

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»
Кафедра химии

**Е.О. Данченко, А.А. Чиркин,
О.М. Балаева-Тихомирова, Т.А. Толкачева**

ЛАБОРАТОРНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Методические рекомендации
к выполнению лабораторных работ
студентами биологического факультета
специальности 1-02 04 04 «Биология. НПД»*

*Витебск
ВГУ имени П.М. Машерова
2017*

УДК 577.1-047.37(076.5)

ББК 28.072я73

Д19

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 3 от 28.02.2017 г.

Авторы: профессор кафедры химии ВГУ имени П.М. Машерова, доктор медицинских наук **Е.О. Данченко**; профессор кафедры химии ВГУ имени П.М. Машерова, доктор биологических наук **А.А. Чиркин**; заведующий кафедрой химии ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук, доцент **О.М. Балаева-Тихомирова**; доцент кафедры химии ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук **Т.А. Толкачева**

Рецензент:

доцент кафедры химии ВГУ имени П.М. Машерова,
кандидат биологических наук *Н.А. Степанова*

Данченко, Е.О.

Д19 Лабораторные биохимические исследования : методические рекомендации к выполнению лабораторных работ студентами биологического факультета специальности 1-02 04 04 «Биология. НПД» / Е.О. Данченко, А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова, Т.А. Толкачева. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2017. – 43 с.

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ подготовлены в соответствии с учебной программой по дисциплине «Спецпрактикум по биохимии» для студентов биологического факультета специальности 1-02 04 04 «Биология. НПД»

УДК 577.1-047.37(076.5)

ББК 28.072я73

© Данченко Е.О., Чиркин А.А., Балаева-Тихомирова О.М., Толкачева Т.А., 2017
© ВГУ имени П.М. Машерова, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Лабораторная работа № 1. Дозирование, центрифугирование и взвешивание на биохимическом оборудовании	5
Лабораторная работа № 2. Количественное определение белка биуретовым методом	6
Лабораторная работа № 3. Количественное определение белков по методу Лоури	9
Лабораторная работа № 4. Определение активности холинэстеразы методом Хестрина (в модификации)	13
Лабораторная работа № 5. Определение активности ферментов кинетическим методом	17
Лабораторная работа № 6. Количественное определение содержания гликогена в тканях	21
Лабораторная работа № 7. Определение активности амилазы в растительных объектах	25
Лабораторная работа № 8. Выделение нуклеиновых кислот из дрожжей и исследование их состава	28
Лабораторная работа № 9. Определение содержания холестерина и липопротеинов	32
Лабораторная работа № 10. Спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты	36
Лабораторная работа № 11. Колориметрическое определение аминного азота	38
Лабораторная работа № 12. Методы исследования растительных фенолов	40

ВВЕДЕНИЕ

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ по дисциплине «Спецпрактикум по биохимии» предназначены для студентов биологического факультета специальности 1-02 04 04 «Биология. НПД».

Данное издание полностью соответствует требованиям учебной программы и включает 12 лабораторных работ. В начале каждой лабораторной работы приводятся цель и задачи по ее достижению. Структура лабораторных работ построена таким образом, чтобы дать теоретическое представление о работе и принципах методов, а также пошаговую инструкцию к выполнению практической части работы. В конце каждой лабораторной работы приводятся вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию.

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ углубляют знания по биохимии, позволяя детально изучить процессы обмена белков, липидов и углеводов, а также содержание отдельных метаболитов в растительных и животных тканях.

Лабораторная работа № 1

ДОЗИРОВАНИЕ, ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ И ВЗВЕШИВАНИЕ НА БИОХИМИЧЕСКОМ ОБОРУДОВАНИИ

Цель работы: освоить основные правила дозирования, центрифугирования, взвешивания.

Задачи работы:

1. Научиться работать с автоматическими пипетками (дозаторами).
2. Изучить правила взвешивания на аналитических весах.
3. Освоить методы центрифугирования.
4. Провести калибровку пипеток, рассчитать точность и воспроизводимость.
5. Провести взвешивание и центрифугирование веществ.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Под контролем преподавателя разобрать пипетку, очистить поршень, пружину поршня и прокладку сухой неворсистой тканью. Смазать очищенные части пипетки смазкой. Собрать пипетку обратно.

2. Провести поверочную калибровку пипетки. Рассчитать точность и воспроизводимость дозирования пипетки. Сделать вывод о полученных результатах.

3. Провести взвешивание представленного образца различной массы на аналитических весах. Сделать вывод о полученных результатах.

4. Провести центрифугирование представленных растворов образцов. Сделать вывод о полученных результатах.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Укажите основные этапы техника пипетирования.
2. Опишите этапы установки объема дозирования при пипетировании.
3. На чем основан прямой метод пипетирования?
4. На чем основан обратный метод пипетирования?
5. На чем основан метод повторов пипетирования?
6. Особенности пипетирование цельной крови.
7. Как проводится поверочная калибровка пипетки.
8. Формулы для вычисления результатов исследования: точность и воспроизводимость дозирования пипетки.
9. Основные характеристики методики анализа: точность; воспроизводимость; правильность; предел обнаружения, предел определения и границы определяемых содержаний; чувствительность.
10. Опишите технику взвешивания на аналитических весах.
11. Основные правила центрифугирования.
12. Неопределенность и погрешности измерений.
13. Основные положения математической статистики, используемые при биохимических исследованиях.

Лабораторная работа № 2 КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА БИУРЕТОВЫМ МЕТОДОМ

Цель работы: определить концентрацию белка в биологической жидкости биуретовым методом.

Задачи работы:

1. Приготовить серию градуировочных растворов из стандартного раствора белка.
2. Построить градуировочный график по результатам экспериментальных измерений.
3. Определить оптическую плотность исследуемого раствора, содержащего сыворотку крови, и, используя уравнение градуировочной зависимости, рассчитать содержание общего белка в сыворотке крови.
4. Определить концентрацию белка в сыворотке крови методом сравнения оптических плотностей.

Принцип работы. Пептидные связи белков в щелочной среде образуют с ионами меди окрашенные в фиолетовый цвет комплексы (биуретовая реакция), интенсивность которых пропорциональна концентрации общего белка и измеряется фотометрическим методом. Норма содержания белка в сыворотке крови – 65–85 г/дм³.

Средства измерений, вспомогательное оборудование:

1. Спектрофотометр.
2. Дозаторы пипеточные 100–1000, 1000–5000.
3. Пробирки химические.
4. Штативы для пробирок пластмассовые.
5. Кювета с длиной оптического пути 1 см.
6. Весы лабораторные.
7. Колба мерная объемом 25 см³.

Реактивы и материалы: 1) сыворотка крови; 2) хлорид натрия; 3) биуретовый реактив; 4) раствор сывороточного альбумина; 5) стандартный раствор белка (80 г/л).

Приготовление реактивов

0,9% раствор хлорида натрия

Взвешивают 0,225 г хлорида натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Градуировочные растворы белка

1. В химических пробирках готовят ряд разведений раствора белка известной концентрации согласно таблице:

№	Раствор белка	0,9% раствор хлорида натрия (см ³)	Содержание белка (г/дм ³)
1.	0,1	0,4	16
2.	0,2	0,3	32
3.	0,3	0,2	48
4.	0,4	0,1	64
5.	0,5	-	80

2. В химические пробирки № 1-5 отбирают по 0,02 см³ каждого градуировочного раствора белка.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Соотношение биуретовый реагент: сыворотка крови = 50:1

Определение концентрации общего белка по градуировочному графику

1. В химические пробирки внести реактивы согласно таблице:

Реактивы	Опытная проба	Холостая проба
Сыворотка крови, см ³	0,02	-
Биуретовый реагент, см ³	1,0	1,0
Хлорид натрия, 0,9%, см ³	-	0,02

2. К градуировочным растворам добавить по 1,0 см³ биуретового реактива.

3. Пробы и градуировочные растворы перемешать, избегая образования пены, и инкубировать 30 мин при 18–25°C.

4. Измерить оптическую плотность опытной пробы и градуировочных растворов относительно холостой пробы на спектрофотометре при длине волны 540 нм.

5. По полученным данным строят градуировочный график (Excel), откладывая на оси абсцисс концентрацию белка, а на оси ординат – оптическую плотность градуировочных растворов.

6. Рассчитывают концентрацию белка в исследуемой сыворотке с использованием уравнения градуировочного графика.

7. Рассчитать концентрацию белка по формуле:

$$C_{оп} = A_{оп} \times F,$$

где $C_{оп}$ – концентрация белка в пробе (г/дм³); $A_{оп}$ – экстинкция (оптическая плотность) опытной пробы; F – усредненный фактор.

Для расчета усредненного фактора вычисляют факторы пересчета делением концентрации белка приготовленных калибровочных растворов № 1–№ 5 на оптическую плотность.

Определение содержания белка в сыворотке крови методом сравнения оптических плотностей

1. В химические пробирки внести реактивы согласно таблице:

Реактивы	Опытная проба	Холостая проба	Стандартная проба
Сыворотка крови, см ³	0,02	–	
Биуретовый реагент, см ³	1,0	1,0	1,0
Хлорид натрия, 0,9%, см ³	–	0,02	–
Стандартный раствор белка, см ³	–	–	0,02

2. Пробы перемешать, избегая образования пены, и инкубировать 30 мин при 18-25°C.

3. Измерить оптическую плотность опытной пробы и градуировочных растворов относительно холостой пробы на спектрофотометре при длине волны 540 нм.

4. Рассчитать концентрацию общего белка в сыворотке крови по формуле:

$$C_{оп} = (A_{оп}/A_{ст}) \times C_{ст},$$

где $A_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартной пробы; $C_{ст}$ – концентрация белка в стандартном растворе (80 г/л).

Сделать вывод о соответствии полученного результата нормальному содержанию белка в сыворотке крови.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Общая характеристика понятия аналитический сигнал (полезный, сигнал фона, единичное и параллельные определения, эталонные и безэталонные методы, стандартные образцы и вещества).

