

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. Толкачёва**

ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ЖИВОТНЫХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ

*Методические рекомендации
к выполнению лабораторных работ*

*Витебск
ВГУ имени П.М. Машерова
2020*

УДК [581.13+577.121]:001.891(076.5)

ББК 28.672.3я73+28.572.3я73

Л12

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 3 от 30.12.2019.

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

Рецензент:

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

Л12 **Лабораторная оценка показателей метаболизма животных и растительных объектов** : методические рекомендации к выполнению лабораторных работ / Е.О. Данченко, А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова, Т.А. Толкачёва. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2020. – 50 с.

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ подготовлены в соответствии с учебной программой по дисциплине «Спецпрактикум по биохимии» для студентов биологического факультета специальности 1-31 01 01-02 Биология. НПД.

УДК [581.13+577.121]:001.891(076.5)

ББК 28.672.3я73+28.572.3я73

© Данченко Е.О., Чиркин А.А., Балаева-Тихомирова О.М., Толкачёва Т.А., 2020
© ВГУ имени П.М. Машерова, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Лабораторная работа № 1. Правила работы с оборудованием в биохимической лаборатории	5
Лабораторная работа № 2. Количественное определение белка биуретовым методом	12
Лабораторная работа № 3. Количественное определение белка по методу Лоури	16
Лабораторная работа № 4. Определение содержания нуклеиновых кислот в тканях	21
Лабораторная работа № 5. Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови	23
Лабораторная работа № 6. Определение активности ферментов в сыворотке крови кинетическим методом	29
Лабораторная работа № 7. Определение активности амилазы в растительных объектах	35
Лабораторная работа № 8. Количественное определение содержания гликогена в тканях	39
Лабораторная работа № 9. Количественное определение содержания липидов в тканях	42
Лабораторная работа № 10. Спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты	46
Лабораторная работа № 11. Количественное определение растительных фенолов	47

ВВЕДЕНИЕ

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ по дисциплине «Спецпрактикум по биохимии» предназначены для студентов биологического факультета специальности 1-31 01 01-02 Биология. НПД, специализация «Биохимия». Данные рекомендации составлены с учетом современных требований к практическим навыкам, предъявляемым при выполнении лабораторных исследований.

Структура рекомендаций соответствует требованиям учебной программы. Издание включает 11 лабораторных работ. Его структура построена таким образом, чтобы дать теоретическое представление о работе и принципах методов, а также пошагово предложить инструкцию к выполнению практической части. В конце каждой лабораторной работы приводятся вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию.

Методические рекомендации углубляют знания по биохимии и позволяют освоить работу на лабораторном оборудовании, изучить основные принципы определения биохимических параметров биологических жидкостей и тканей живых организмов, изучить особенности работы с растительными и животными объектами.

Лабораторная работа № 1

Правила работы с оборудованием в биохимической лаборатории

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.

1. Автоматические пипетки. Техника пипетирования

Автоматические пипетки переменного объема предназначены для забора и дозирования точного объема жидкости.

Пипетки работают на принципе воздушного смещения/вытеснения (т.е. между плунжером и жидкостью имеется объем воздуха) с использованием съемных разовых наконечников.

Управление работой осуществляется с помощью плунжера.

Вращением головки плунжера задается требуемый объем дозируемой жидкости.

Заданные значения дозируемых объемов показываются в окошке, расположенном на корпусе пипетки.

Забор и дозирование точных объемов жидкости происходит при движении плунжера между 3-мя функциональными стоп-позициями:

Стартовая стоп-позиция готовности (Ready Position) – в верхней точке;

Первая стоп-позиция (First Stop) – в промежуточной точке;

Вторая стоп-позиция (Second Stop) – в нижней точке плунжера.

Все модели пипеток имеют встроенный сбрасыватель наконечников.

Диапазон объемов пипеток:

Дозируемый объем	Шаг
2–20 мкл	0,1 мкл
20–200 мкл	1,0 мкл
100–1000 мкл	5,0 мкл
1000–5000 мкл	50 кл

1.1. Установка объема дозирования

1. Требуемый объем устанавливается вращением операционной кнопки, расположенной наверху пипетки: по часовой стрелке – увеличение объема, против часовой стрелки – уменьшение объема. Значение выбранного объема появляется в окошке дисплея на корпусе пипетки.

2. Цифры, показывающие объем дозирования должны быть целиком видны в окне дисплея и установлены до щелчка.

3. Запрещается устанавливать объем, выходящий за границы диапазона дозирования пипетки. Чрезмерное усилие при выкручивании операционной кнопки за пределы диапазона дозирования приводит к нарушению деталей внутреннего механизма, что приведет к поломке пипетки!

1.2. Техника пипетирования

1. Всегда нажимайте и отпускайте операционную кнопку плавно, особенно при работе с растворами высокой вязкости.

2. Никогда не отпускайте кнопку резко при обратном движении.

3. Убедитесь, что наконечник плотно держится на посадочном месте.

4. Перед началом работы наполните и опустошите наконечник 2-3 раза раствором, с которым необходимо работать.

5. При наборе реагента удерживайте пипетку в строго вертикальном положении.

6. Упор на пипетке должен опираться на указательный палец.

1.2.1 Прямой метод

1. Нажмите на операционную кнопку до первой остановки (рис. 1).

2. Погрузите наконечник в раствор примерно на глубину 1 см и плавно отпустите кнопку. Извлеките наконечник, аккуратно снимая излишки раствора о край емкости.

3. Отдозируйте набранную жидкость в емкость, плавно нажимая на кнопку до первой остановки. Через секунду возобновите нажатие операционной кнопки до второй остановки. После выполнения данной операции наконечник должен полностью опустошиться.

4. Отпустите кнопку в исходное положение. При необходимости смените наконечник и продолжайте пипетирование.

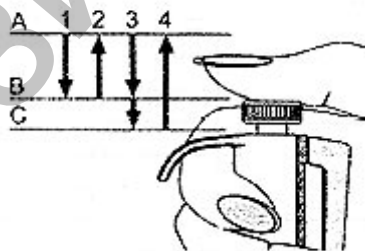


Рис. 1 – Техника прямого пипетирования

1.2.2. Обратный метод

Обратный метод используется для работы с жидкостями, имеющими **высокую вязкость или склонность к вспениванию**, а также при работе с **малыми объемами**.

1. Держа пипетку вертикально, нажмите операционную кнопку до второй остановки (до упора) (рис. 2).

2. Погрузите наконечник в дозируемый раствор примерно на 1 см и плавно отпустите кнопку (при этом наконечник заполняется). Извлеките наконечник из раствора, аккуратно снимая излишки с край посуды.

3. Нажав на операционную кнопку до первой остановки, выпустите раствор. По окончании этого действия немного раствора останется в наконечнике. Этот остаток раствора не должен включаться в дозируемый раствор и должен быть удален вместе с наконечником при его сбросе или слит обратно в резервуар путем нажатия операционной кнопки до упора (до второй остановки).

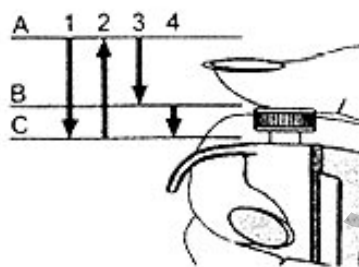


Рис. 2 – Техника обратного пипетирования

1.2.3 Метод повторов

1. Нажмите кнопку до второй остановки.
2. Погрузите наконечник примерно на 1 см в глубину раствора и плавно отпустите кнопку. Наконечник заполняется. Снимите излишек раствора с край емкости.
3. Дозируйте раствор, плавно нажимая на кнопку до первой остановки. Удерживайте кнопку на первой остановке. Немного раствора останется в наконечнике. Этот остаток раствора не должен включаться в дозируемый объем.
4. Продолжайте дозирование, выполняя пункты 2 и 3 (рис.3).

