специфическими белками.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ — обратимые изменения активности генов в процессе индивидуального развития организма, не связанные с нарушением нуклеотидной последовательности ДНК, но приводящие к сохранению неактивного или активного состояния генов в ряду клеточных поколений.

Я

ЯДРО — органоид, обеспечивающий хранение и передачу генетической (наследственной) информации; основными элементами я. являются ДНК, РНК и белки, комплекс которых обеспечивает протекание в ядре основных трансинформационных процессов; в я. протекают процессы, обеспечивающие удвоение ДНК, — репликация и процессы передачи генетической информации с ДНК → пре-РНК → иРНК — транскрипция и процессинг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айвазян, С. А. Прикладная статистика : основы моделирования и первичная обработка данных / С. А. Айвазян, И. С. Енюхов, Л. Д. Мешалкин. — М. : Финансы и статистика, 1983. — 471 с.
2. Анисимов, А. А. Основы биохимии / А. А. Анисимов, А. Н. Леонтьев, И. Ф. Александрова [и др.] ; под ред. А. А. Анисимова. — М. : Высшая школа, 1986. — 551 с.
3. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин — М. : Медицина, 2002. — 528 с.
4. Березин, И. В. Практический курс химической и ферментативной кинетики / И. В. Березин, А. А. Клесю. — М. : Изд-во МГУ, 1976. — 320 с.
5. Биотехнология растений : культура клеток / под ред. В. И. Негрука. — М. : Агропромиздат, 1989. — 280 с.
6. Биохимические методы в физиологии растений / под ред. О. А. Павлинова. — М. : Наука, 1971. — 227 с.
7. Болдырев, А. А. Введение в биохимию мембран. — М. : Высш. шк., 1986. — 112 с.
8. Бохински, Р. Современные воззрения в биохимии. — М. : Мир, 1987. — 544 с.
9. Вилли, К. Биология. — М. : Мир, 1968. — 808 с.
10. Воскресенский, П. И. Техника лабораторных работ. — М. : Химия, 1973. — 717 с.
11. Гвоздев, В. А. Регуляция активности генов при созревании клеточных РНК // СОЖ. — 1996. — № 12. — С. 11–18.
12. Гвоздев, В. А. Механизмы регуляции активности генов в процессе транскрипции // СОЖ. — 1996. — № 1. — С. 23–31.
13. Гельфман, М. И. Коллоидная химия / М. И. Гельфман, О. В. Ковалевич, В. П. Юстратов. — СПб. : Лань, 2003. — 336 с.
14. Георгиевский, В. П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, С. Е. Дмитрук. — Новосибирск : Наука, 1990. — 333 с.
15. Герасимов, Я. И. Курс физической химии : в 2 т. / Я. И. Герасимов, В. П. Древинг, Е. Н. Еремин [и др.]. — М. : Химия, 1969.
16. Гордон, А. Спутник химика / А. Гордон, Р. Форд. — М. : Мир, 1976. — 541 с.

17. Грин, Н. Биология : в 3 т. / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор. — М. : Мир, 1990.
18. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. — М. : Академия, 2003. — 464 с.
19. Гусев, Н. Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Ч. 1 : Классификация и структура // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 5. — С. 2–9.
20. Гусев, Н. Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Ч. 2 : Структура и механизм функционирования // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 5. — С. 10–16.
21. Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. — М. : Мир, 1991. — 543 с.
22. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта. — М. : Колос, 1979. — 416 с.
23. Дубинин, Н. П. Экспериментальное исследование интеграции наследственных систем в процессах эволюции популяций // Журн. общ. биол. — 1948. — № 9. — С. 3–12.
24. Жученко, А. А. Экологическая генетика культурных растений (адаптация, рекомбиногенез, агробиоценоз). — Кишинев : Штиинца, 1980. — 230 с.
25. Жученко, А. А. Адаптационный потенциал культурных растений (эколого-генетические основы). — Кишинев : Штиинца, 1988. — 766 с.
26. Жученко, А. А. Адаптивное растениеводство. — Кишинев : Штиинца, 1990. — 376 с.
27. Жученко, А. А. Проблемы адаптации в современном сельском хозяйстве // С.-х. биол. — 1993. — № 5. — С. 3–35.
28. Захаров, Л. Н. Техника безопасности в химических лабораториях. — Л. : Химия, 1991. — 336 с.
29. Иванов, Б. И. Пожарная безопасность в химических лабораториях. — М. : Химия, 1988. — 111 с.
30. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. — М. : Высшая школа, 1998. — 479 с.
31. Ковальский, В. В. Методы определения микроэлементов в органах и тканях животных, растениях и почвах / В. В. Ковальский, А. Д. Гололобов. — М. : Колос, 1969. — 272 с.
32. Корочкин, Л. И. Как гены контролируют развитие клеток // СОЖ. — 1996. — № 1. — С. 17–22.
33. Кочетков, Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М. : Высш. шк., 1971. — 352 с.
34. Кретович, В. Л. Биохимия растений. — М. : Высш. шк., 1986. — 503 с.
35. Криценко, В. П. Практикум по технике лабораторных работ / В. П. Криценко, В. С. Агеева. — М. : Агропромиздат, 1987. — 288 с.