2. Методы расчета концентрации вещества по величине аналитического сигнала: метод градуировочного графика; метод стандартов; метод добавок.

3. Принцип метода молекулярной абсорбционной спектроскопии (спектрофотометрии).

4. Практическое применение спектрофотометрии.

5. На чем основан принцип количественного определения белков в сыворотке крови биуретовым методом?

6. Рассчитайте, как приготовить следующие реактивы: 2,3% раствор хлорида натрия, 20% раствор сульфата натрия, 68% раствор ацетата натрия.

Лабораторная работа № 3

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПО МЕТОДУ ЛОУРИ

Цель работы: количественно определить содержание белков по методу Лоури в животных тканях.

Задачи работы:

1. Приготовить растворы, необходимые для выполнения лабораторной работы
2. Освоить методику приготовления гомогенатов тканей.
3. Освоить методику количественного определения белков по Лоури.
4. Усовершенствовать навыки работы со спектрофотометром.
5. Количественно рассчитать содержание белков в тканях, используя градуировочный график.

Принцип работы. Из количественных методов определения белков наиболее широкое применение в биохимической практике получил метод Лоури. Метод Лоури является наиболее чувствительным и точным из всех существующих методов количественного определения белков, который позволяет определять 10–100 мкг белка в образце.

Данный метод основан на измерении интенсивности окраски раствора белка и сочетает в себе биуретовую реакцию на пептидные связи и реакцию Фолина на ароматические аминокислоты (тирозин и триптофан). Благодаря высокой чувствительности метод Лоури позволяет вести определение белков в сильно разбавленных растворах биологических жидкостей (сыворотка крови, слюна, гемолимфа) и экстрактах органов и тканей.

Средства измерений, вспомогательное оборудование:

1. Спектрофотометр.
2. Центрифуга.
3. Весы лабораторные.
4. Воронки.
5. Фильтровальная бумага.
6. Центрифужные пробирки градуированные объемом 10 см³.
7. Центрифужные пробирки пластиковые для центрифуг ОПН-8 и ЦЛН.
8. Штативы с химическими пробирками.
9. Дозаторы пипеточные 20–200, 100–1000, 1000–5000.
10. Колбы мерные объемом 25 см³.
11. Ступки с пестиком.
12. Палочки стеклянные.
13. Стаканы стеклянные химические вместимостью 50 см³ и 100 см³.

Приготовление реактивов

Раствор А (2% раствор Na_2CO_3 в 0,1 М растворе NaOH)

1. 0,1 М растворе NaOH – 100 см³

Взвешивают 0,4 г гидроксида натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

2. 2% раствор Na_2CO_3 в 0,1 М растворе NaOH – 100 см³

Взвешивают 2 г карбоната натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем до метки 0,1 М растворе NaOH .

1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ – 100 см³

Взвешивают 1,56 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

2% раствор натрия лимонно-кислого (цитрат натрия) – 100 см³

Взвешивают 2 г натрия лимонно-кислого, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Раствор В (готовится перед определением)

Смесь равных объемов 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ и 2% раствора цитрата натрия.

Отмеряют 25 см³ 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ и смешивают с заранее отмеренным 25 см³ объемом 2% раствора цитрата натрия.

Раствор С (готовится перед определением)

Смесь 50 мл раствора А и 1 мл раствора В (объемы выдерживают точно!).

Отмеряют 50 см³ раствора А и переносим в химический стакан объемом 100 см³, затем вносим 1 мл раствора В.

Реактив Фолина – многокомпонентный реактив, состоящий из вольфрамата натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), молибдата натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 85%-ого раствора фосфорной кислоты и концентрированной HCl . Эту смесь кипятят с обратным холодильником 10 часов. Затем добавляют Li_2SO_4 , дистиллированную воду и 3 капли брома. Кипятят, но уже без холодильника, в течение 15 мин. Охлаждают до комнатной температуры и доводят дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют. Перед определением реактив разбавляют дистиллированной водой (1:1).

Стандартный раствор кристаллического сывороточного альбумина 0,25 мг/мл в 0,1 М растворе NaOH

На аналитические весы помещают стеклянный флакон емкостью 10 см³ и тарируют его. Во флакон вносят 12,5 мг альбумина и добавляют 5,0 см³ дистиллированной воды (концентрация 2,5 мг/см³). Для лучшего растворения альбумина флакон можно поместить в водяную баню при температуре 37°C. К 1,0 см³ раствора 1 добавляют 9,0 см³ дистиллированной воды и перемешивают раствор стеклянной палочкой (концентрация 0,25 мг/см³).

1 М раствор NaOH

Взвешивают 4 г гидроксида натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

6% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) – 25 см³

Взвешивают 1,5 г трихлоруксусной кислоты, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

Материал исследования: экстракты растворимых белков из органов и тканей (мышцы, печень, селезенка, почки, легкие и др.).

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Гомогенизация и экстракция белков

1. Навеску ткани массой 100 мг гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе или растирают в фарфоровой ступке со стеклянным песком с небольшим количеством дистиллированной воды (около 1 см³).

2. Добавляют дистиллированную воду с тем расчетом, чтобы общий объем гомогената составлял 10 см³.

3. Через 5 минут гомогенат центрифугируют в течение 10-15 мин в центрифуге ОПН-8 при 5000-6000 об/мин.

4. Центрифугат сливают в центрифужные пробирки вместимостью 20 см³.

5. Для экстрагирования и осаждения белков к исследуемому центрифугату добавляют равный объем 6%-ого раствора ТХУ.

6. Раствор центрифугируют в центрифуге ЦЛН в течение 10 минут при 2500 об/мин.

7. Осадок белка растворяют при подогревании в 1-2 см³ 1М NaOH.

8. Щелочной раствор белка количественно переносят в стеклянные градуированные пробирки, доводят объем до 10 см³ дистиллированной водой, перемешивают и используют для количественного определения белка.

Количественное определение белка

1. В химические пробирки помещают по 0,1 см³ исследуемого раствора белка (по 2 параллельные пробы) и добавляют 0,9 см³ 0,1 М раствора NaOH.

2. Приливают 2 см³ рабочего раствора С (смесь растворов А и В), хорошо перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре.

3. Добавляют 0,2 см³ реактива Фолина и немедленно тщательно перемешивают, оставляя затем на 30 мин для развития окраски, после чего измеряют оптическую плотность (А) образцов на спектрофотометре в кювете толщиной слоя в 1,0 см при длине волны 750 нм, против «холостой» пробы, не содержащей белка.

4. По данным оптической плотности с помощью градуировочного графика, построенного по стандартному раствору сывороточного альбумина, определяют содержание белка в ткани.

Построение градуировочного графика

1. Построение градуировочного графика проводят в одинаковых условиях, используя тот же спектрофотометр, те же кюветы, те же соотношения реактивов.

2. В шесть химически чистых пробирок помещают соответственно 0,04; 0,08; 0,16; 0,24; 0,32 и 0,4 мл стандартного раствора сывороточного альбумина, содержащего 0,25 мг белка в 1 см³.

3. Доводят объем каждой пробирки до 1 см³ дистиллированной водой.

4. В каждую пробирку добавляют по 2 см³ реактива С и 0,2 см³ реактива Фолина.

5. Через 30 мин измеряют оптическую плотность (А) стандартных растворов на спектрофотометре в кювете толщиной слоя в 1,0 см при длине волны 750 нм, против «холостой» пробы, не содержащей белка.

6. По данным оптической плотности (А) и концентрации белка строят градуировочный график. Величины оптической плотности откладывают на оси ординат, а концентрацию белка в мкг – на оси абсцисс.

По градуировочному графику находят содержание белка в исследуемой пробе и делают соответствующий перерасчет с учетом разведения. В случае биологических жидкостей (сыворотка крови, гемолимфа и др.) концентрацию белка выражают в г/л; а в случае органов или тканей – в г/кг, или другую размерность, например, в г или мг на 100 г.

Таблица – Приготовление стандартных растворов белка для построения градуировочного графика

№	Объем стандартного раствора белка, мл	Объем Н ₂ О, мл	Объем реактива С, мл	Объем реактива Фолина, мл	Общий объем раствора в мл	Концентрация белка в пробе	
						мг	мкг
1	0,04	0,96	2	0,2	3,2	0,01	10
2	0,08	0,92	2	0,2	3,2	0,02	20
3	0,16	0,84	2	0,2	3,2	0,04	40
4	0,24	0,76	2	0,2	3,2	0,06	60
5	0,32	0,68	2	0,2	3,2	0,08	80
6	0,40	0,60	2	0,2	3,2	0,10	100
Холостая проба	-	1,0	2	0,2	3,2	-	-

Сделать вывод о полученном результате содержания белка в исследуемых животных тканях.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Белки, строение простых и сложных белков.
2. Роль печени в обмене белков. Схема обмена белков в печени.
3. На чем основан принцип количественного определения белков по методу Лоури в животных тканях.
4. Сравните биуретовый метод определения белка и метод Лоури.

Лабораторная работа № 4
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ
МЕТОДОМ ХЕСТРИНА (В МОДИФИКАЦИИ)

Цель работы: определить активность холинэстеразы в сыворотке крови.

Задачи работы:

1. Освоить методику определения активности холинэстеразы.
2. Рассчитать активность холинэстеразы в сыворотке крови.
3. Рассмотреть ситуации, при которых происходит изменение активности холинэстеразы.

Принцип работы. Активность холинэстеразы определяется колориметрически по концентрации не вступившего в реакцию ацетилхолина. В основе метода лежит цветная реакция с гидроксиламином и хлоридом железа (III). Ацетилхолин реагирует с гидроксиламином с образованием ацетгидроксамовой кислоты и холина. Ацетгидроксамовая кислота в кислой среде образует с солями трехвалентного железа окрашенные комплексы. Интенсивность пурпурно-коричневой окраски пропорциональна количеству ацетилхолина, связавшегося с гидроксиламином, который берется в избытке. Экстинкция пропорциональна концентрации негидролизованного ацетилхолина.