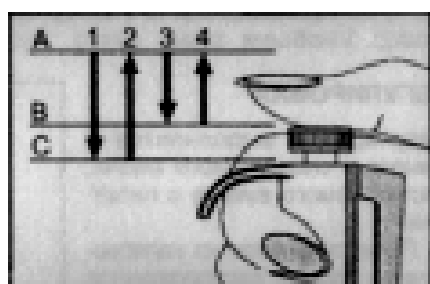


Рис. 3 – Метод повторов

1.3 Пипетирование цельной крови

1. Выполните пункты 1 и 2 прямого метода работы. Тщательно вытрите наконечник сухой чистой тканью.

2. Погрузите наконечник в реагент и нажмите кнопку до первой остановки. Убедитесь, что наконечник погружен в раствор.

3. Плавно отпустите кнопку в исходное положение. Наконечник будет заполняться раствором. Удерживайте наконечник в растворе.

4. Нажмите кнопку до первой остановки и плавно освободите. Повторяйте эту процедуру до тех пор, пока внутренняя поверхность наконечника не станет чистой.

5. В конце операции нажмите кнопку до второй остановки, чтобы полностью опустошить наконечник (рис. 4).

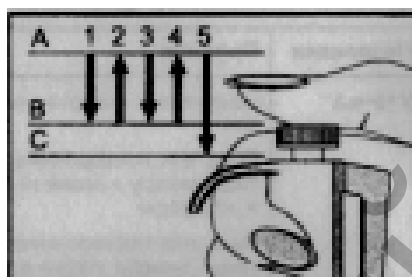


Рис. 4 – Пипетирование цельной крови

1.4 Поверочная калибровка пипетки

1. Пипетки проверяются на максимальном объеме (или номинальном объеме) или минимальном объеме или 10% от максимального объема или выше.

2. Наконечник, используемый первый раз, должен быть предварительно смочен путем забора и слива жидкости 3-5 раз.

3. Выполните дозирование дистиллированной воды 10 раз в приемный сосуд, вес которого предварительно измерен.

4. Пересчитайте вес дозы в объем по специальной формуле.

1.5 Формулы для вычисления результатов

Точность (систематическая ошибка) – величина, характеризующая разницу между дозируемым объемом и установленным объемом на пипетке.

$$\delta = \frac{V_{\text{ср}} - V_{\text{ном}}}{V_{\text{ном}}} \quad V_{\text{ср}} = \frac{\sum_{i=1}^n V_i}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n M_i}{n\rho} ,$$

где δ – точность (%), $V_{\text{ср}}$ – среднее значение объема (мкл); $V_{\text{ном}}$ – номинальный объем; V_i – объем дозы (мкл), M_i – вес дозы (мг), ρ – удельная плотность воды, 0,998 мг/см³ при +20-25°C, n – число измерений (10).

Воспроизводимость (случайная, несистематическая ошибка)

Воспроизводимость – величина, характеризующая повторяемость дозирования.

$$\sigma = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - V_{\text{ср}})^2}{n - 1}}}{V_{\text{ср}}} \times 100\%,$$

где σ – воспроизводимость (%), $V_{\text{ср}}$ – среднее значение объема (мкл), V_i – объем дозы (мкл), n – число измерений (10).

Таблица – Пределы при калибровке пипеток

Диапазон	Объем, мкл	Точность, %	Воспроизводимость, %
0,5–10 мкл	10	±2,5	3,0
	1	±10,0	7,0
5–50 мкл	50	±2,0	2,5
	5	±5,0	5,0
20–200 мкл	200	±1,5	2,0
	20	±2,0	3,0
100–1000 мкл	1000	±1,0	1,0
	100	±1,5	2,0
1–5 см ³	5000	±1,0	1,0
	1000	±1,0	1,0

2. Техника взвешивания на аналитических весах

Аналитические весы – это высокоточный весоизмерительный прибор. На них взвешивают порошки, вещества в жидком и твердом агрегатных состояниях.

Работа с аналитическими весами требует соблюдения следующих принципов:

1. При работе на весах необходимо проявлять осторожность, не делать резких движений.

2. Не рекомендуется переносить весы. После перемещения выдерживать весы перед включением в электрическую сеть минимум 2 часа и дать им возможность выстояться минимум 12 часов.

3. За 20-30 минут перед началом измерений чуть открыть дверку кожуха, чтобы температура внутри весов выровнялась с окружающей средой.

4. Весы всегда должны находиться в чистоте. При попадании на чашку весов сыпучих веществ их удаляют специальной кисточкой или перышком.

5. Для взвешивания необходимо пользоваться чистой сухой посудой (бюкс, стакан, часовое стекло, тигель), помещать вещества непосредственно на чашку весов запрещено. Летучие и гигроскопичные вещества следует взвешивать только в закрытых бюксах.

6. Температура взвешиваемого предмета и окружающей среды должна быть одинакова. Нельзя взвешивать теплые предметы и растворы.

7. Высыхание образца или поглощение им влаги приводит к колебаниям его веса. Поэтому сосуды с образцами обязательно накрывать пробками, крышками.

8. Нельзя помещать на весы образцы предельной нормы и тяжелее.

9. До взвешивания и после него показатели весов должны равняться нулю.

10. Помещать взвешиваемый предмет на середину чашек весов. Избегать толчков, ударов по весам.

11. Все дверки весов во время взвешивания должны быть закрыты.

12. Защищать весы специальными чехлами.

13. Порошковые вещества помещать на блюдце или бумагу.

14. Применять салфетки, пинцеты, щипчики, не загрязнять весы пылью или жиром.

3. Основные правила центрифугирования

1. Установка центрифуги проводится в строго горизонтальном положении.

2. На одном лабораторном столе не рекомендуется ставить более одной центрифуги и оборудования, чувствительного к вибрации.

3. Напольная центрифуга должна быть размещена на твердом покрытии пола: бетонная стяжка, керамическая плитка.

4. Во избежание поражения электрическим током центрифугу необходимо заземлить.

5. Установка центрифуги проводится таким образом, чтобы у вентиляционных отверстий оставалась свободная зона не менее 30 см.

6. Потоки воздуха от центрифуги не должны быть направлены на людей.

7. Воздух в помещении не должен содержать примесей агрессивных паров и газов.

8. Во избежание инфицирования, повреждений кожных покровов необходимо работать в перчатках.

9. При неточной загрузке центрифуги каждую пару наполненных пробирок размещать в диаметрально противоположных положениях ротора.

10. Пробирки следует наполнять не более чем на 1 см от края.

11. При установке не закрывающихся пробирок, пробирки заполнять на 75% максимального объема.

12. Перед началом работы центрифугирования необходимо убедиться, что ротор надежно закреплен и свободно вращается.

13. При закрывании крышки центрифуги должен быть слышен «щелчок» включения микровыключателя блокирующего устройства.

14. Крышку ротора центрифуги разрешается открывать только полной остановки ротора.