36. Лабораторный цифровой рН-метр. Инструкция по эксплуатации. — Будапешт : РАДЕЛКИС, 1986. — 31 с.
37. *Лакин, Г. Ф.* Биометрия. — М. : Высш. шк., 1990. — 352 с.
38. *Левицкий, Д. О.* Кальций и биологические мембраны. — М. : Высш. шк., 1990.
39. *Ленинджер, А.* Биохимия. — М. : Мир, 1976. — 957 с.
40. *Ленский, А. С.* Введение в бионеорганическую и биофизическую химию. — М. : Высш. шк., 1989. — 256 с.
41. *Лисенков, А. Н.* Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов. — М. : Медицина, 1979. — 344 с.
42. *Лурье, Ю. Ю.* Справочник по аналитической химии. — М. : Химия, 1980. — 364 с.
43. *Льюин, Б.* Гены. — М. : Мир, 1987. — 544 с.
44. *Ляликов, Ю. С.* Физико-химические методы анализа. — М. : Химия, 1973. — 536 с.
45. *Майстер, А.* Биохимия аминокислот. — М. : Иностранная литература, 1961. — 530 с.
46. *Метверцов, Н. П.* Гормональная регуляция экспрессии генов. — М. : Наука, 1986. — 207 с.
47. *Метлицкий, Л. В.* Основы биохимии плодов и овощей. — М. : Экономика, 1976. — 349 с.
48. Методы биохимических исследований / под ред. М. Н. Прохоровой. — Л. : Изд-во ЛГУ, 1982. — 272 с.
49. *Николаев, А. Я.* Биологическая химия. — М. : Высш. шк., 1989. — 495 с.
50. Номенклатура ферментов / под ред. А. Е. Браунштейна. — М. : ВИНТИ, 1979. — 321 с.
51. *Овчинников, Л. П.* Что и как закодировано в мРНК // СОЖ. — 1998. — № 4. — С. 10–18.
52. *Овчинников, Ю. А.* Биоорганическая химия. — М. : Просвещение, 1987. — 815 с.
53. Определение микроэлементов в биологических объектах / под ред. А. Р. Вальдмана. — Рига : ЗИНАТНЕ, 1968. — 171 с.
54. Определитель высших растений Якутии / под ред. А. И. Толмачева. — Новосибирск : Наука, 1974. — 543 с.
55. Основы биохимии : в 3 т. / под ред. А. Уайт [и др.]. — М. : Мир, 1981.
56. *Плешков, Б. П.* Биохимия сельскохозяйственных растений. — М. : Агропромиздат, 1987. — 494 с.
57. *Полевой, В. В.* Физиология растений. — М. : Высш. шк., 1989. — 464 с.
58. Практикум по физиологии растений / Н. Н. Третьяков, Л. А. Паничкин, М. Н. Кондратьев [и др.]. — М. : КолоС, 2003. — 288 с.