Средства измерений, вспомогательное оборудование

1. Спектрофотометр.
2. Весы.
3. Стаканчики для взвешивания.
4. Дозаторы пипеточные 20–200, 100–1000, 1000–5000.
5. рН-метр.
6. Термостат, обеспечивающий температуру $38 \pm 1^\circ\text{C}$.
7. Флаконы из стеклодрота.
8. Пробки резиновые для флаконов.
9. Фильтровальная бумага.
10. Палочки и воронки стеклянные.

Реактивы и материалы: 1) фосфатный буфер, $\text{pH}=7,8$; 2) ацетилхолинхлорид, 0,4% раствор; 3) трихлоруксусная кислота, 25% раствор; 4) гидроксиламина гидрохлорид, 2 М; 5) гидроксид натрия, 3,5 М; 6) хлороводородная кислота, 4 М; 7) хлороводородная кислота, 0,1 М; 8) раствор хлорида железа (III), 0,37 М.

Приготовление реактивов

Фосфатный буфер, рН 7,8

1. Взвешивают 1,187 г гидрофосфата натрия, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.
2. Взвешивают 0,9072 г дигидрофосфата калия, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят до водой до метки и перемешивают.
3. В мерную колбу вместимостью 100 см³ приливают 93,5 см³ раствора гидрофосфата натрия, добавляют раствор дигидрофосфата калия до объема 100 см³ и доводят рН до 7,8.

0,4% раствор ацетилхолинхлорида

Взвешивают 0,1 г ацетилхолинхлорида, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, доводят очищенной водой до метки и перемешивают.

25% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ)

Взвешивают 6,25 г трихлоруксусной кислоты, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

2 М раствор гидроксиламина гидрохлорида

Взвешивают 3,5 г гидроксиламина гидрохлорида, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят очищенной водой до метки и перемешивают.

3,5 М раствор гидроксида натрия

Взвешивают 3,5 г гидроксида натрия, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

4 М раствор хлороводородной кислоты

В колбу вместимостью 25 см³ с дистиллированной водой добавляют 8,25 см³ хлороводородной кислоты и доводят дистиллированной водой до метки.

0,37 М раствора хлорида железа (III) в 0,1 М растворе хлороводородной кислоты

1. Для приготовления 0,1 М раствора хлороводородной кислоты в мерную колбу с дистиллированной водой вместимостью 25 см³ вносят 0,21 см³ концентрированной хлороводородной кислоты, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.
2. Взвешивают 1,0 г хлорида железа (III) 6-водного (0,6 г хлорида железа (III) безводного), количественно переносят в мерную пробирку вместимостью 10 см³, доводят 0,1 М раствором хлороводородной кислоты до метки, перемешивают. Готовят перед использованием.

Смесь равных объемов 2М раствора гидроксиламина гидрохлорида и 3,5 М раствора гидроксида натрия (готовится перед использованием!).

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. К 1,0 см³ сыворотки крови добавляют 7 см³ дистиллированной воды, перемешивают.

2. Во флаконы из стеклодрота добавляют реактивы в соответствии с таблицей.

Таблица – Последовательность выполнения работы

Реактивы	Флаконы			
	№ 1	№ 2		
1. Фосфатный буфер, рН=6,8 , см ³	1,5	1,5		
2. Дистиллированная вода, см ³	1,5	0,5		
3. Разведенная сыворотка крови, см ³	-	1,0		
4. Ацетилхолинхлорид, 0,4%, см ³	1,0	1,0		
6. Инкубация в термостате при 37 ⁰ С при периодическом перемешивании 30 минут.				
7. 25% ТХУ, см ³	1,0	1,0		
8. Профильтровать в чистые флаконы из стеклодрота				
9. Из каждого флакона отобрать по 1,0 см ³ фильтрата в 2 флакона				
	№ 1.1.	№ 1.2.	№ 2.1.	№ 2.2.
10. Фильтрат	1,0	1,0	1,0	1,0
11. Смесь равных объемов 2 М р-ра гидроксиламина гидрохлорида и 3,5 М р-ра NaOH, см ³	2,0	-	2,0	-
12. 4 М раствор HCl, см ³	1,0	1,0	1,0	1,0
13. Смесь равных объемов 2 М р-ра гидроксиламина гидрохлорида и 3,5 М р-ра NaOH, см ³	-	2,0	-	2,0
14. 0,37 М р-р хлорида железа (III), см ³	1,0	1,0	1,0	1,0

3. Измеряют оптическую плотность проб на спектрофотометре при длине волны 540 нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против воды.

Расчет активности холинэстеразы

1. Количество ацетилхолина (%), негидролизуемое холинэстеразой исследуемого образца крови, рассчитывают по формуле:

$$\%Ацхн = \frac{А_{иссл. обр}}{А_{обр. ср}} \times 100$$

где: *А_{иссл. обр}* – оптическая плотность исследуемого образца сыворотки крови, которая рассчитывается как разность оптических плотностей проб 2.1. и 2.2.; *А_{обр. ср}* – оптическая плотность образца сравнения, которая рассчитывается как разность оптических плотностей проб 1.1. и 1.2.

2. Количество ацетилхолина (%), гидролизуемое холинэстеразой исследуемого образца крови, рассчитывают по формуле:

$$В = 100\% - \%Ацхн$$

3. Активность холинэстеразы, т.е. количество ацетилхолина в мкмоль, гидролизуемого холинэстеразой 1 л крови в течение 1 секунды инкубации (мкмоль/(с·л) рассчитывают по формуле:

$$AchE = \frac{22 \times 1000 \times A \times B}{100 \times 1800} = 0,12 \times A \times B \text{ (мкмоль/с} \cdot \text{л)}$$

где: *A* – разведение сыворотки крови, *B* – количество ацетилхолина (%), гидролизуемое холинэстеразой сывороткой крови, 22 – количество ацетилхолина, добавляемого к пробе, мкмоль, 1000 – коэффициент пересчета на 1 л крови, 1800 – коэффициент для расчета количества ацетилхолина, гидролизуемого холинэстеразой за 1 секунду.

Нормы активности холинэстеразы в крови: 45 – 95 мкмоль/(с·л).

Сделайте вывод об активности холинэстеразы в исследуемой сыворотке крови.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Ферменты. Классификация ферментов сыворотке крови (клеточные, секреторные и экскреторные).

2. Группы клеточных ферментов в зависимости от локализации в тканях

3. Понятия изоферменты, стандартную международную единицу измерения активности ферментов

4. Типы изменений активности ферментов в крови при патологии: гиперферментемия, гипоферментемия, дисферментемия).

5. Методы для определения активности ферментов 2 основные группы (метод конечной точки, метод определения по потреблению субстрата, кофермента либо образования метаболита).

6. В зависимости от особенностей принципа исследования, положенного в основу определения активности ферментов, способы их осуществления подразделяются на несколько групп: (без использования НАД и НАДН₂; каталитические методы, некаталитические методы).

7. Биохимическое действие холинэстеразы.

8. На чем основан принцип определения активности холинэстеразы в сыворотке крови методом Хестрина (в модификации).

9. Рассчитайте, как приготовить следующие реактивы: фосфатный буфер, рН 6,4, 0,8% раствор ацетилхолинхлорида, 46% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 3 М раствор гидроксилamina гидрохлорида, 6,2 М раствор гидроксида натрия, 2 М раствор хлороводородной кислоты, 0,63 М раствора хлорида железа (III) в 0,2 М растворе хлороводородной кислоты, 4,52М раствора гидроксилamina гидрохлорида и 2,7 М раствора гидроксида натрия.

Лабораторная работа № 5
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ
КИНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Цель работы: определить активность аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови.

Задачи работы:

1. Изучить принцип кинетического метода определения активности ферментов в сыворотке крови.
2. Освоить работу на спектрофотометре с термостатируемой кюветой.
3. Определить активность аминотрансфераз в сыворотке крови в традиционной и международной системах единиц и сделать вывод о соответствии полученных результатов норме.

Определение активности аспартатаминотрансферазы (АсАТ)
в сыворотке крови кинетическим методом

Принцип работы. Модифицированный, оптимизированный кинетический метод в соответствии с рекомендациями Международной Федерации Клинической химии (IFCC) без активации пиридоксальфосфатом.

Аспартатаминотрансфераза в присутствии α -кетоглутарата катализирует реакцию трансаминирования L-аспартата с образованием L-глутамата и оксалоацетата. В присутствии малатдегидрогеназы происходит окисление НАДН. Скорость окисления НАДН прямо пропорциональна активности АсТ и измеряется фотометрически при длине волны 340 нм.

АсАТ

- 1) α -кетоглутарат + L-аспартат \leftrightarrow L-глутамат + Оксалоацетат
- 2) Оксалоацетат + НАДН + H^+ \leftrightarrow L-Малат + НАД⁺

Средства измерений, вспомогательное оборудование:

1. Спектрофотометр, программируемый фотометр или биохимический анализатор, длина волны 340 нм, термостатируемая кювета с длиной оптического пути 1 см
2. Термостат, обеспечивающий температуру $37 \pm 1^\circ C$
3. Дозаторы пипеточные 20-200, 100-1000, 1000-5000
4. Флаконы из стеклодрота
5. Пробки резиновые для флаконов
6. Фильтровальная бумага

Реагенты и материалы: 1) стандартный набор реагентов для определения активности ферментов; 2) исследуемая сыворотка крови.