15. Должен соблюдаться правильный выбор параметров центрифугирования согласно инструкции производителя центрифуги (тип ротора,

адаптера, скорость и продолжительность вращения, величины центробежного ускорения, допустимый уровень дисбаланса, соблюдение температурного режима).

4. Правила работы с центрифугой ОПН-8

1. Проверить заземление прибора.
2. Запрещается при работе со стеклянными пробирками устанавливать частоту вращения ротора свыше 2000 об/мин. Запрещается работать с открытой крышкой центрифуги при вращающемся роторе.
3. Запрещается открывать крышку центрифуги до полной остановки ротора.
4. Запрещается работать с разностью масс диаметрально противоположных пробирок, заполненных центрифугатом более 0,5 г.

Порядок работы с центрифугой

1. Открыть крышку центрифуги, отвернуть крышку ротора.
2. Установить пробирки, заполненные центрифугатом, в гнезда ротора, причем каждую пару наполненных пробирок размещать диаметрально противоположных гнездах ротора.
3. Завернуть крышку ротора и закрыть крышку центрифуги.
4. Подключить сетевой шнур центрифуги к сети переменного тока.
5. Установить ручкой, расположенной слева, требуемое время центрифугирования с учётом времени разгона.
6. Выключатель часов, расположенный слева, установить в положение «включено», при этом на клавише будет видна красная точка.
7. Установить ручкой на датчике частоты вращения ротора, расположенной справа, на требуемое число оборотов.
8. Выключатель цепи питания, расположенный справа, установить в положение включено, при этом на клавише будет видна красная точка.
9. Ротор начнёт вращаться через некоторое время (30-45 с) и автоматически достигнет заданной частоты вращения.
10. После истечения требуемого времени центрифугирования отключить центрифугу от сети выключателем, расположенным справа, в положение выключено, при этом на клавише исчезнет красная точка.
11. После полной остановки ротора открыть крышку центрифуги, отвернуть крышку ротора и вынуть пробирки.
12. Если произошёл пролив центрифугата в гнезде ротора, необходимо удалить центрифугат из гнезда, промыть дистиллированной водой и просушить.

Порядок выполнения работы

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

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

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Основные объекты биохимических исследований. Подготовка объекта к биохимическому исследованию.
2. Этапы фракционирования клеток (гомогенизация, экстракция, центрифугирование, электрофорез, хроматография).
3. Автоматические пипетки, этапы пипетирования. Прямое и обратное пипетирование.
4. Поверочная калибровка пипетки (точность, воспроизводимость).
5. Техника взвешивания на аналитических весах.
6. Основные правила центрифугирования.

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.

Фотометрические методы определения концентрации растворов основаны на сравнении поглощения или пропускания света стандартными и исследуемыми растворами. Степень поглощения света фотометрируемым раствором измеряют с помощью фотоколориметров и спектрофотометров. Измерение оптической плотности стандартного и исследуемого окрашенных растворов всегда производят по отношению к раствору сравнения (нулевой раствор, контрольный раствор, холостая проба). В качестве раствора сравнения можно использовать аликвотную часть исследуемого раствора, содержащего все добавленные компоненты, кроме реагента, образующего с определяемым веществом окрашенное соединение. Если добавляемый реагент и все остальные компоненты раствора сравнения бесцветны и, следовательно, не поглощают лучей в видимой области спектра то в качестве раствора сравнения можно использовать дистиллированную воду.

Метод градуировочного графика. Для определения содержания вещества методом градуировочного графика готовят серию из 5–8 стандартных растворов разных концентраций и измеряют оптическую плотность каждого из растворов, делая не менее 3 параллельных определений для каждой точки.

При выборе интервала концентраций стандартных растворов руководствуются следующими положениями:

1) он должен охватывать область возможных изменений концентраций исследуемого раствора. Желательно, чтобы оптическая плотность исследуемого раствора соответствовала примерно середине градуировочной кривой;

2) необходимо, чтобы в этом интервале концентраций при выбранной толщине кюветы l и аналитической длине волны λ (в большинстве случаев $\lambda = \lambda_{\text{макс}}$) соблюдался основной закон светопоглощения, т.е. градуировочный график $A = f(C)$ был линейным;

3) интервал рабочих значений λ , соответствующий интервалу стандартных растворов, должен обеспечивать максимальную воспроизводимость измерений.

При совокупности перечисленных условий измеряют оптическую плотность стандартных растворов относительно растворителя и строят график зависимости $A = f(C)$. Полученная кривая называется градуировочной (калибровочной) кривой или градуировочным графиком и имеет вид прямой, выходящей из начала координат. Экстраполировать калибровочную прямую к значениям оптических плотностей, лежащим выше последней экспериментально полученной точки не рекомендуется. Периодически 1 раз в неделю (или реже), калибровочную кривую проверяют по 2–3 свежеприготовленным стандартным растворам. Калибровочные графики, построенные с реактивами разных партий, как правило, не совпадают. Поэтому при смене реактивов график необходимо построить заново. График, построенный при работе на одном приборе, нельзя использовать для расчета результатов, полученных на другом приборе.

Определив оптическую плотность опытного раствора A_x находят ее значение на оси ординат, а затем на оси абсцисс – соответствующее ей значение концентрации C_x .

В отличие от других фотометрических методов, метод градуировочного графика позволяет определить концентрацию окрашенных растворов даже в тех случаях, когда основной закон светопоглощения не соблюдается. Для построения градуировочной кривой в этих случаях приготавливают значительно большее число стандартных растворов, отличающихся друг от друга по концентрации не более чем на 10%. Такой градуировочный график, имеющий на пологом участке угол наклона не менее 15° , все же позволяет проводить фотометрические измерения, несмотря на то, что между концентрацией раствора и его оптической плотностью нет линейной зави-

симости. Воспроизводимость определений в этом случае ниже, чем в случае линейной зависимости.

Зависимость $A = f(C)$ в общем виде математически можно выразить прямой линией, проходящей через начало координат: $A = bc$, где b – угловой коэффициент линейного градуировочного графика и он равен $b = \frac{C}{A}$.

В дальнейшем при расчете искомой концентрации C_x пользуются только градуировочный коэффициент:

$$C_x = \frac{A_x \cdot b \cdot V}{V_1},$$

где A_x – оптическая плотность анализируемого раствора; b – градуировочный коэффициент; V – общий объем пробы, см^3 ; V_1 – объем пробы, взятой на анализ; C_x – искомая концентрация, мкг (мг).

Если при фотометрировании растворов допускается какая-то систематическая погрешность, то графическая зависимость также может выражаться прямой линией, но не проходящей через начало координат. В этом случае в уравнении прямой появляется свободный член a и уравнение имеет следующий вид: $A = a + bc$.

Если отклонений от основного закона светопоглощения избежать не удастся и графическая зависимость $A = f(C)$ становится нелинейной, то такую зависимость с достаточной степенью приближения можно аппроксимировать уравнением параболы, проходящей через начало координат:

$$A = ac + bc^2,$$

где a и b – коэффициенты в уравнении параболы.

Метод сравнения оптических плотностей стандартного и исследуемого раствора. Для определения концентрации вещества берут aliquотную часть исследуемого раствора, приготавливают из нее окрашенный раствор для фотометрирования и измеряют оптическую плотность. Затем аналогично приготавливают стандартный раствор определяемого вещества известной концентрации и измеряют их оптические плотности при той же толщине слоя (в тех же кюветах). Концентрацию вещества рассчитывают по формуле:

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

где $A_{\text{оп}}$ – оптическая плотность опытной пробы; $A_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандартной пробы; $C_{\text{ст}}$ – концентрация определяемого вещества в стандартном растворе.