59. *Разумов, В. А.* Справочник лаборанта-химика по анализу кормов. — М. : Россельхозиздат, 1986. — 304 с.
60. *Ратнер, В. А.* Генетический код как система // СОЖ. — 2000. — Т. 6, № 3. — С. 17–22.
61. *Рогов, И. А.* Химия пищи : в 2т. / И. А. Рогов, Л. В. Антипова, Н. И. Дунченко [и др.]. — М. : Колос, 2000. — 384 с.
62. *Рогожин, В. В.* Биохимия животных. — СПб. : ГИОРД, 2009. — 552 с.
63. *Рогожин, В. В.* Биохимия растений. — СПб. : ГИОРД, 2012. — 428 с.
64. *Рогожин, В. В.* Биохимия молока и мяса. — СПб. : ГИОРД, 2012. — 454 с.
65. *Рогожин, В. В.* Биохимия молока и молочных продуктов. — СПб. : ГИОРД, 2006. — 320 с.
66. *Рогожин, В. В.* Биохимия мышц и мяса. — СПб. : ГИОРД, 2006. — 240 с.
67. *Рогожин, В. В.* Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. — СПб. : ГИОРД, 2004. — 240 с.
68. *Рогожин, В. В.* Практикум по биологической химии. — СПб. : Лань, 2006. — 256 с.
69. *Рогожин, В. В.* Пероксидазный катализ многокомпонентных систем / В. В. Рогожин, В. В. Верхотуров, Т. В. Рогожина. — Якутск : Сахаполиграфиздат, 2003. — 165 с.
70. *Рогожин, В. В.* Пероксидаза : строение и механизм действия / В. В. Рогожин, В. В. Верхотуров, Т. В. Рогожина. — Иркутск : Изд-во ИГТУ, 2004. — 200 с.
71. *Рогожин, В. В.* Практикум по биохимии молока и молочных продуктов / В. В. Рогожин, Т. В. Рогожина. — СПб. : ГИОРД, 2008. — 224 с.
72. *Рогожин, В. В.* Практикум по физиологии и биохимии растений / В. В. Рогожин, Т. В. Рогожина. — СПб. : ГИОРД, 2013. — 256 с.
73. *Рогожина, Т. В.* Инновации в АПК / Т. В. Рогожина, В. В. Рогожин. — Иркутск : Изд-во БГУЭП, 2010. — 175 с.
74. *Рогожина, Т. В.* Технологии консервации биогенных тканей / Т. В. Рогожина, В. В. Рогожин. — Иркутск : Изд-во БГУЭП, 2010. — 90 с.
75. *Рубцов, А. М.* Кальциевые каналы (рианодиновые рецепторы) саркоплазматического ретикулума: структура и свойства / А. М. Рубцов, М. А. Батрукова // Биохимия. — 1997. — Т. 62, № 9. — С. 1091–1105.
76. *Рубцов, А. М.* Роль саркоплазматического ретикулума в регуляции сократительной активности мышц // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6, № 9. — С. 17–24.
77. *Селье, Г.* Очерки об адаптационном синдроме. — М. : Медгиз, 1960. — 254 с.

78. *Селье, Г.* Стресс без дистресса. — М. : Прогресс, 1979. — 123 с.

79. *Сказкин, Ф. Д.* Практикум по физиологии растений / Ф. Д. Сказкин, Е. И. Ловчиновская, М. С. Миллер [и др.]. — М. : Советская наука, 1958. — 339 с.

80. *Солдатенков, А. Т.* Основы органической химии лекарственных веществ / А. Т. Солдатенков, Н. М. Колядина, И. В. Шендрик. — М. : Химия, 2001. — 192 с.

81. *Снедекор, Д. У.* Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии. — М. : Сельхозиздат, 1961. — 503 с.

82. *Страйер, Л.* Биохимия : в 3 т. — М. : Мир, 1984.

83. *Строев, Е. А.* Биологическая химия. — М. : Высш. шк., 1986. — 479 с.

84. *Стромберг, А. Г.* Физическая химия / А. Г. Стромберг, Д. П. Семченко. — М. : Высш. шк., 2001. — 527 с.

85. *Теппер, Е. З.* Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. — М. : Колос, 1979. — 216 с.

86. *Тигранян, Р. А.* Стресс и его значение для человека. — М. : Наука, 1988. — 176 с.

87. *Ткачук, В. А.* Мембранные рецепторы и внутриклеточный кальций // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — Т. 63, № 1. — С. 47–56.

88. *Тюкавкина, Н. А.* Биоорганическая химия / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков. — М. : Медицина, — 1991.—815 с.

89. *Угарова, Н. Н.* Биолюминесценция и биолюминесцентный анализ / Н. Н. Угарова, Л. Ю. Бровко. — М. : Изд-во МГУ, 1981. — 138 с.