Стандартный диагностический набор для определения активности АсАТ включает:

Ферментный реагент:

Трис-буфер (рН=7,8)	100 ммоль/л
L-аспарагиновая кислота	300 ммоль/л
ЛДГ	≥900 Е/л
МДГ	≥600 Е/л

Субстратный раствор:

α-кетоглутарат	60 ммоль/л
НАДН	0,9 ммоль/л

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Во флаконе из стеклотрота смешать реагенты 1 (ферментный) и 2 (субстрат) в соотношении 4:1).
2. Рабочий реагент прогреть до температуры измерения (37°C).
3. В кювету пипетировать 1,0 см³ рабочего реагента и 0,1 см³ сыворотки крови.
4. Перемешать, через 1 минуту измерить поглощение против воздуха при длине волны 340 нм и одновременно включить секундомер.
5. Измерить повторно поглощение через последующие 1,2 и 3 минуты.
6. Рассчитать среднюю величину измерения поглощения за 1 минуту (ΔА/мин) и использовать ее в расчете:

$$\text{Активность АсАТ (Е/л)} = \Delta A / \text{мин} \times F,$$

где ΔА/мин – изменение оптической плотности пробы за одну минуту, ед. опт. плотн.; F – фактор пересчета для выражения активности АсТ в Е/л;

Применять следующие значения фактора F:

$$F (37^\circ\text{C}) = 1745$$

$$F (25^\circ\text{C}, 30^\circ\text{C}) = 952$$

Фактор пересчета результатов, выраженных в традиционной системе единиц в Международную систему единиц (кат/л):

$$1 \text{ Е/л} = 16,67 \times 10^{-3} \text{ мккат/л}$$

$$1 \text{ мккат/л} = 60 \text{ Е/л}$$

Диапазон референтных величин:

Группы	25°C	30°C	37°C
Мужчины	до 18 Е/л	до 25 Е/л	до 37 Е/л
Женщины	до 15 Е/л	до 21 Е/л	до 31 Е/л

Сделать вывод об активности аспаратаминотрансферазы в исследуемой сыворотке крови.

Определение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови кинетическим методом

Принцип работы. Модифицированный, оптимизированный кинетический метод в соответствии с рекомендациями Международной Федерации Клинической химии (IFCC) без активации пиридоксальфосфатом.

Аланинаминотрансфераза в присутствии α -кетоглутарата катализирует реакцию трансаминирования L-аланина с образованием пирувата. В присутствии лактатдегидрогеназы происходит окисление НАДН. Скорость окисления НАДН прямо пропорциональна активности АлАТ и измеряется фотометрически при длине волны 340 нм.

АлАТ

- 1) α -кетоглутарат + L-аланин \leftrightarrow L-глутамат + Пируват
ЛДГ
- 2) Пируват + НАДН + H^+ \leftrightarrow L-Малат + НАД⁺

Средства измерений, вспомогательное оборудование:

1. Спектрофотометр, программируемый фотометр или биохимический анализатор, длина волны 340 нм, термостатируемая кювета с длиной оптического пути 1 см
2. Термостат, обеспечивающий температуру $37 \pm 1^\circ C$
3. Дозаторы пипеточные 20-200, 100-1000, 1000-5000
4. Флаконы из стеклорота
5. Пробки резиновые для флаконов
6. Фильтровальная бумага

Реагенты и материалы: 1) стандартный набор реагентов для определения активности ферментов; 2) исследуемая сыворотка крови.

Стандартный диагностический набор для определения активности АлАТ включает:

1. Ферментный реагент:

Трис-буфер (рН=7,8)	150 ммоль/л
L-аланин	750 ммоль/л
ЛДГ	≥ 1200 Е/л

2. Субстратный раствор:

α -кетоглутарат	90 ммоль/л
НАДН	0,9 ммоль/л

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Во флаконе из стеклорота смешать реагенты 1 (ферментный) и 2 (субстрат) в соотношении 4:1).
2. Рабочий реагент прогреть до температуры измерения ($37^\circ C$).

3. В кювету пипетировать 1 см³ рабочего реагента и 0,1 см сыворотки крови.
4. Перемешать, через 1 минуту измерить поглощение против воздуха при длине волны 340 нм и одновременно включить секундомер.
5. Измерить повторно поглощение через последующие 1,2 и 3 минуты.
6. Рассчитать среднюю величину измерения поглощения за 1 минуту ($\Delta A/\text{мин}$) и использовать ее в расчете:

$$\text{Активность АлАТ (Е/л)} = \Delta A/\text{мин} \times F ,$$

где: $\Delta A/\text{мин}$ – изменение оптической плотности пробы за одну минуту, ед. опт. плотн.; F – фактор пересчета для выражения активности АлТ в Е/л.

Применять следующие значения **фактора F**:

$$F (37^\circ\text{C}) = 1745$$

$$F (25^\circ\text{C}, 30^\circ\text{C}) = 952$$

Фактор пересчета результатов, выраженных в традиционной системе единиц в Международную систему единиц (кат/л):

$$1 \text{ Е/л} = 16,67 \times 10^{-3} \text{ мккат/л}$$

$$1 \text{ мккат/л} = 60 \text{ Е/л}$$

Диапазон референтных величин:

Группы	25°C	30°C	37°C
Мужчины	до 22 Е/л	до 30 Е/л	до 42 Е/л
Женщины	до 17 Е/л	до 23 Е/л	до 32 Е/л

Сделать вывод об активности аланинаминотрансферазы в исследуемой сыворотке крови

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Методы определения активности ферментов в сыворотке крови
2. Характеристика фермента аспаратаминотрансферазы (АсАТ).
3. Характеристика фермента аланинаминотрансферазы (АлАТ).
4. Принцип метода определения активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови кинетическим методом.
5. Принцип метода определение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови кинетическим методом.
6. Перечислите состав набора для определения АсАТ.
7. Перечислите состав набора для определения АлАТ.

Лабораторная работа № 6

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОГЕНА В ТКАНЯХ

Цель работы: определить содержание гликогена в гепатопанкреасе и мышечной ткани легочных моллюсков.

Задачи работы:

1. Приготовить серию градуировочных растворов из стандарта гликогена.
2. Построить градуировочный график по результатам экспериментальных измерений.
3. Определить оптическую плотность анализируемого раствора и, используя уравнение градуировочной зависимости, рассчитать содержание гликогена в 1 г исследуемой ткани.

Принцип работы. Фотометрическое определение содержания гликогена в тканях основано на окрашивании растворов гликогена йодом. Оттенок и интенсивность окраски зависит от его строения (степени разветвленности молекулы, длины наружных цепей и т.д.). Для выделения гликогена ткань разрушается кипячением с гидроксидом калия. После осаждения гликогена этиловым спиртом с последующим центрифугированием и нейтрализацией щелочи насыщенным раствором хлорида аммония молекулы гликогена окрашиваются йодом в присутствии хлорида кальция. Окраска стабильна и не подвержена влиянию температуры. При данном методе отсутствует влияние на результаты исследования полисахаридов, которые не дают окраску с йодом, но высвобождают редуцирующие сахара при гидролизе. Расчет концентрации гликогена проводится по градуировочному графику.

Средства измерений, вспомогательное оборудование:

1. Спектрофотометр
2. Весы лабораторные
3. Цилиндры измерительные вместимостью 50 см³ и 100 см³
4. Колба мерная объемом 25 см³
5. Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 50 см³ и 100 см³
6. Градуированные пробирки вместимостью 10 см³
7. Дозаторы пипеточные 100-1000, 1000-5000
8. Центрифуга ОПН-8 УХЛ 4.2
9. Водяная баня
10. Флаконы вместимостью 10 см³
11. Набор инструментов для отбора пробы тканей (ножницы медицинские, пинцет)
12. Штативы для пробирок пластмассовые
13. Металлический штатив для подогрева пробирок

14. Пробирки центрифужные пластиковые
15. Фильтровальная бумага
16. Палочки стеклянные

Реактивы и материал: 1) йод кристаллический; 2) калия йодид; 3) хлорид кальция; 4) хлорид аммония; 5) гидроксид калия; 6) спирт; 7) гликоген; 8) ткань животного.

Приготовление реактивов

Йодный реактив

Взвешивают 0,13 г кристаллического йода и 1,3 г калия йодида. Соли переносят в градуированную пробирку. Доводят до 5 см³ дистиллированной водой и перемешивают.

Насыщенный раствор кальция хлорида

В склянку вносят дистиллированную воду и добавляют хлористый кальций до прекращения растворения.

Рабочий йодный реактив

В химическом стакане смешивают 65 см³ раствора кальция хлорида с 0,25 см³ йодного реактива. Объемы реактивов могут быть изменены в зависимости от количества исследуемых проб. Раствор готовится непосредственно перед добавлением к пробам.

Насыщенный раствор хлорида аммония

В стеклянный стаканчик вносят дистиллированную воду и добавляют хлорид аммония до прекращения растворения.

33% раствор гидроксида калия

В химическом стакане взвешивают 8,25 г гидроксида калия, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

Растворы гликогена с концентрацией 2 мг/см³ и 0,2 мг/см³

На аналитические весы помещают стеклянный флакон емкостью 10 см³ и тарируют его. Во флакон вносят 10 мг гликогена и добавляют 5,0 см³ дистиллированной воды (раствор 1, концентрация 2 мг/см³). Для лучшего растворения гликогена флакон можно поместить в водяную баню при температуре 37°C. К 1,0 см³ раствора 1 добавляют 9,0 см³ дистиллированной воды и перемешивают раствор стеклянной палочкой (раствор 2, концентрация 0,2 мг/см³).

Градуировочные растворы гликогена

В химические пробирки вносят указанные в таблице 1 количества растворов гликогена 1 и 2, полученных по п. 6, и дистиллированной воды. Градуировочные растворы готовятся непосредственно перед построением градуировочного графика.