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, оборудование: весы, дозаторы, спектрофотометр

Реактивы и материал:

1. 0,9% раствор хлорида натрия: 0,225 г хлорида натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

2. Биуретовый реактив.

3. 10% раствор сывороточного альбумина: 1 г сывороточного альбумина растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

4. Материал: сыворотка крови

Порядок выполнения работы

1. Определение концентрации белка в сыворотке крови по градуировочному графику.

1.1 В химических пробирках готовят градуировочные растворы белка:

№	Раствор белка (см ³)	0,9% раствор NaCl (см ³)	Концентрация белка (г/дм ³)
1.	0,2	0,8	20
2.	0,4	0,6	40
3.	0,6	0,4	60
4.	0,8	0,2	80
5.	1,0	–	100

1.2 В химические пробирки вносят реактивы согласно таблице:

Реактивы, см ³	Опытная проба	Холостая проба
Сыворотка крови	0,1	-
Биуретовый реактив	5,0	5,0
0,9% хлорид натрия	–	0,1

1.3 В химические пробирки № 1–5 отбирают по 0,1 см³ каждого градуировочного раствора белка.

1.4 К градуировочным растворам, опытной и холостой пробам добавляют по 5,0 см³ биуретового реактива.

1.5 Пробы и градуировочные растворы перемешивают и инкубируют 30 мин при 18–25°С.

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

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

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

2. Определение содержания белка в сыворотке крови методом сравнения оптических плотностей

2.1 В химические пробирки вносят реактивы согласно таблице:

Реактивы, см ³	Опытная проба	Холостая проба	Стандартная проба
Сыворотка крови	0,1	-	
Биуретовый реактив	5,0	5,0	5,0
Хлорид натрия, 0,9%	-	0,1	-
Стандартный раствор белка (80 г/дм ³)	-	-	0,1

2.2 Пробы перемешивают и инкубируют 30 мин при 18-25°C.

2.3 Измеряют оптическую плотность опытной и стандартной пробы относительно холостой пробы на спектрофотометре при длине волны 540 нм.

2.4 Концентрацию общего белка в сыворотке крови рассчитывают по формуле:

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

где $C_{\text{оп.}}$ – концентрация белка в сыворотке крови, г/л; $A_{\text{оп.}}$ – оптическая плотность опытной пробы; $A_{\text{ст.}}$ – оптическая плотность стандартной пробы; $C_{\text{ст.}}$ – 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. Методы расчета концентрации вещества (метод градуировочного графика, метод стандартов, метод добавок).

2. Принцип метода молекулярной абсорбционной спектроскопии (спектрофотометрии).

3. Приборы, используемые в спектрофотометрии. Схема их строения.

4. Практическое применение спектрофотометрии.

5. Опишите принцип количественного определения белков в сыворотке крови биуретовым методом.

Лабораторная работа № 3

Количественное определение белка по методу Лоури

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

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.

Печень является органом, регулирующим поступление азотистых веществ в организм и их выведение. В периферических тканях постоянно протекают реакции биосинтеза с использованием свободных аминокислот, либо выделение их в кровь при распаде тканевых белков. Несмотря на это, уровень белков и свободных аминокислот в плазме крови остаётся постоянным. Это происходит благодаря тому, что в клетках печени имеется уникальный набор ферментов, катализирующих специфические реакции обмена белков. После приёма белковой пищи в клетки печени по воротной вене поступает большое количество аминокислот. Эти соединения могут претерпевать в печени ряд превращений, прежде чем поступить в общий кровоток. К этим реакциям относятся: а) использование аминокислот для синтеза белков; б) трансаминирование – путь синтеза заменимых аминокислот; осуществляет также взаимосвязь обмена аминокислот с глюконеогенезом и общим путём катаболизма; в) дезаминирование – образование α -кетокислот и аммиака; г) синтез мочевины – путь обезвреживания аммиака; д) синтез небелковых азотсодержащих веществ (холина, креатина, никотинамида, нуклеотидов и т.д.). В клетках печени синтезируются многие белки плазмы крови: альбумины (около 12 г в сутки), большинство α - и β -глобулинов, в том числе транспортные белки (ферритин, церулоплазмин, трансферрин, ретинолсвязывающий белок и др.). Многие факторы свёртывания крови (фибриноген, протромбин, проконвертин, проакцелерин и др.) также синтезируются в печени.

Принцип метода. Из количественных методов определения белков наиболее широкое применение в биохимической практике получил метод Лоури. Этот метод 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, оборудование:

Весы, спектрофотометр, центрифуга, дозаторы пипеточные

Реактивы и материал:

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

1.1. 0,1 М раствор NaOH (м.м. NaOH 40 г/моль): 0,4 г гидроксида натрия переносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

1.2. 2% раствор Na_2CO_3 в 0,1 М растворе NaOH (м.м. карбоната натрия 105,99 г/моль): 2 г карбоната натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят объем до метки 0,1 М раствором NaOH .

2. 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$: 1,56 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, переносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

3. 2% раствор натрия лимонно-кислого: 2 г натрия лимонно-кислого переносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

4. Раствор В (готовится перед определением) - смесь равных объемов 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ и 2% раствора цитрата натрия. Смешивают 25 cm^3 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ и 25 cm^3 2% раствора цитрата натрия.

5. Раствор С (готовится перед определением): к 50 cm^3 раствора А добавляют 1 cm^3 раствора В.

6. Реактив Фолина состоит 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).

7. Стандартный раствор кристаллического сывороточного альбумина 0,25 мг/ cm^3 в 0,1 М растворе NaOH : к 12,5 мг альбумина добавляют 5,0 cm^3 дистиллированной воды (концентрация 2,5 мг/ cm^3). Для лучшего растворения альбумина флакон можно поместить в водяную баню при температуре 37°C. К 1,0 cm^3 раствора 1 добавляют 9,0 cm^3 дистиллированной воды и перемешивают раствор стеклянной палочкой (концентрация 0,25 мг/ cm^3).

8. 1 М раствор NaOH (м.м. NaOH 40 г/моль): взвешивают 4 г гидроксида натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

9. 6 % раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ): 1,5 г ТХУ переносят в мерную колбу вместимостью 25 cm^3 , доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

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

Порядок выполнения работы

1. Гомогенизация и экстракция белков

1.1 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).

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

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

1.4 Центрифугат сливают в центрифужные пробирки вместимостью 20 см³.

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

1.6 Раствор центрифугируют в центрифуге ОПН в течение 10 минут при 2500 об/мин.

1.7 Осадок белка растворяют в 1-2 см³ 1М NaOH.

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

2. Количественное определение белка

2.1 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.

2.2 В холостую пробу добавляют 0,1 см³ дистиллированной воды и 0,9 см³ 0,1 М раствора NaOH.

2.3 В опытную и холостую пробирки приливают 2 см³ рабочего раствора С (смесь растворов А и В), хорошо перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре.

2.4 Добавляют 0,2 см³ реактива Фолина и немедленно тщательно перемешивают.

2.5 Через 30 мин после развития окраски 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.

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

3. Построение градуировочного графика

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

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

3.3 Доводят объем каждой пробирки до 1 см³ дистиллированной водой.

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

3.5 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.

3.6 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.

3.7 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 другой размерности, например, в г или мг на 100 г.