90. Химический анализ лекарственных растений / Е. Я. Ладыгина, Л. Н. Сафронич, В. Э. Отрашенкова [и др.] ; под ред. Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич. — М. : Высш. шк., 1983. — 176 с.

91. *Хмельницкий, Р. А.* Физическая и коллоидная химия. — М. : Высшая шк., 1988. — 400 с.

92. *Уайт, А.* Основы биохимии : в 3 т. / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман. — М. : Мир, 1981. — С. 1364–1371.

93. *Уильямс, В.* Физическая химия для биологов / В. Уильямс, Х. Уильямс. — М. : Мир, 1976. — 600 с.

94. *Ферит, Э.* Структура и механизм действия ферментов. — М. : Мир, 1980. — 432 с.

95. Фотозлектроколориметр фотозлектрический концентрационный КФК-2 : техническое описание и инструкция по эксплуатации : Агропромиздат. — 1986. — 36 с.

96. *Цитович, И. К.* Курс аналитической химии. — М. : Высш. шк., 1994. — 495 с.

97. *Чанг, Р.* Физическая химия с приложениями к биологическим системам. — М. : Мир, 1980. — 662 с.
98. *Шлегель, Г.* Общая микробиология. — М. : Мир, 1987. — 567 с.
99. *Шмальгаузен, И. И.* Факторы эволюции. — М. : Наука, 1968. — 451 с.
100. *Шмальгаузен, И. И.* Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. — М. : Наука, 1982. — 383 с.
101. *Якушкина, Н. И.* Физиология растений. — М. : Просвещение, 1993. — 335 с.
102. *Lowry, O. H.* Protein measurement with the Folium phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrowgh, A. L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265–275.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ	3
---------------------------	---

ВВЕДЕНИЕ	5
----------------	---

Глава 1

ПРАВИЛА И МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	8
--	---

1.1. Правила техники безопасности при проведении исследований в биохимической лаборатории	10
1.1.1. Меры безопасности при работе с огнеопасными и легковоспламеняющимися жидкостями	10
1.1.2. Меры безопасности при работе с кислотами и щелочами	11
1.1.3. Меры безопасности при работе с электрооборудованием и электроприборами ...	12
1.1.4. Первая медицинская помощь	13
1.2. Физико-химические методы анализа	14
1.2.1. Фотометрический метод анализа	14
1.2.2. Буферные растворы и рН-метрия	18
1.2.3. Центрифугирование.	21
1.3. Подготовка тканей растений для биохимических исследований	22
1.3.1. Сбор растительного сырья	22
1.3.2. Сушка растительного сырья	22
1.3.3. Содержание влаги в семенах	23
1.3.4. Определение содержания воды и сухого вещества в растительном материале	24
1.3.5. Отбор растительного материала для анализа на микроэлементы.	25
1.3.6. Определение зольности зерновок злаковых культур	27
1.3.7. Озольнение растительного материала	29
1.3.8. Методики приготовления супернатанта	31

1.3.9. Экстракция биологически активных веществ из растительных тканей	33
1.3.10. Методы осаждения белков гомогената растительных тканей.	33
1.3.11. Методы осаждения белков сульфатом аммония	34
1.3.12. Осаждение белков с помощью органических растворителей.	37
1.3.13. Методы осаждения белков ацетоном	38
1.3.14. Диализ белков	40
1.3.15. Метод гель-фильтрации раствора пероксидазы с 2,4-динитрофенолом	41
1.4. Подготовка тканей животных для биохимических исследований.	44
1.4.1. Получение плазмы и сыворотки крови.	44
1.4.2. Приготовление гомогената из тканей животных	44
1.4.3. Получение и хранение эритроцитарной массы ..	45
1.5. Методы выделения субклеточных фракций	46
1.5.1. Выделение субклеточных фракций из колеоптилей пшеницы	46
1.5.2. Очистка и обогащение микросомальной фракции в ступенчатом градиенте плотности сахарозы	47
1.5.3. Способ выделения ядер из клеток эвглены.	49
1.5.4. Способ выделения митохондрий из растительных тканей	51
1.5.5. Выделение митохондрий из мезокотилей этиолированных проростков кукурузы	53
1.5.6. Выделение митохондрий печени.	55
1.6. Методы приготовления, определения и расчета концентрации вещества в растворе	56
1.6.1. Приготовление 0,1 М ацетатного буферного раствора	56
1.6.2. Методы определения количества вещества в растворе	58
1.6.3. Способ определения концентрации вещества в растворе	59
1.6.4. Способ расчета концентрации раствора при его разбавлении.	60
1.6.5. Способ расчета концентрации вещества в растворе	60
1.6.6. Способ обработки графика линейной зависимости по методу наименьших квадратов. .	61