Таблица – Градуировочные растворы гликогена

Градуировочные растворы	Раствор гликогена	Объем раствора гликогена, см ³	Объем дистиллированной воды, см ³	Содержание гликогена в пробе, мг
1	1	0,20	0,20	0,4
2	1	0,10	0,30	0,2
3	2	0,40	-	0,08
4	2	0,20	0,20	0,04
5	2	0,10	0,30	0,02
6	2	0,05	0,35	0,01

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. В пластиковые центрифужные пробирки (по 2 параллельные пробы) вносят по 200 мг исследуемой ткани и добавляют 0,9 см³ 33% раствора гидроксида калия.

2. Пробирки нагревают в течение 20 минут при 100°С в водяной бане до полного растворения ткани и охлаждают под проточной водой. В течение этого времени содержимое пробирок встряхивают несколько раз.

3. В пробирки добавляют по 1,3 см³ 96% этилового спирта и перемешивают.

4. Пробирки помещают в водяную баню, доводят раствор до начала кипения и быстро охлаждают в ледяной бане (или под проточной водой) для преципитации гликогена.

5. После охлаждения пробирки центрифугируют в течение 15 минут при 4000-5000 об/мин.

6. Надосадочную жидкость аккуратно сливают и пробирки высушивают, перевернув на фильтровальную бумагу.

7. Для репреципитации гликогена к осадку добавляют 0,9 см³ дистиллированной воды, 1,3 см³ 96% этилового спирта и повторяют п.8.3.5., 8.3.6., 8.3.7.

8. Для нейтрализации избытка щелочи в пробирки добавляют по 0,2 см³ насыщенного раствора хлорида аммония и осадок тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

9. Пробирки нагревают в течение 5 минут в водяной бане при 100°С и охлаждают под проточной водой.

10. В пробирки добавляют 0,2 см³ дистиллированной воды и 2,6 см³ рабочего йодного реактива.

11. Для приготовления контрольной пробы смешивают 0,2 см³ хлорида аммония, 0,2 см³ дистиллированной воды и 2,6 см³ рабочего йодного реактива.

12. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 490 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм против контрольной пробы. Окраска стабильна в течение 1 часа. При оптической плотности

анализируемой пробы выше 1,0 пробу разводят раствором рабочего йодного реактива и при расчете концентрации гликогена учитывают разведение.

Построение градуировочного графика

К приготовленным градуировочным растворам добавляют 2,6 см³ рабочего йодного реактива. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 490 нм в кювете длиной оптического пути 10 мм против контрольной пробы, которая готовится смешиванием 0,2 см³ дистиллированной воды, 0,2 см³ насыщенного раствора хлорида аммония и 2,6 см³ рабочего йодного реактива.

Зависимость оптической плотности раствора от содержания гликогена имеет вид:

$$y = bx ,$$

где: y – оптическая плотность при длине волны 490 нм, x – содержание гликогена в пробе, b – угловой коэффициент линейной зависимости.

Коэффициент аппроксимации считают удовлетворительным при $R^2 \geq 0,994$. Если R^2 получился менее 0,994, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

Содержание гликогена (C , мг/г ткани) рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{A}{b} \times 5 \times k ,$$

где: A – среднее значение оптической плотности анализируемых проб, b – угловой коэффициент линейной зависимости, 5 – коэффициент для пересчета в мг/г ткани, k – коэффициент разведения пробы.

Сделать вывод о полученном результате содержания гликогена в исследуемой печени.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Строение, функции гликогена.
2. Биологическое значение обмена гликогена в печени и мышцах.
3. Принцип методики количественное определение содержания гликогена в гепатопанкреасе и мышечной ткани.
4. Определение аналитического сигнала по градуировочному графику. Принципы построения градуировочного графика и расчета концентрации по нему.
5. Рассчитайте, как приготовить следующие реактивы: 59% раствор гидроксида калия; растворы гликогена с концентрациями 7 мг/см³, 0,7 мг/см³, 1,2 мг/см³, 2,8 мг/см³.

Лабораторная работа № 7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТАХ

Цель работы: определить активность амилазы в сухих и пророщенных зерновках.

Задачи работы:

1. Определить активность амилазы в интактных и пророщенных зерновках злаковых.
2. Рассчитать активность амилазы в исследуемых объектах.
3. Сравнить активность амилазы в исследуемых объектах.

Принцип работы. Методы определения активности амилазы основаны либо на учете количества сахара, образовавшегося под действием фермента на крахмал, либо на учете количества не расщепленного ферментом крахмала, который определяется фотометрически после обработки раствором йода.

Определение суммарной активности амилаз включает выделение амилаз раствором NaCl, инкубацию их со стандартным раствором крахмала в течение заданного промежутка времени и, наконец, колориметрическое определение негидролизованного амилазами остаточного крахмала. Активность амилаз выражается в миллиграммах гидролизованного крахмала за 1 ч на 1 мл раствора ферментов или в миллиграммах гидролизованного крахмала на 1 мг белка за 1 ч (удельная активность).

Средства измерений, вспомогательное оборудование:

1. Спектрофотометр.
2. Весы лабораторные, наименьший предел взвешивания 0,2 г 3-го класса точности.
3. Колбы мерные объемом 25 см³.
4. Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 50 см³ и 100 см³.
5. Градуированные пробирки вместимостью 10 см³.
6. Цилиндры вместимостью 25 см³ и 50 см³.
7. Дозаторы пипеточные 100–1000, 1000–5000.
8. Центрифуга лабораторная.
9. Центрифужные пластиковые пробирки.
10. Ступки с пестиком.
11. Мельница для измельчения тканей.
12. Штативы для пробирок пластмассовые.
13. Фильтровальная бумага.
14. Палочки стеклянные.
15. Термостат.
16. Пробирки химические.

Реактивы и материалы: 1) йод кристаллический; 2) калия йодид; 3) крахмал; 4) хлороводородная кислота; 5) хлорид натрия; 6) тригидрат ацетата натрия; 7) уксусная кислота; 8) зерновки злаковых культур.

Приготовление реактивов

Раствор Люголя

Взвешивают 0,1 г кристаллического йода и 0,2 г калия йодида. Соли переносят в градуированную пробирку. Доводят до 10 см³ дистиллированной водой и перемешивают.

2% раствор крахмала

К 75 см³ кипящей воды приливают взвесь 2 г крахмала в 10 см³ холодной воды, кипятят примерно 1 мин, охлаждают, переносят в мерную колбу на 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

1 М раствор хлороводородной кислоты

Содержимое ампулы фиксанала 1 М переносят в колбу объемом 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

0,1 М раствор хлороводородной кислоты

Содержимое ампулы фиксанала 0,1 М переносят в колбу объемом 1000 см³ и доводят объем до метки.

1% раствор хлорида натрия

В химическом стакане взвешивают 1,0 г хлорида натрия, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

Ацетатный (натрий-ацетатный) буфер

1. *0,2 М раствор ацетата натрия (CH₃COONa·3H₂O).*

Взвешивают 2,72 г тригидрата ацетата натрия (или 1,64 г ацетата натрия безводного), переносят в колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой.

2. *0,2 М раствор уксусной кислоты.*

Взвешивают 1,20 г уксусной кислоты, переносят в колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой.

3. Смешивают 86,0 см³ 0,2 М раствора тригидрата натрия и 14,0 см³ 0,2 М раствора уксусной кислоты.

4. Измеряют рН с помощью рН-метра и доводят рН до 5,5, используя 1 М раствор NaOH

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Приготовление ферментной вытяжки

1. Взвешивают 1 г проросших семян (пшеницы, ячменя, гречки или гороха), помещают в фарфоровую ступку, добавляют немного кварцевого песка, 2 см³ 1% раствора NaCl и тщательно растирают до получения однообразной дисперсной кашицы.

2. Взвешивают 1 г сухих семян и измельчают с помощью мельницы.

3. Добавляют еще по 1 см³ раствора NaCl и продолжают растирание.
4. Затем суспензии отдельно количественно переносят в градуированные пробирки вместимостью 10 см³.
5. Ступку с пестиком ополаскивают небольшими порциями раствора NaCl, следя за тем, чтобы объем суспензии в пробирке не превысил 10 см³.
6. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 30 мин.
7. Затем пробирки вынимают из холодильника и центрифугируют в течение 15 мин при 3000 об/мин.
8. Надосадочную жидкость (препарат амилаз) осторожно сливают в чистые сухие колбы вместимостью 50 см³, закрывают и при необходимости помещают в холодильник.

Приготовление субстрата

Активность амилаз, выделенных из того или иного растительного объекта, определяют при помощи специально приготовленных растворов чистого крахмала заданной концентрации.

В химические пробирки вносят реактивы согласно таблице:

Реактивы	Опыт	Контроль
Ацетатный буфер, pH=5,5, см ³	3,0	3,0
Крахмал, 2% раствор, см ³	3,0	3,0
Ферментный препарат, см ³	0,5	-
H ₂ O, см ³	-	0,5
Термостат, 37°C, 20 мин		
1 М HCl, см ³	2,0	2,0
	↓	↓
В мерные колбы вместимостью 25 см ³		
H ₂ O, см ³	≈12,5	≈12,5
0,1 М HCl, см ³	0,5	0,5
Раствор Люголя, см ³	0,02	0,02
Смесь из пробирок, см ³	0,5	0,5
H ₂ O	до 25 см ³	до 25 см ³
Измерить оптическую плотность при длине волны 595 нм, кювета 1 см		

Активность амилазы (в мг гидролизованного крахмала за 1 ч на 1 мл ферментативного раствора) рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{E_k - E_o}{E_k} \times \frac{3 \times 2}{60}$$

где E_k и E_o – оптическая плотность контрольного и опытного раствора, 3 – пересчетный коэффициент на 1 ч, 2 – пересчетный коэффициент на 1 мл ферментного раствора, 60 – пересчетный коэффициент на 1 мг крахмала (3 см³ 2% раствора соответствуют 60 мг).

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Характеристика амилазных ферментов.