Таблица – Приготовление растворов белка для построения градуировочного графика

№	Объем стандартного раствора белка, см ³	Объем Н ₂ О, см ³	Объем реактива С, см ³	Объем реактива Фолина, см ³	Общий объем раствора, см ³	Содержание 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
контроль	-	1,0	2	0,2	3,2	-	-

После окончания работы необходимо сделать вывод о полученном результате содержания белка в исследуемых животных тканях.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Опишите процесс гомогенизации животной ткани.
2. Объясните принцип количественного определения белков по методу Лоури в животных тканях.
3. Сравните методы определения белков – биуретовый метод и метод Лоури.

Лабораторная работа № 4

Определение содержания нуклеиновых кислот в тканях

Цель работы: количественно определить содержание нуклеиновых кислот в животных тканях.

Задачи работы:

1. Приготовить растворы, необходимые для выполнения лабораторной работы.
2. Выполнить гидролиз нуклеиновых кислот.
3. Количественно рассчитать содержание нуклеиновых кислот в тканях, используя пересчетный коэффициент, рассчитанный на основании содержания фосфора.

Методы количественного определения нуклеиновых кислот, основанные на спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра, отличаются высокой чувствительностью и простотой проведения анализа. Необходимым этапом различных методов спектрофотометрического определения нуклеиновых кислот является их экстракция из биологического материала, сопряженная с гидролизом полинуклеотидов. Определение по фосфору считается наиболее надежным методом оценки количества нуклеиновых кислот, так как его процентное содержание в наименьшей степени зависит от нуклеотидного состава, для ДНК оно составляет 9,8–10,1%, для РНК – 9,1–9,6. При определении фосфора нуклеиновых кислот в тканях необходимо предварительно удалить свободные нуклеотиды, неорганический фосфат, а также все фосфорсодержащие соединения ненуклеотидной природы, в частности липиды.

Различные органы отличаются по содержанию нуклеиновых кислот. В органах, богатых клетками (селезенка, поджелудочная железа, щитовидная железа) отмечается высокое содержание нуклеиновых кислот; в мышцах и мозге содержание нуклеиновых кислот низкое. Тканям с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, богатым ядерным веществом, свойственна высокая концентрация ДНК. В тканях с большим объемом цитоплазмы и обилием цитоплазматических гранул много РНК.

Средства измерений, оборудование:

Весы, спектрофотометр, центрифуга

Реактивы и материалы:

1. **Среда для гомогенизации:** 0,48 г хлорида магния, 0,37 г хлорида калия, 8,55 г сахарозы растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.
2. **0,2 М раствор хлорной кислоты** (м.м. HClO₄ 100 г/моль, ρ=1,55 г/дм³, 60,75%): 1,1 см³ HClO₄ переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.
3. **0,3 М раствор хлорной кислоты** (м.м. HClO₄ 100 г/моль, ρ= 1,55 г/дм³, 60,75%): 1,6 см³ HClO₄ переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

4. 0,5 М раствор хлорной кислоты (м.м. HClO_4 100 г/моль, $\rho = 1,55 \text{ г/дм}^3$, 60,75%): $2,7 \text{ см}^3 \text{ HClO}_4$ переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

5. 0,6 М раствор хлорной кислоты (м.м. HClO_4 100 г/моль, $\rho = 1,55 \text{ г/дм}^3$, 60,75%): $3,2 \text{ см}^3 \text{ HClO}_4$ перенесут в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

6. 1,0 М раствор хлорной кислоты (м.м. HClO_4 100 г/моль, $\rho = 1,55 \text{ г/дм}^3$, 60,75%): $5,3 \text{ см}^3 \text{ HClO}_4$ переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

7. 0,6 М раствор гидроксида калия (м.м. KCl 74,6 г/моль): $2,24 \text{ г KOH}$ растворяют в 25 см^3 дистиллированной воды, переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят до метки дистиллированной водой.

8. Материал исследования: печень или гепатопанкреас.

Порядок выполнения работы

1. Гомогенизация ткани

1.1. Навеску ткани массой 200 мг гомогенизируют на холоду в фарфоровой ступке с $0,8 \text{ см}^3$ среды для гомогенизации (1:4).

2. Выделение нуклеиновых кислот и гидролиз РНК

2.1 В центрифужные пробирки наливают $0,1 \text{ см}^3$ гомогената и добавляют $2,0 \text{ см}^3$ $0,3 \text{ М HClO}_4$ (в осадке – белок, ДНК, РНК).

2.2 Пробирки помещают на 15 мин в лед или холодильник для охлаждения.

2.3 Пробирки центрифугируют 10 мин при $5000\text{--}6000 \text{ об/мин}$.

2.4 Надосадочную жидкость выливают.

2.5 К осадку добавляют $2,0 \text{ см}^3$ $0,2 \text{ М HClO}_4$ и осадок размешивают стеклянной палочкой.

2.6 Пробирки центрифугируют 10 мин при $5000\text{--}6000 \text{ об/мин}$.

2.7 Надосадочную жидкость выливают и к осадку добавляют $0,5 \text{ см}^3$ дистиллированной воды и $0,5 \text{ см}^3$ $0,6 \text{ М KOH}$.

2.8 Пробирки помещают на $1\text{--}24 \text{ часа}$ в термостат при 37°C (для растворения осадка и гидролиза РНК).

2.9 Пробирки переносят в лед на 1 час (или на 30 мин при -20°).

2.10 В пробирки добавляют по $2,0 \text{ см}^3$ $0,6 \text{ М HClO}_4$, оставляют на 15 мин во льду. Выпадает осадок ДНК и белок. Нуклеотиды РНК остаются в супернатанте.

2.11 Пробирки центрифугируют 10 мин при $5000\text{--}6000 \text{ об/мин}$.

2.12 Надосадочную жидкость сливают в большие чистые пробирки.

2.13 К осадку добавляют по $2,0 \text{ см}^3$ $0,5 \text{ М HClO}_4$, размешивают на холоду.

2.14 Пробирки центрифугируют 10 мин при $5000\text{--}6000 \text{ об/мин}$.

2.15 Надосадочную жидкость сливают в те же пробирки.

2.16 Для определения количества РНК измеряют оптическую плотность при длине волны 260 нм против $0,6 \text{ М HClO}_4$.

3. Гидролиз ДНК

3.1 К осадку добавляют 4 см³ 1 М НСlO₄, осадок перемешивают.

3.2 Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 20 мин.

3.3 После охлаждения пробирки центрифугируют 10 мин при 5000–6000 об/мин.

3.4 Надосадочную жидкость сливают в малые чистые химические пробирки.

3.5 Для определения ДНК измеряют оптическую плотность при длине волны 270 нм и 290 нм против 1 М НСlO₄.

4. Содержание ДНК рассчитывают по формуле:

$$X \text{ (мг/г) ткани} = ((A_{270} - A_{290}) \times 221 \times 10 \times V) / m,$$

где V – объем гомогената, m – масса ткани, г

5. Содержание РНК рассчитывают по формуле:

$$X \text{ (мг/г) ткани} = (A_{260} \times 1,6 \times 10 \times V) / m,$$

где V – объем гомогената, m – масса ткани, г

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Нуклеиновые кислоты, строение, значение в организме.
2. Принцип метода определения нуклеиновых кислот в тканях.
3. Объясните формулу расчета содержания нуклеиновых кислот в тканях.
4. Рассчитайте приготовление растворов хлорной кислоты, необходимой для работы, с учетом плотности раствора и содержания хлорной кислоты.