1.6.7. Способ определения максимума светопоглощения 2,4-динитрофенола	62
1.6.8. Способ определения молярного коэффициента светопоглощения 2,4-динитрофенола по калибровочному графику	64
1.7. Методы расчета экспериментальных данных	65
1.8. Порядок записи лабораторной работы	67

Глава 2

УГЛЕВОДЫ	70
2.1. Определение глюкозы в биологических жидкостях <i>o</i> -толуидиновым методом	75
2.2. Определение глюкозы с помощью антрона	77
2.3. Определение содержания сиаловых кислот по реакции с резорцином	79
2.4. Определение сиаловых кислот в биологических жидкостях по методу Гесса	82
2.5. Определение целлюлозы (клетчатки) (по Кюршнеру и Ганеку).	84
2.6. Определение крахмала в тканях растений	86
2.7. Выделение и очистка сахарозы из сахарной свеклы.	88
2.8. Выделение крахмала из зерновок злаковых культур	90
2.9. Выделение крахмала из клубней картофеля.	91
2.10. Выделение гликогена из животных тканей	92
2.11. Гидролиз гликогена	94
2.12. Ферментативный гидролиз целлюлозы	94

Глава 3

ЛИПИДЫ И ПЕРЕКИСНОЕ

ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ	99
3.1. Растворимость липидов	104
3.2. Экстракция липидов из субклеточных частиц	105
3.3. Определение содержания общих липидов в растительных тканях.	105
3.4. Определение холестерина (метод Илька)	107
3.5. Определение β -липопротеидов турбидиметрическим методом (по Бурштейну и Самай)	109
3.6. Исследование перекисного окисления липидов	110
3.7. Определение содержания флавоноидов в биологическом материале	112
3.8. Определение общей антиокислительной активности	114

3.9. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов	116
3.10. Определение общего содержания антиоксидантов...	119
3.11. Определение содержания антиоксидантов в гомогенатах тканей (по Глевинду)	122
3.12. Определение стероидных (сердечных) гликозидов...	124

Глава 4

АМИНОКИСЛОТЫ, БЕЛКИ И ДРУГИЕ

АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ 130

4.1. Определение аминокислот с помощью нингидрина	134
4.2. Определение содержания глутаминовой кислоты ...	136
4.3. Определение содержания белка спектрофотометрическим методом	139
4.4. Определение общего белка по биуретовой реакции ..	141
4.5. Метод определения белка (по Лоури)	144
4.6. Метод определения белка (по Брэдфорду).....	146
4.7. Определение содержания гемоглобина крови гемоглобинцианидным методом	148
4.8. Определение концентрации гемоглобина (по Д. Драбкину).....	151
4.9. Определение церулоплазмينا (феррооксидазы) в плазме крови	152
4.10. Метод выделения пептидов из тимуса теленка.....	154
4.11. Выделение и очистка гемоглобина	157
4.12. Выделение фибриногена из плазмы крови	159
4.13. Выделение яичного альбумина	160
4.14. Использование метода гель-хроматографии для определения молекулярной массы гемоглобина	160
4.15. Изучение кислотной денатурации белков.....	163
4.16. Изучение температурной денатурации белков.....	164
4.17. Кислотный гидролиз белков	165
4.18. Щелочной гидролиз белков	167
4.19. Исследование взаимодействия нативной и денатурированных форм альбумина с кальцием...	168
4.19.1. Участие кальция в комплексообразовании с нативным альбумином	169
4.19.2. Участие кальция в комплексообразовании с денатурированной формой альбумина.....	169
4.19.3. Влияние различных концентраций альбумина на образование комплекса с ионами кальция.....	170