2. Классификация амилолитических ферментов.
3. α -Амилазы биологическое действие.
4. Механизмом регуляции скорости расщепления крахмала.
5. Приготовление ферментной вытяжки из растительного сырья.
6. Принцип методики определения активности амилазы в растительных объектах.
7. Рассчитайте, как приготовить следующие реактивы: 12% раствор крахмала; 1,6 М раствор хлороводородной кислоты; 0,3 М раствор хлороводородной кислоты; 6% раствор хлорида натрия; ацетатный (натрий-ацетатный) буфер рН до 4,2; 0,7 М раствор ацетата натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$); 0,9 М раствор уксусной кислоты; 0,27 М раствора тригидрата натрия.

Лабораторная работа № 8

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СОСТАВА

Цель работы: Выделить нуклеиновые кислоты из дрожжей и выполнить качественные реакции на компоненты нуклеопротеинов.

Задачи работы:

1. Выделить нуклеопротеины из дрожжей.
2. Провести гидролиз нуклеопротеинов.
3. Доказать состав нуклеопротеинов с использованием качественных реакций.

Принцип работы. Определение нуклеиновых кислот основано на предварительном гидролизе нуклеопротеидов и последующим качественным реакциям на полученные продукты. Гидролиз нуклеопротеидов происходит при кипячении с разбавленной серной кислотой. Этот процесс можно представить следующей схемой:



Средства измерений, вспомогательное оборудование:

1. Весы лабораторные, наименьший предел взвешивания 0,2 г 3-го класса точности.
2. Пробирки центрифужные.
3. Ступки с пестиком.
4. Плитка электрическая.
5. Центрифуга лабораторная.
6. Колба круглодонная.
7. Штативы для пробирок пластмассовые.
8. Фильтровальная бумага.
9. Палочки стеклянные.
10. Пробирки химические.
11. Колбы мерные объемом 50 см³ и 100 см³.
12. Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 50 см³ и 100 см³.
13. Градуированные пробирки вместимостью 10 см³.
14. Цилиндры вместимостью 25 см³ и 50 см³.
15. Дозаторы пипеточные 100–1000, 1000–5000.

Реактивы и материалы: 1) дрожжи пекарские, прессованные, 2) диэтиловый эфир; 3) гидроксид натрия, 0,4% раствор; 4) уксусная кислота, 5% раствор; 5) стеклянный порошок или речной песок; 6) серная кислота, 5% раствор; 7) серная кислота, концентрированная; 8) гидроксид натрия, 10% раствор; 9) аммиак, концентрированный раствор (20–25%-ный); 10) сернокислая медь, 1% раствор; 11) тимол, 1% спиртовой раствор; 12) аммиачный раствор окиси серебра; 12) молибденовый реактив.

Приготовление реактивов

0,4% раствор гидроксида натрия

Взвешивают 0,4 г гидроксида натрия, количественно переносят в колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

5% раствор уксусной кислоты

Взвешивают 5 г уксусной кислоты, количественно переносят в колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

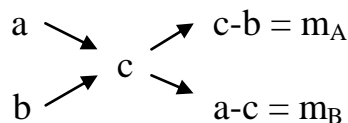
аммиачный раствор окиси серебра

К 1-2%-ному раствору азотнокислого серебра добавляют концентрированный раствор аммиака до растворения образующегося вначале осадка.

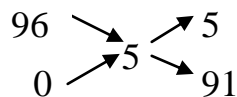
5% раствора серной кислоты

Правило креста или правила смешения. Суть его заключается в составлении «креста», в виде которого располагают две прямые линии. В центре пишут ту концентрацию, которую надо получить, у концов линий креста слева – концентрации исходных растворов (большую – сверху, меньшую — снизу), у концов линий креста справа –

искомые концентрации (или массы) растворов, которые получают вычитанием по направлению линий из большей величины меньшей. В общем виде схема **решения задач по правилу креста** имеет вид:



Чистый растворитель (воду) можно представить как раствор с массовой долей растворенного вещества 0%



Определим m раствора с $\omega(\text{H}_2\text{SO}_4) = 96\%$, который надо влить в 1 л воды: 5 г H_2SO_4 надо влить в 91 г воды.

10% раствор гидроксида натрия

Взвешивают 10 г гидроксида натрия, количественно переносят в колбу вместимостью 100 см^3 , доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

1% раствора сульфата меди

Взвешивают 1 г сульфата меди, количественно переносят в колбу вместимостью 100 см^3 , доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

молибденовый реактив

3,75 г молибденовокислого аммония растворяют в 50 см^3 воды и добавляют 50 см^3 32%-ной азотной кислоты ($\rho_{20} = 1,200$). Полное растворение соли происходит только после прибавления азотной кислоты.

1% спиртовой раствор тимола

Взвешивают 0,1 г тимола, количественно переносят градуированную пробирку вместимостью 10 см^3 , доводят объем дистиллированной водой до 10 см^3 и перемешивают.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Выделение нуклеопротеинов

1. 5 г дрожжей увлажняют в ступке с 1 см^3 диэтилового эфира и 1 см^3 воды, добавляют немного стеклянного порошка или песка и растирают с 0,4% раствором гидроксида натрия, приливая его небольшими порциями (по $5-10 \text{ см}^3$). Всего расходуют до 25 см^3 раствора щелочи; растирание продолжают в течение 15-20 минут.

2. Полученный раствор центрифугируют в течение 10 мин. при 2500 об/мин.

3. Центрифугат переливают в стакан и к нему по каплям добавляют 5%-ный раствор уксусной кислоты до полного осаждения нуклеопротеинов (обычно расходуют $10-15 \text{ см}^3$ раствора).

4. Осадок отделяют центрифугированием.
5. Осадок нуклеопротеинов переносят в круглодонную колбу, смывая его 5% серной кислотой.
6. Остаток кислоты вливают в колбу с осадком. Всего расходуют не более 20-25 см³ раствора.
7. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником, ставят на асбестовую сетку, нагревают на малом огне до кипения и кипятят 1-1,5 ч.
8. Гидролизат и фильтруют через бумажный фильтр.
9. С фильтратом прodelьвают реакции на полипептиды, пуриновые основания, пентозы и фосфорную кислоту.

Исследование продуктов гидролиза нуклеопротеинов

1. Качественная реакция на полипептиды. С частью фильтрата (1-2 см³) прodelьвают биуретовую реакцию.

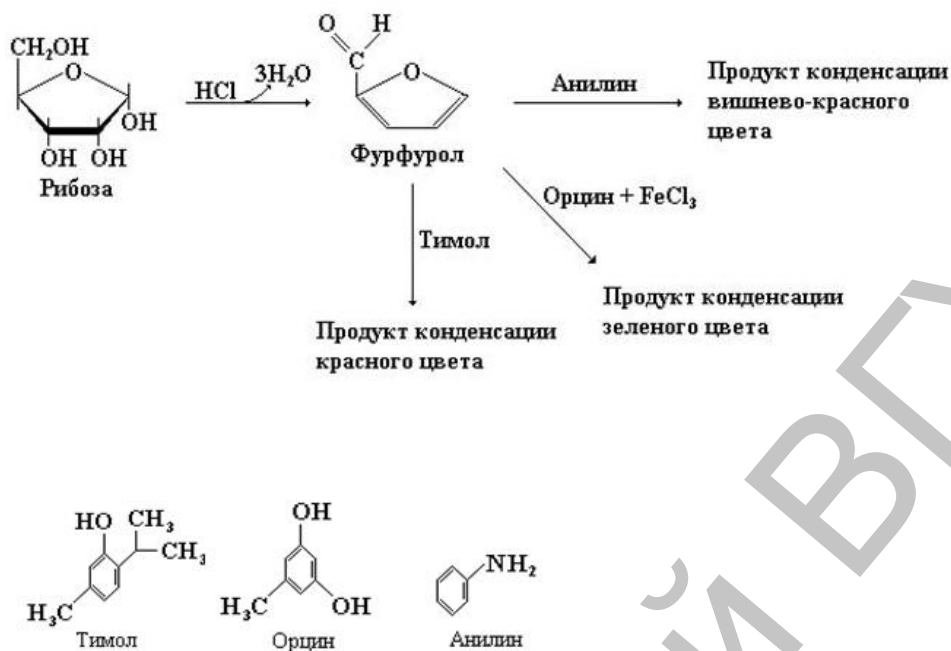
2. Качественная реакция на пуриновые основания. К 2 см³ фильтрата добавляют концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции по лакмусовой бумаге и приливают 1 см³ аммиачного раствора окиси серебра. Через несколько минут выпадают хлопья осадка серебряных солей пуриновых оснований.

3. Качественная реакция на пентозы. Открытие пентоз основано на реакции с тимолом и концентрированной серной (соляной) кислотой. Серная кислота вызывает дегидратацию пентоз и образование фурфурола, который с тимолом дает соединения красного цвета (продукты конденсации). К 1 см³ фильтрата добавляют 2-3 капли 1%-ного спиртового раствора тимола и по стенке пробирки осторожно наслаивают 1 см³ концентрированной серной кислоты. Жидкость окрашивается в красный цвет. Окраска более выражена на границе раздела слоев. Пентозы можно обнаружить также с помощью реакций с орцином, или флороглюцином, или фелинговой жидкостью.

4. Качественная реакция на фосфорную кислоту. Фосфорная кислота образует с молибденовым реактивом желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония:



К 1-2 см³ фильтрата приливают равный объем молибденового реактива, нагревают до кипения и кипятят 2-3 мин. Появляется желтое окрашивание, обусловленное образованием фосфорномолибденовокислого аммония. При стоянии выпадает желтый осадок.