Лабораторная работа № 5

Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови

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.

Принципы определения активности ферментов в сыворотке крови

Ферменты – специфические белки, выполняющие в организме роль биологических катализаторов. Ферменты содержатся во всех клетках организма, где их концентрация значительно выше, чем в плазме крови. Наиболее часто в качестве объекта исследования используется сыворотка крови, ферментный состав которой относительно постоянен и имеет разнообразное происхождение. Нормальные уровни активности ферментов в сыворотке крови отражают соотношение между биосинтезом и высвобождением ферментов (при обычном обновлении клеток), а также их клиренсом из кровотока. Повышение скорости обновления ферментов, повреждение клеток или индуцирование синтеза обычно приводят к повышению ак-

тивности ферментов в сыворотке крови, где выделяют три группы ферментов: **клеточные, секреторные и экскреторные.**

Клеточные ферменты в зависимости от локализации в тканях делят на две группы: **неспецифические ферменты**, которые катализируют общие для всех тканей реакции обмена и находятся в большинстве органов и тканей; **органоспецифические**, или **индикаторные**, ферменты, специфичные только для определенного типа тканей. В сыворотке крови активность клеточных ферментов **низкая или вообще отсутствует.** При патологических процессах активность ферментов этой группы в сыворотке крови зависит от скорости высвобождения из клеток, которая, в свою очередь, определяется скоростью повреждения клеток, и степенью их повреждения.

Секреторные ферменты (псевдохолинэстераза) поступают непосредственно в плазму крови и выполняют в ней специфические функции. Эти ферменты синтезируются в **печени** и постоянно высвобождаются в плазму. Их активность в сыворотке крови **выше, чем в клетках или тканях.** **Экскреторные** ферменты образуются **органами пищеварительной системы** (поджелудочной железой, слизистой оболочкой кишечника, печенью, эндотелием желчных путей). К ним относится α -амилаза, щелочная фосфатаза. В норме их активность в сыворотке крови **низкая и постоянная.** Однако при патологии, когда блокирован любой из обычных путей экскреции, активность этих ферментов в сыворотке крови значительно увеличивается.

Измеряемая активность ферментов может быть обусловлена действием весьма близких по свойствам, но несколько отличающихся друг от друга молекулярных форм ферментов. Эти различных формы фермента получили название **изоферментов.** Исследование изоферментов представляет интерес, когда отдельные изоферменты образуются в разных тканях.

Для количественной оценки активности ферментов Комиссия по ферментам Международного биохимического союза рекомендовала **стандартную международную единицу (МЕ).** За единицу активности любого фермента принимают то его количество, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в минуту (мкмоль/мин). Для преобразования размерности «Е/л» в «нкат/л» (нмоль/с·л) используют коэффициент 16,67.

Об активности фермента судят по скорости катализируемой реакции при определенных температуре, рН среды, концентрации субстрата. Поэтому при определении активности ферментов необходимо строго соблюдать одни и те же условия.

Ферментативная реакция чувствительна к изменениям температуры. Обычно ферментативную реакцию принято проводить при температуре, лежащей в пределах 25–40°C. Однако при разной температуре оптимальные значения рН, концентрации буфера, субстрата и других параметров различны. Максимальная активность большинства ферментов в организме человека наблюдается при температуре около 37°C. Поэтому в целях меж-

дународной стандартизации температуры измерения активности ферментов используется 37°C .

Для исследования активности ферментов чаще всего используются плазма или сыворотка крови. В процессе свертывания крови и последующей ретракции сгустка высвобождаются содержащиеся в тромбоцитах биологически активные вещества, под влиянием которых возрастает активность многих ферментов. Происходящее при этом разрушение форменных элементов (эритроцитов и др.) крови обуславливает дальнейшее увеличение ферментативной активности. Поэтому определение активности некоторых ферментов в сыворотке крови не рекомендуется проводить при наличии гемолиза эритроцитов (например, лактатдегидрогеназы, АлАТ). Хранение сыворотки, как правило, сопровождается снижением активности ферментов. Для большинства из них активность не изменяется при комнатной температуре в течение 6–8 ч, около недели – при 4°C и на протяжении месяца – в замороженном состоянии.

Используемые методы для определения активности ферментов могут быть разделены на 2 основные группы:

1) состоящие в определении **конечного продукта**, образовавшегося после известного периода инкубации ферментного препарата (обычно сыворотки) с субстратом в соответствующем буфере (**метод конечной точки**, выполняемый путем измерения опытной и контрольной проб, т.е., по сути, измерение проводится в двух точках). Для этого используется химическая реакция, а учет оптической плотности может быть проведен на ФЭКе или спектрофотометре;

2) методы, с помощью которых в ходе ферментативной реакции непрерывно или периодически определяют **потребление субстрата, кофермента** либо **образование метаболита**. Методы этой группы называются кинетическими, или методами непрерывной регистрации.

В зависимости от особенностей принципа исследования, положенного в основу определения активности ферментов, способы их осуществления подразделяются на несколько групп:

1. Без использования **НАД** и **НАДН₂** (пиридинкоферментов). Среди них различают колориметрические, титриметрические, газометрические, электрохимические, флюорометрические, изотопные, с использованием инфракрасной спектрометрии, электронного парамагнитного резонанса.

2. **Каталитические методы**, базирующиеся на применении пиридинкоферментов (**НАД⁺**, **НАДН+Н⁺**). Из этой группы чаще всего используют методы, основывающиеся на **оптическом тесте Варбурга**. Сопряжение реакции образования коферментов с превращением формазана позволяет учитывать ход реакции в видимой области спектра.

3. **Некаталитические методы**, позволяющие непосредственно определить концентрацию фермента, независимо от его каталитической активности. С помощью их выявляется содержание многих апоферментов. Кон-

центрацию ферментов устанавливают чаще всего иммунологическими методами (например, определение МВ-изоферментов креатинкиназы).

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 негидролизуемого ацетилхолина.

В крови человека встречается два типа холинэстераз: ацетилхолинэстераза, или истинная холинэстераза – АХЭ (ацетилхолин-ацетилгидролаза, К.Ф. 3.1.1.7) и псевдохолинэстераза – ХЭ (ацилхолин-ацетилгидролаза, К.Ф.3.1.1.8). АХЭ и ХЭ отличаются друг от друга по многим свойствам. АХЭ содержится преимущественно в эритроцитах, нервной и мышечной тканях, ХЭ – в сыворотке крови, печени, поджелудочной железе. Оба фермента отличаются по субстратной специфичности. Наиболее специфичным субстратом для АХЭ является ацетилхолин, для ХЭ – бутирилхолин. АХЭ – в крови – мембраносвязанный фермент, активность которого отражает состояние эритроцитарной мембраны. Наиболее распространено определение псевдохолинэстеразы.

Неправильное применение антихолинэстеразных веществ, используемых в медицине (лекарственные препараты), в сельском хозяйстве и в быту (фосфорорганические соединения (ФОС) – инсектициды, акарициды, гербициды и др.) сопровождается отравлениями, нередко со смертельным исходом. Токсическое действие этих соединений обусловлено угнетением активности холинэстеразы, что приводит к ингибированию гидролиза ацетилхолина, выделяющегося в холинэргических синапсах. Накопление ацетилхолина вызывает нарушение синаптического проведения.