4.19.4. Образование комплексов денатурированных форм альбумина с кальцием при различных его концентрациях	171
4.20. Определение нитритов в растительных тканях	172
4.21. Определение нитратов в растительных тканях	174
4.22. Определение содержания мочевины по реакции с диацетилмонооксидом	176
4.23. Определение мочевой кислоты по методу Мюллера — Зейферта	178
4.24. Определение содержания креатинина по цветной реакции Яффе	179
4.25. Определение содержания креатина	181

Глава 5

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ	184
5.1. Выделение и качественные реакции на дезоксирибонуклео-протеин селезенки	188
5.2. Выделение ДНК из животных тканей	190
5.3. Метод определения содержания ДНК с помощью дифениламина	191
5.4. Метод выделения ДНК растительных тканей	192
5.5. Выделение РНК и ДНК фенольным методом	193
5.6. Выделение РНК из печени (по Шерреру)	196
5.7. Определение содержания РНК с орцином (по Мейбаум)	197
5.8. Выделение РНК рибосом из печени	199
5.9. Гидролиз ДНК	200
5.10. Определение суммарного содержания нуклеиновых кислот (по А. С. Спирину)	201
5.11. Определение содержания пуриновых оснований	202

Глава 6

ЭЛЕМЕНТЫ	204
6.1. Определение общего азота в растительных тканях (по А. Т. Усовичу)	208
6.2. Определение фосфора ванадо-молибдатным методом	210
6.3. Определение неорганического фосфора методом Фiske — Суббароу	212
6.4. Определение марганца в растительных тканях формальдоксидным методом	215

6.5. Определение калия и натрия на пламенном фотометре	216
6.6. Определение железа роданидным методом	218
6.7. Определение железа с помощью 4,7-дифенил-1,10- фенантролин-3,6-дисульфоновой кислоты	220
6.8. Определение меди в гомогенатах тканей	222
6.9. Определение меди в тканях методом Шмидта в модификации А. Г. Рахманкулова и И. А. Коптевой	224
6.10. Определение кальция в сыворотке крови с помощью глиоксаль-бис-(2-оксанила)	225
6.11. Определение магния в сыворотке крови с помощью титанового желтого	227
6.12. Определение ионов хлора в сыворотке крови меркуриметрическим методом	229

Глава 7

ВИТАМИНЫ, КОФЕРМЕНТЫ И ПИГМЕНТЫ	232
7.1. Определение содержания аскорбиновой кислоты	237
7.2. Выделение и очистка дигидрокверцетина (витамина группы Р) из лиственницы	239
7.3. Изучение физических свойств дигидрокверцетина	241
7.4. Энзиматический метод получения кверцетина	244
7.5. Определение содержания НАДФ	246
7.6. Определение содержания НАД	248
7.7. Получение вытяжки пигментов из побегов пшеницы	249
7.8. Разделение пигментов (по Краусу)	251
7.9. Количественное определение хлорофиллов и каротиноидов	252
7.10. Омыление хлорофиллов щелочью	253
7.11. Получение хлорофилла	254
7.12. Разделение пигментов методом бумажной хроматографии	256
7.13. Получение гемина с помощью органического растворителя	259
7.14. Получение гемина с помощью пепсина	260
7.15. Определение концентрации гемина	261
7.16. Определение билирубина в сыворотке крови с помощью диазореактива (по Ендрассику — Грофа)	263

ФЕРМЕНТЫ	268
8.1. Физико-химические методы	
исследования ферментов	274
8.1.1. Определение концентрации пероксидазы	
спектрофотометрически	274
8.1.2. Определение величин каталитических	
констант (V_m , K_m , k_{cat}) в реакции	
пероксидазного окисления <i>o</i> -дианизидина	275
8.1.3. Влияние концентрации пероксидазы	
на скорость ферментативной реакции	280
8.1.4. Определение числа доступных карбоксильных	
групп в ферментах с помощью <i>o</i> -дианизидина	
и водорастворимого карбодиимида	282
8.1.5. Определение концентрации	
алкогольдегидрогеназы методом титрования	
активного центра. Выявление функционально	
важных SH-групп фермента	284
8.1.6. Влияние pH среды на активность	
пероксидазы	286
8.1.7. Кислотная инаktivация ферментов	288
8.1.8. Изучение термостабильности очищенного	
препарата пероксидазы хрена	290
8.1.9. Изучение температурной денатурации	
пероксидазы зерновок пшеницы	293
8.1.10. Влияние температуры на активность	
пероксидазы зерновок пшеницы	294
8.1.11. Влияние альбумина и хлорида кальция на	
стабильность пероксидазы	296
8.1.12. Влияние различных соединений	
на стабильность алкогольдегидрогеназы	
зерновок пшеницы	298
8.2. Определение активности отдельных ферментов	301
8.2.1. Определение активности пероксидазы	
по <i>o</i> -дианизидину	301
8.2.2. Определение активности пероксидазы	
по ферроцианиду калия	304
8.2.3. Определение активности	
алкогольдегидрогеназы в реакции	
окисления этанола по НАДН	306
8.2.4. Определение активности алкогольдегидрогеназы	
в реакции окисления этанола	
по иоднитротетразолиевому фиолетовому	307