Сделать вывод о полученном результате содержания нуклеиновых кислот в исследуемых дрожжевых клетках и изученных свойствах.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Нуклеиновые кислоты, нуклеотиды.
2. Типы и функции ДНК.
3. Типы РНК и их функции.
4. Выделение нуклеопротеинов из дрожжевых клеток.
5. Схема гидролиза нуклеопротеидов и схема дегидратации пентоз.
6. Исследование продуктов гидролиза нуклеопротеинов: качественная реакция на полипептиды, качественная реакция на пуриновые основания, качественная реакция на пентозы, качественная реакция на фосфорную кислоту.
7. Рассчитайте, как приготовить следующие реактивы: 0,65% раствор гидроксида натрия; 8% раствор уксусной кислоты; 3,4% раствора серной кислоты; 23,4% раствор гидроксида натрия; 0,34% раствора сульфата меди; 14,2% молибденовокислого аммония; 37,41% спиртовой раствор тимола.

Лабораторная работа № 9 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА И ЛИПОПРОТЕИНОВ

Цель работы: определить содержание общего холестерина и холестерина липопротеинов высокой плотности (α -холестерина) в сыворотке крови.

Задачи работы:

1. Определить содержание общего холестерина в сыворотке крови по методу Златкис-Зака.
2. Определить содержание холестерина липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови.

Определение содержания холестерина в сыворотке крови по реакции с хлорным железом (метод Златкис-Зака)

Принцип работы. Холестерин сыворотки или плазмы крови окисляется хлорным железом в присутствии уксусной, серной и ортофосфорной кислот с образованием продукта красно-фиолетового цвета. Интенсивность развивающейся окраски пропорциональна концентрации холестерина.

Реактивы и материалы: 1) ледяная уксусная кислота; 2) концентрированная серная кислота; 3) железо хлористое ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); 4) ортофосфорная кислота 85%; 4) холестерин.

Средства измерений, вспомогательное оборудование:

1. Весы лабораторные, наименьший предел взвешивания 0,2 г 3-го класса точности
2. Пробирки центрифужные
3. Рефрижераторная центрифуга
4. Спектрофотометр
5. Штативы для пробирок пластмассовые
6. Фильтровальная бумага
7. Палочки стеклянные
8. Термостат 25°C
9. Пробирки химические
10. Колбы мерные объемом 50 см³ и 100 см³
11. Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 50 см³ и 100 см³
12. Градуированные пробирки вместимостью 10 см³
13. Цилиндры вместимостью 25 см³ и 50 см³
14. Дозаторы пипеточные 100–1000, 1000–5000
15. Ледяная баня

Приготовление реактивов

2,5% раствор хлорида железа

На весах в стаканчиках для взвешивания взвешивают 0,25 г хлорного железа и растворяют в 5 см³ ортофосфорной кислоты при нагревании до полного растворения. Затем раствор охлаждают и доводят объем до 10 см³.

цветной реактив

В колбу емкостью 50 см³ наливают 4 см³ раствора хлорного железа, затем очень медленно до метки наливают концентрированную серную кислоту.

стандартный раствор холестерина, 3 ммоль/л

Взвешивают 11,6 мг холестерина и растворяют в 10 см³ ледяной уксусной кислоты.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. В химические пробирки добавляют реактивы в количествах, указанных в таблице:

Реактивы	Опытная проба	Стандартная проба	Контрольная проба
Сыворотка крови, см ³	0,05	-	0,05
Стандартный раствор холестерина, см ³	-	0,05	-
Уксусная кислота, см ³	1,3	1,3	1,3
Цветной реактив	1,0	1,0	-
Концентрированная серная кислота	-	-	1,0

2. Пробирки осторожно встряхивают, инкубируют 30 мин при комнатной температуре, измеряют оптическую плотность против контрольной пробы при длине волны 530 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

3. Расчет проводится по стандартной пробе либо по калибровочному графику.

Реактивы	№ пробирки			
	1	2	3	4
Стандартный раствор холестерина, см ³	0,05	0,1	0,15	0,2
Ледяная уксусная кислота, см ³	1,3	1,25	1,2	1,15
Цветной реактив, см ³	1,0	1,0	1,0	1,0
Концентрация холестерина в пробе (ммоль/л)	3,0	3,0	3,0	3,0

4. Стандартные пробы встряхивают, инкубируют 30 мин при комнатной температуре, затем измеряют оптическую плотность против контрольной пробы при длине волны 530 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Нормальные значения концентрации общего холестерина – 3,9–6,5 ммоль/л

Сделать вывод о полученном результате содержания холестерина в исследуемой сыворотке крови.

Определение холестерина липопротеинов высокой плотности

Принцип работы. Липопротеины низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП или β-ЛП или пре-β-ЛП) осаждаются гепарином в присутствии ионов Mn²⁺ и отделяют от липопротеинов высокой плотности

(ЛПВП или α -ЛП) путем центрифугирования. В надосадочной жидкости определяют содержание холестерина любым из перечисленных методов.

Реактивы и материалы: 1) Раствор хлористого марганца 1 мМ; 2) гепарин, фармакопейный препарат, содержащий 5000 ЕД в 1 мл; 3) реактивы для определения общего холестерина.

Приготовление реактивов

1 мМ раствора хлористого марганца

Взвешивают 9,9 мг $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ и растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 50 см³ и доводят затем до метки. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Пробирки с 1 см³ сыворотки устанавливают на ледяной бане, затем последовательно добавляют 0,04 см³ раствора гепарина и 0,04 см³ хлорида марганца, все тщательно перемешивают и оставляют в тех же условиях на 30 мин.

2. Пробы центрифугируют в рефрижераторной центрифуге 30 мин при 2500 об/мин.

3. Затем осторожно, чтобы не взмутить осадок, в котором находятся β -ЛП, отбирают надосадочную жидкость, содержащую α -ЛП.

Схема обнаружения холестерина α -ЛП представлена в таблице:

Реактивы	Опытная проба	Стандартная проба	Контрольная проба
Надосадочная жидкость, см ³	0,1	-	0,1
Стандартный раствор холестерина, см ³	-	0,1	-
Уксусная кислота, см ³	1,3	1,3	1,3
Цветной реактив	1,0	1,0	-
Концентрированная серная кислота	-	-	1,0

4. Пробирки осторожно встряхивают, инкубируют 30 мин при комнатной температуре, измеряют оптическую плотность против контрольной пробы при длине волны 530 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Концентрацию α -ЛП рассчитывают по формуле:

$$\alpha\text{-Холестерин} = \frac{A_{оп} \times 0,1 \times 1,08}{A_{ст} \times 0,1} \times 3,0 = \frac{A_{оп}}{A_{ст}} \times 3,24 \text{ (ммоль/л)}$$

где 0,1 – объем надосадочной жидкости; 1,08 – общий объем (сыворотка, гепарин, $MnCl_2$); 3 – концентрация стандартного раствора (ммоль/л); $A_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартной пробы.

Нормальные значения концентрации α -холестерина – 0,9–1,9 ммоль/л.

Сделать вывод о полученном результате содержания холестерина липопротеинов высокой плотности в исследуемой сыворотке крови.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Группы липопротеинов и их функции.
2. Количество сывороточных липидов в норме.
3. Особенности транспорта липидов сыворотки крови.
4. Принцип методики определения содержания холестерина в сыворотке крови.
5. Принцип методики определения содержания холестерина липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови.
6. Рассчитайте, как приготовить следующие реактивы: 8,2% раствор хлорида железа из $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 4 ммоль/л стандартный раствор холестерина; 1,7 мМ раствора хлористого марганца из $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 3,2 М ортофосфорной кислоты.

Лабораторная работа № 10 СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Цель работы: определить содержание аскорбиновой кислоты в разных растительных объектах.

Задачи работы:

1. Определить количество витамина С в листьях капусты.
2. Определить содержание витамина С в листьях салата.
3. Сравнить содержание витамина С в исследуемых объектах.

Принцип работы. Метафосфорная кислота инактивирует аскорбатпероксидазу и осаждает имеющиеся белки, благодаря чему возможно точно определить поглощение именно аскорбиновой кислотой.

Средства измерений, вспомогательное оборудование:

1. Спектрофотометр
2. Весы лабораторные, наименьший предел взвешивания 0,2 г 3-го класса точности
3. Колбы мерные объемом 50 см³
4. Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 50 см³ и 100 см³
5. Градуированные пробирки вместимостью 10 см³
6. Цилиндры мерные вместимостью 25 см³ и 50 см³
7. Дозаторы пипеточные 100-1000, 1000-5000
8. Центрифуга лабораторная
9. Центрифужные пластиковые пробирки
10. Ступки с пестиком

12. Штативы для пробирок пластмассовые
13. Фильтровальная бумага
14. Палочки стеклянные
16. Пробирки химические

Реактивы и материалы: 1) листья салата, капусты или других растений; 2) 2% HPO_3 ; 3) 0,21 М Na_3PO_4 .

Приготовление реактивов

2% раствор метафосфорной кислоты

Взвешивают 1 г HPO_3 , переносят в мерную колбу на 50 см³ и доводят дистиллированной водой до метки.

0,21 М Na_3PO_4

Взвешивают 1,7 г фосфата натрия, переносят в мерную колбу на 50 см³ и доводят водой до метки.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Готовят гомогенат из растительной ткани, для этого навеску растительного материала (1 г) гомогенизируют с 10 мл 2%-ной метафосфорной кислоты.

2. Гомогенат переносят в мерную колбу на 50 см³. Объем доводят до метки 2 %-ной HPO_3 и 0,21 М Na_3PO_4 , взятыми в соотношении 3:2 (V/V, рН 7,3 - 7,4).

3. Экстракт центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин.

4. Оптическую плотность раствора измеряют на спектрофотометре при 265 нм против холостой пробы – вышеуказанных растворов HPO_3 и Na_3PO_4 , взятых в том же соотношении.

5. Результаты вычисляют с учетом коэффициента молярной экстинкции аскорбиновой кислоты при 265 нм – $1,655 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Содержание аскорбиновой кислоты выражают в мкг/г сырого веса.