Средства измерений, оборудование:

Весы, спектрофотометр, центрифуга, дозаторы пипеточные

Реактивы и материалы:

1. Фосфатный буфер, рН 7,8:

1.1 1,187 г гидрофосфата натрия переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в дистиллированной воде, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

1.2 0,9072 г дигидрофосфата калия переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в дистиллированной воде, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

1.3 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.

2. 0,4% раствор ацетилхолинхлорида: 0,1 г ацетилхолинхлорида, переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до метки дистиллированной водой.

3. 25% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ): 6,25 г ТХУ переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, растворяют в дистиллированной воде, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

4. 2 М раствор гидроксиламина гидрохлорида (м.м. 69,5 г/моль): 3,5 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в дистиллированной воде, переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

5. 3,5 М раствор гидроксида натрия (м.м. 40 г/моль): 3,5 г гидроксида натрия растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

6. 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.

7. 0,37 М раствора хлорида железа (III) в 0,1 М растворе хлороводородной кислоты

7.1 В мерную колбу с дистиллированной водой вместимостью 25 см³ вносят 0,21 см³ концентрированной хлороводородной кислоты, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

7.2 1,0 г хлорида железа (III) 6-водного (или 0,6 г хлорида железа (III) безводного), переносят в мерную пробирку вместимостью 10 см³, доводят 0,1 М раствором хлороводородной кислоты до метки, перемешивают. Готовят перед использованием.

8. 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 крови добавляют 7 см³ дистиллированной воды, перемешивают.

2. Во флаконы добавляют реактивы в соответствии с таблицей.

Реактивы, см ³	Флаконы	
	№ 1	№ 2
Фосфатный буфер, рН=6,8	1,5	1,5
Дистиллированная вода	1,5	0,5
Разведенная кровь (сыворотка)	–	1,0
Ацетилхолинхлорид, 0,4%	1,0	1,0

Инкубация в термостате при 37 °С 30 минут				
25% ТХУ		1,0		1,0
Профильтровать в чистые флаконы из стеклodrота				
Из каждого флакона отобрать по 1,0 см ³ фильтрата в 2 флакона				
	№ 1.1.	№ 1.2.	№ 2.1.	№ 2.2.
Фильтрат	1,0	1,0	1,0	1,0
Смесь равных объемов 2 М гидрокси-ламина гидрохлорида и 3,5 М NaOH	2,0	-	2,0	-
4 М раствор HCl	1,0	1,0	1,0	1,0
Смесь равных объемов 2 М гидрокси-ламина гидрохлорида и 3,5 М NaOH	-	2,0	-	2,0
0,37 М р-р хлорида железа (III)	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.

4. Активность холинэстеразы рассчитывают по формулам:

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

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

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

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

$$B = 100\% - \%Ацхн$$

4.3 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).

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Значение определения активности холинэстеразы в крови.
2. Назовите ингибиторы этого фермента.
3. Клеточные, секреторные и экскреторные ферменты, значение их определения в сыворотке крови и тканях.
4. Изоферменты, значение их определения в сыворотке крови.
5. Методы для определения активности ферментов.
Единицы измерения активности ферментов.
6. Принципы определения активности ферментов.

Лабораторная работа № 6 Определение активности ферментов в сыворотке крови кинетическим методом

Цель работы: определить активность аспаратаминотрансферазы 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.

Методы определения активности ферментов в сыворотке крови

Методы определения активности ферментов в сыворотке крови, применяемые в клиничко-диагностических лабораториях, основываются, за небольшим исключением, на фотометрическом измерении образующихся в результате реакции **продуктов или потребления субстратов**. Если продукты реакции окрашены, их можно непосредственно фотометрировать, однако в большинстве случаев нужны дополнительные химические процедуры (реакции) для фотометрической регистрации хода реакции.

По способу измерения скорости ферментативной реакции различают (рисунок 1):

1. Измерение по конечной точке (end point method). При этом определяют содержание **продуктов реакции** в инкубационной среде **после фиксированного времени инкубации** и остановки ферментативной реакции (как правило, с использованием агрессивных сред);

2. Кинетическое измерение (kinetic measurement) с непрерывным (многоточечным) измерением абсорбции в ходе ферментативной реакции (рисунок 1-А);

3. Измерение по начальной скорости (initial rate), когда скорость реакции нелинейна, скорость изменения абсорбции снижается во времени (рисунок 1-Б);

4. Двухточечное измерение (two point) – при этом способе выбирают линейный участок кривой, определяют абсорбцию дважды – в начале измерения и в конце (рисунок 1-В). Хотя это также кинетическое измерение, однако, термин «кинетическое» принят в клинической химии для измерений, в которых регистрируется более 2 точек. Двухточечное измерение потенциально включает возможность нескольких методических ошибок. Если реакция проходит с очень высокой скоростью, то она может замедлиться или вообще прекратиться из-за потребления всего количества субстрата. Реакция может задержаться на старте (Lag фаза в мультиферментных тестах). Большинство унифицированных методов относится к методам измерения по конечной точке и в силу этого не лишены существенных недостатков. Они рассчитаны на нормальную или слегка повышенную сывороточную активность ферментов. При значительном увеличении последней быстро расходуется субстрат, и реакция идет не в оптимальных условиях (нет насыщения фермента субстратом). Двухточечное измерение несколько точнее, но также не лишено недостатков. Наиболее точными методами определения активности ферментов считаются кинетические, при которых прирост концентрации продукта реакции (снижение субстрата, либо изменение состояния кофермента) измеряется многократно. Изменение абсорбции в этом случае должно быть одинаковым за равные промежутки времени.

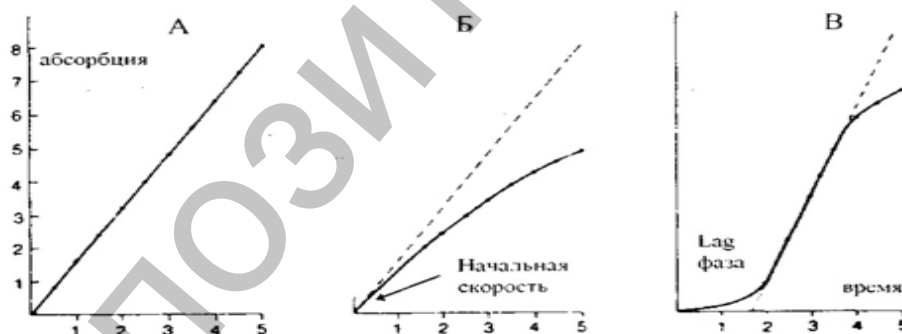


Рис. 1 – Скорость ферментативной реакции как функция времени

А – скорость постоянна в течение всего периода времени. В любой период можно по скорости реакции оценивать активность фермента; Б – скорость реакции постоянно снижается. Активность фермента рекомендуется оценивать по начальной скорости; В – линейный участок, в течение которого рекомендуется определять активность фермента, устанавливается в середине периода инкубации.

Во многих кинетических методах используется оптический тест Варбурга (УФ-тест), который основан на том, что один из продуктов дегидрогеназной реакции – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид или его фосфат (НАДН или НАДФН) - имеет максимум поглощения

при длине волны 340 нм, а их окисленные формы при этой длине волны практически не поглощают (рисунок 2).