8.2.5. Определение активности алкогольдегидрогеназы в реакции восстановления ацетальдегида	310
8.2.6. Определение активности альдегиддегидрогеназы	312
8.2.7. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по НАДФН.	314
8.2.8. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по иоднитротетразолиевому фиолетовому	316
8.2.9. Определение активности 6-фосфоглюконат дегидрогеназы	319
8.2.10. Определение активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы	321
8.2.11. Определение активности триозофосфатизомеразы	323
8.2.12. Определение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы	325
8.2.13. Определение активности лактатдегидрогеназы	327
8.2.14. Определение активности ферментов перуватдегидрогеназного комплекса	329
8.2.15. Определение активности ферментов перуватдегидрогеназного комплекса с помощью йоднитротетразолиевое фиолетовое	332
8.2.16. Определение активности ферментов кетоглутаратдегидрогеназного комплекса.	334
8.2.17. Определение активности глутаматдегидрогеназы.	336
8.2.18. Определение активности цитохромоксидазы.	338
8.2.19. Определение активности сукцинатдегидрогеназы	340
8.2.20. Определение активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы	342
8.2.21. Определение активности НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы	344
8.2.22. Определение активности нитратредуктазы	346
8.2.23. Определение активности аскорбатоксидазы	348
8.2.24. Определение активности полифенолоксидазы.	350
8.2.25. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы	351
8.2.26. Определение активности каталазы	353
8.2.27. Определение активности аминотрансфераз	355

8.2.28.	Определение активности гексокиназы	358
8.2.29.	Определение активности пируваткиназы с помощью лактатдегидрогеназы	360
8.2.30.	Определение активности 3-фосфоглицераткиназы с помощью глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы	363
8.2.31.	Определение активности креатинкиназы с помощью сложной энзиматической системы . . .	365
8.2.32.	Определение активности фосфоглюкомутазы с помощью Г6ФДГ	368
8.2.33.	Определение активности α -амилазы.	370
8.2.34.	Определение активности щелочной фосфатазы	372
8.2.35.	Определение активности аргиназы печени . . .	375
8.2.36.	Определение активности фруктозо-1,6- дифосфатаальдолазы	378
8.2.37.	Определение активности глюкозофосфатизомеразы с помощью Г6ФДГ . . .	381
8.3.	Методы очистки ферментов	383
8.3.1.	Выделение гексокиназы из пекарских дрожжей	383
8.3.2.	Метод очистки пероксидазы из корней хрена . .	387
8.3.3.	Получение очищенного препарата алкогольдегидрогеназы из зерновок пшеницы . .	390
8.3.4.	Выделение и очистка лактатдегидрогеназы из скелетных мышц. . . .	393
8.3.5.	Выделение и очистка глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из скелетных мышц	394
8.3.6.	Метод очистки глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из зерновок пшеницы	396
8.3.7.	Выделение и очистка аргиназы из печени	400

Глава 9

МОЛЕКУЛЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ	404
9.1. Определение АТФ и глюкозо-6-фосфата	408
9.2. Определение АТФ с помощью люциферазы (по Угаровой и Бровко).	411
9.3. Определение глутатиона в растительных тканях. . . .	413
9.4. Определение содержания глутатиона методом титрования с помощью <i>n</i> -хлормеркурибензоата	414
9.5. Определение содержания в биогенных тканях креатинфосфата по фосфору	416