Сделать вывод о содержании аскорбиновой кислоты в различных растительных объектах.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. В чем заключается антиоксидантная активность аскорбиновой кислоты?
2. Кофактором какого фермента является аскорбиновая кислота?
3. Почему аскорбиновая кислота неустойчивая?
4. Как водорастворимый витамин С защищает жирорастворимый витамин Е?
5. На чем основан принцип фотометрического определения аскорбиновой кислоты?
6. Какова суточная потребность витамина С для человека?
7. Перечислите основные источники витамина С.

Лабораторная работа № 11

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИННОГО АЗОТА

Цель работы: определить содержание аминного азота в различных биологических жидкостях.

Задачи работы:

1. Определить содержание аминного азота в сыворотке крови.
2. Определить содержание аминного азота в гемолимфе улиток.
3. Сравнить содержание аминного азота в разных биологических объектах.

Принцип работы. Аминокислоты дают с нингидрином интенсивное окрашивание, которое может быть использовано для их количественного определения.

Средства измерений, вспомогательное оборудование:

1. Спектрофотометр
2. Весы лабораторные, наименьший предел взвешивания 0,2 г 3-го класса точности
3. Колбы мерные объемом 50 см³
4. Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 50 см³ и 100 см³
5. Градуированные пробирки вместимостью 10 см³
6. Цилиндры мерные вместимостью 25 см³ и 50 см³
7. Дозаторы пипеточные 100-1000, 1000-5000
8. Центрифуга лабораторная
9. Центрифужные пластиковые пробирки
10. Ступки с пестиком
12. Штативы для пробирок пластмассовые
13. Фильтровальная бумага
14. Палочки стеклянные
16. Пробирки химические

Реактивы и материалы: 1) 10% вольфрамвокислый натрий; 2) 2/3 н серная кислота; 3) 0,1 н КОН; 4) фосфатный буфер рН 6,8; 5) 0,05 М фосфатный буфер (рН 7,8); 6) 1% свежеприготовленный водный раствор нингидрина; 7) 0,714 М раствор глицина; 0,1 М NaOH; 0,25% фенолфталеин.

Приготовление реактивов

10% вольфрамвокислый натрий

Взвешивают 2,5 г вольфрамвокислого натрия, переносят в мерную колбу на 25 см³ и доводят водой до метки.

2/3 н серная кислота

1,85 мл H_2SO_4 довести до 100 см³ водой в мерной колбе (лить осторожно кислоту в воду!).

0,1 н КОН

Взвешивают 0,28 г гидроксида калия (работать в перчатках и защитных очках!), переносят в мерную колбу на 50 см³ и доводят до метки водой.

фосфатный буфер рН 6,8

Готовится из смеси равных частей КН₂РО₄ 0,908 г на 100 см³ воды и Na₂НРО₄ 2Н₂О – 1,187 г на 100 см³ воды).

1% свежеприготовленный водный раствор нингидрина

Взвешивают на аналитических весах 0,01 г нингидрина и растворяют в 1 см³ воды.

0,714 М раствор глицина (1 см³ раствора содержит 0,1 мг аминного азота).

Взвешивают 0,54 г глицина и растворяют в 10 см³ воды.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. К 1мл биологической жидкости приливают 0,5 мл вольфрамата натрия и перемешивают, затем по каплям добавляют 0,5 мл 2/3 н Н₂SO₄, тщательно перемешивают и дают постоять.

2. Полученную смесь центрифугируют 15 мин при 1500 об/мин. Затем 1 мл центрифугата помещают в пробирку и нейтрализуют 0,1 М NaOH (индикатор 0,25 % фенолфталеин).

3. К нейтральному раствору приливают 2 мл фосфатного буфера (рН 6,8) и 0,25 мл 1% раствора нингидрина.

4. Аналогично готовят холостую пробу, только вместо центрифугата берут 1 мл Н₂О.

5. Пробирки ставят в кипящую водяную баню на 20-30 мин, при этом развивается лиловое окрашивание.

6. Оптическую плотность измерить при 560 нм против холостой пробы.

7. Количество аминного азота рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по стандартному раствору глицина. Содержание свободных аминокислот выражают в мг/г сырого или сухого материала.

Сделать вывод о содержании аминного азота в различных биологических жидкостях.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. В чем заключается биологическая ценность белков?
2. Назовите незаменимые аминокислоты.
3. Азотистый баланс, его виды, значение.
4. Основные пути использования аминокислот в организме человека.
5. На чем основан принцип колориметрического определения аминокислот?

Лабораторная работа № 12

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФЕНОЛОВ

Цель работы: определить суммарное содержание фенольных соединений и флавоноидов в сухих листьях растений.

Задачи работы:

1. Определить содержание фенольных соединений в спиртовых экстрактах растений.
2. Определить содержание флавоноидов в спиртовых экстрактах растений.
3. Сравнить суммарное содержание фенолов и флавоноидов в листьях различных растений.

Количественное определение суммы фенольных соединений

Принцип метода. Метод основан на реакции полифенольных соединений с реактивом Фолина-Чиокальтеу, содержащим фосфорномолибдат и вольфрамат натрия. Определяется восстанавливающая способность гидроксильных групп фенольных соединений, которые с реактивом Фолина-Чиокальтеу образуют окрашенный комплекс. Интенсивность окраски позволяет судить о количестве фенольных веществ.

Средства измерений, вспомогательное оборудование:

1. Спектрофотометр
2. Весы лабораторные, наименьший предел взвешивания 0,2 г 3-го класса точности
3. Колбы мерные объемом 25 и 50 см³
4. Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 50 см³ и 100 см³
5. Градуированные пробирки вместимостью 10 см³
6. Цилиндры мерные вместимостью 25 см³ и 50 см³
7. Дозаторы пипеточные 100–1000, 1000–5000
8. Центрифуга лабораторная
9. Центрифужные пластиковые пробирки
10. Ступки с пестиком
12. Штативы для пробирок пластмассовые
13. Фильтровальная бумага
14. Палочки стеклянные
16. Пробирки химические с обратным холодильником

Реактивы и материалы: 1) сухие листья растений; 2) реактив Фолина-Чиокальтеу; 3) 10% Na₂CO₃.

Приготовление реактивов

10% Na₂CO₃

Взвешивают 2,5 г карбоната натрия, переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят водой до метки.

Получение экстракта

Навеску растительного материала (0,5 г) измельчают, заливают 10 мл 96% этанолом и оставляют в темном месте на ночь. Экстракт сливают, а материал заливают 10 мл 70% этанола и ставят на водяную баню с обратным холодильником на 30 мин.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. К 0,5 мл полученного спиртового экстракта прибавляют 3,5 мл H_2O , 0,1 мл реактива Фолина-Чиокальтеу и 2 мл 10% раствора карбоната натрия, все тщательно перемешивают.

2. Выдерживают 15 мин в темном месте.

3. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 720 нм против H_2O .

Содержание суммы фенольных соединений в процентах (X) в пересчете на галловую кислоту в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{E \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{V_3 \cdot m \cdot (100 - W) \cdot \varepsilon}$$

где E – оптическая плотность исследуемого раствора; V_1 – объем экстракта, мл (50 мл); V_2 – объем раствора для спектрофотометрирования, мл (10 мл); V_3 – объем экстракта, взятый для определения, мл (0,2 мл); ε – удельный показатель поглощения галловой кислоты в комплексе с реактивом Фолина-Чиокальтеу при длине волны 720 нм, равный 90; m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Количественное определение суммы флавоноидов

Принцип метода. Для флавонов и флавонолов, в частности, для рутина характерны два максимума поглощения – коротковолновый (260 нм) и длинноволновый (362 нм), что может быть использовано не только с целью идентификации веществ, но в плане количественной оценки, особенно в условиях дифференциальной спектрофотометрии. При этом в присутствии $AlCl_3$ образуется батохромный сдвиг длинноволновой полосы с образованием максимума при длине волны 410 нм (аналитическая длина волны). Этот подход является одним из самых используемых при анализе растительного сырья, содержащего флавоноиды, поскольку позволяет минимизировать вклад сопутствующих веществ в оптическую плотность исследуемых растворов.

Реактивы и материалы: 1) сухие листья растений; 2) 0,05 М $AlCl_3$.

Приготовление реактивов

0,05 М $AlCl_3$ в этаноле

Взвешивают 0,17 г хлорида алюминия, помещают в мерную колбу на 25 см³ и доводят до метки этанолом.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. К 0,5 мл полученного спиртового экстракта прибавляют 2,5 см³ 0,05 М раствора алюминия хлорида в этаноле.
2. Дают постоять 30 мин.
3. Оптическую плотность полученного раствора измеряют при длине волны 410 нм против 0,05 М раствора хлорида алюминия в этаноле.
4. Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на гликозиды кверцетина в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{E \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{V_3 \cdot m \cdot (100 - W) \cdot \varepsilon}$$

где E – оптическая плотность исследуемого раствора; ε – удельный показатель поглощения гликозидов кверцетина в комплексе с алюминия хлоридом в этаноле при длине волны 410 нм, равный 330; V_1 – объем экстракта, мл (50 мл); V_2 – объем раствора для спектрофотометрирования, мл (5,1 мл); V_3 – объем экстракта, взятый для определения, мл (0,1 мл); M – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Сделать вывод о содержании суммы фенольных соединений и суммы флавоноидов в различных растительных объектах.

Учебное издание

ДАНЧЕНКО Елена Олеговна

ЧИРКИН Александр Александрович

БАЛАЕВА-ТИХОМИРОВА Ольга Михайловна

ТОЛКАЧЕВА Татьяна Александровна

ЛАБОРАТОРНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ
студентами биологического факультета
специальности 1-02 04 04 «Биология. НПД»

Технический редактор

Г.В. Разбоева

Компьютерный дизайн

Л.Р. Жигунова

Подписано в печать 2017. Формат 60x84¹/₁₆. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 2,51. Уч.-изд. л. 1,39. Тираж экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/255 от 31.03.2014 г.

Отпечатано на ризографе учреждения образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.