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛОКА.....	419
10.1. Определение плотности молока и молочных продуктов	424
10.2. Определение титруемой кислотности молока и молочных продуктов	426
10.3. Определение рН молока	429
10.4. Определение массовой доли влаги и сухого вещества в молоке, сметане, мороженом, сырах, твороге и творожных изделиях	430
10.5. Методы осаждения белково-липидных комплексов молока.....	432
10.5.1. Осаждение белково-липидных комплексов молока с помощью раствора хлорида кальция.....	432
10.5.2. Осаждение белково-липидных комплексов молока с помощью уксусной кислоты	434
10.5.3. Осаждение белково-липидных комплексов молока с помощью различных концентраций этанола	436
10.6. Выделение казеина из молока	437
10.7. Методы растворения липидов масла	438
10.7.1. Методы растворения липидов сливочного масла в этиловом спирте и хлороформе	438
10.7.2. Количественные показатели растворения липидов растительного масла в хлороформе и этанольно-хлороформных смесях	440
10.8. Активность химозина или ферментативного сычужного комплекса	442
10.9. Качественные реакции на присутствие посторонних соединений в молоке.....	443
10.9.1. Определение наличия соды в молоке	443
10.9.2. Определение наличия аммиака в молоке.....	444
10.9.3. Определение наличия перекиси водорода в молоке.....	445
10.9.4. Определение наличия формальдегида в молоке	446
10.10. Выделение лактозы из молочной сыворотки	446
10.11. Метод определения содержания аскорбиновой кислоты в молоке	448

Глава 11

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЫШЦ	452
11.1. Выделение митохондрий скелетных мышц	454
11.2. Выделение митохондрий сердечной мышцы	455
11.3. Выделение белков мышечной ткани	456
11.4. Выделение и очистка миоглобина мышц	458
11.5. Определение содержания пировиноградной кислоты с помощью лактатдегидрогеназы	460
11.6. Определение содержания пировиноградной кислоты с помощью 2,4-динитрофенилгидразина ..	462
11.7. Определение содержания молочной кислоты с помощью <i>p</i> -оксидифенила	464
11.8. Определение содержания молочной кислоты в биогенных тканях энзиматическим методом	467
11.9. Определение фосфотриоз в мышечной ткани	469
11.10. Определение этанола в биологическом материале	471

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

СПОСОБЫ РАСЧЕТА СОДЕРЖАНИЯ БИОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ИССЛЕДУЕМЫХ ЖИДКОСТЯХ И ТКАНЯХ	477
---	-----

Приложение 2

ВЕЛИЧИНЫ БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ И ИХ КИСЛОТНЫЕ И ЩЕЛОЧНЫЕ КОМПОНЕНТЫ	480
---	-----

Приложение 3

ЗНАЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС ОСНОВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	482
---	-----

Приложение 4

ОСНОВНЫЕ ПРИБОРЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	487
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	493
ЛИТЕРАТУРА	523

Василий Васильевич РОГОЖИН

ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ

Учебное пособие

Зав. редакцией
химической литературы *М. В. Гончаренко*
Ответственный редактор *Н. А. Сметанина*
Технический редактор *А. С. Кузьмина*
Корректор *Т. А. Кошелева*
Подготовка иллюстраций *А. П. Маркова*
Верстка *Д. А. Петров*
Выпускающие *Т. С. Симонова, Е. П. Королькова*

ЛР № 065466 от 21.10.97
Гигиенический сертификат 78.01.07.953.П.007216.04.10
от 21.04.2010 г., выдан ЦГСЭН в СПб

Издательство «ЛАНЬ»
lan@lanbook.ru; www.lanbook.com
192029, Санкт-Петербург, Общественный пер., 5.
Тел./факс: (812) 412-29-35, 412-05-97, 412-92-72.
Бесплатный звонок по России: 8-800-700-40-71

Подписано в печать 29.09.13.
Бумага офсетная. Гарнитура Школьная. Формат 84×108^{1/32}.
Печать офсетная. Усл. п. л. 28,56. Тираж 1000 экз.

Заказ № .

Отпечатано в полном соответствии
с качеством предоставленного оригинал-макета
в ОАО «Издательско-полиграфическое предприятие «Правда Севера».
163002, г. Архангельск, пр. Новгородский, д. 32.
Тел./факс (8182) 64-14-54; www.ippps.ru