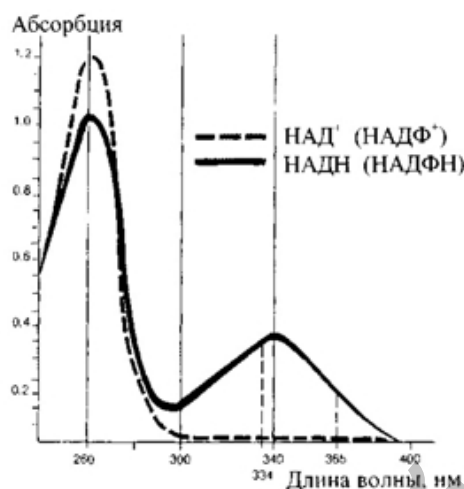


Рис. 2 – Спектр поглощения окисленного/восстановленного НАД⁺ (НАДФ⁺)

При длине волны 340 нм поглощает только восстановленная форма, что широко используется в реакциях с тестом Варбурга.

Определение активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови кинетическим методом

Аспаратаминотрансфераза (АсАТ, L-аспартат:2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1) катализирует обратимый перенос аминокислотной группы аминокислоты на щавелевоуксусную кислоту с образованием аспарагиновой кислоты. По убыванию концентрации фермента в цитозоле клеток органы располагаются в последовательности сердце, печень, скелетные мышцы, почки, мозг, поджелудочная железа, селезенка, легкие. АсАТ гепатоцитов располагается в цитозоле (микросомах) – 60% активности и в митохондриях – 40% активности. В сыворотке крови в норме определяется микросомальный изофермент и не определяется митохондриальный. Поскольку АсАТ локализована в цитозоле и митохондриях, а АлАТ – преимущественно в цитозоле, повышение активности первого фермента характерно для некротических поражений гепатоцитов, а второго – для заболеваний с нарушением проницаемости мембран гепатоцитов. Активность этого фермента в эритроцитах незначительна и составляет приблизительно десятую часть его содержания в цитоплазме, поэтому слабый гемолиз не оказывает существенного влияния на величину активности фермента сыворотки крови.

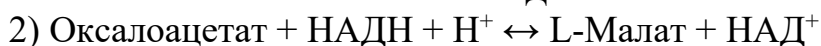
Принцип работы. Модифицированный, оптимизированный кинетический метод в соответствии с рекомендациями Международной Федерации Клинической химии (IFCC) без активации пиридоксальфосфатом.

Аспаратаминотрансфераза 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



МДГ



Средства измерений, оборудование:

Спектрофотометр или биохимический анализатор с термостатируемой кюветой, термостат, дозаторы

Реактивы и материалы: 1) стандартный набор реагентов для определения активности фермента; 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. В стеклянном флаконе смешивают реагенты 1 (ферментный) и 2 (субстрат) в соотношении 4:1.

2. Рабочий реагент прогревают до температуры измерения (37°C).

3. В кювету наливают 1,0 см³ рабочего реагента и 0,1 см³ сыворотки крови (при необходимости объемы реактивов пропорционально увеличивают).

4. Реагенты перемешивают, через 1 минуту измеряют оптическую плотность при длине волны 340 нм против воздуха и одновременно включают секундомер.

5. Измеряют повторно оптическую плотность через 1,2 и 3 минуты.

6. Рассчитывают среднюю величину оптической плотности за 1 минуту ($\Delta A/\text{мин}$) и используют ее в расчете:

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

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

F (37°C) = 1745

F (25°C, 30°C) = 952

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

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

1 мккат/л = 60 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

7. Сделайте вывод об активности аспартатаминотрансферазы в исследуемой сыворотке крови.

Определение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови кинетическим методом

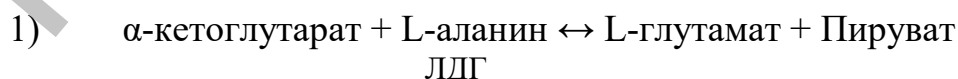
Аланинаминотрансфераза (АлАТ, L-аланин-2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.2.) катализирует обратимый перенос аминокислотной группы на пировиноградную с образованием аланина.

АлАТ присутствует в больших количествах в цитоплазме клеток печени и почек, в меньших количествах – в скелетных мышцах и сердце, в следовых количествах – в коже, поджелудочной железе, селезенке и легких. Активность в эритроцитах в 6 раз превышает активность в сыворотке крови. Поэтому при гемолизе активность фермента увеличивается. Установлена тесная прямая связь между объемом вовлеченной в патологический процесс ткани печени и активностью фермента в плазме. АлАТ – специфический маркер повреждения клеток печени.

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



ЛДГ



Средства измерений, оборудование:

Спектрофотометр или биохимический анализатор с термостатируемой кюветой, термостат, дозаторы

Реактивы и материалы: 1) стандартный набор реагентов для определения активности фермента; 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. В стеклянном флаконе смешивают реагенты 1 (ферментный) и 2 (субстрат) в соотношении 4:1.

2. Рабочий реагент прогревают до температуры измерения (37°C).

3. В кювету наливают 1,0 см³ рабочего реагента и 0,1 см³ сыворотки крови (при необходимости объемы реактивов пропорционально увеличивают).

4. Реагенты перемешивают, через 1 минуту измеряют оптическую плотность при длине волны 340 нм против воздуха и одновременно включают секундомер.

5. Измеряют повторно оптическую плотность через 1,2 и 3 минуты.

6. Рассчитывают среднюю величину оптической плотности за 1 минуту (ΔА/мин) и используют 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;

Применяют 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

7. Сделайте вывод об активности аланинаминотрансферазы в исследуемой сыворотке крови

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Опишите реакции трансаминирования, механизм, значение, характеристика ферментов.
2. Методы определения активности ферментов в сыворотке крови.
3. Значение определения активности трансаминаз в сыворотке крови.

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.

Амилаза (от латинского *amylum* – «крахмал» и *-asa* – ферменты) – фермент, расщепляющий крахмал и гликоген до мальтозы (солодового сахара), глюкозы и декстринов. Основной формой запасных углеводов в семенах и клубнях растений является крахмал. Ферментативные превращения крахмала лежат в основе многих пищевых технологий. Группа ферментов, гидролизующих крахмал (амилолитических), включает: α -амилазу, β -амилазу, глюкоамилазу, α -глюкозидазу, изоамилазу, пуллулазу. α -Амилаза (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, К.Ф.3.2.1.1) является ферментом эндотипа, гидролизующим α -1,4-гликозидные связи в крахмальных полисахаридах и гликогене. α -Амилазы обнаружены у животных (в слюне и поджелудочной железе), в растениях (проросшее зерно пшеницы, ржи, ячменя), они вырабатываются плесневыми грибами и бактериями.

Действие α -амилазы на крахмал характеризуется быстрым снижением вязкости раствора и молекулярной массы олигосахаридов. Фермент имеет выраженное сродство к гликозидным связям, удаленным от конца молекулы. Расщепление гликозидной связи происходит между атомом кислорода и C_1 -атомом глюкозного остатка. Атака субстрата носит случайный характер и может быть как единичной, так и множественной, когда от субстрата последовательно отщепляется несколько фрагментов. Гидролизу подвергаются олигосахариды, содержащие менее 3 глюкозных единиц. При гидролизе амилопектина в продуктах гидролиза, наряду с олигосахаридами линейного строения, присутствуют α -декстрины, представляющие собой не затронутые реакцией разветвленные участки амилопектиновых молекул.

Процесс расщепления крахмала хорошо прослеживается по реакции продуктов с йодом. Синяя окраска характерна для амилодекстринов, содержащих не менее 45 глюкозных единиц (Г45), пурпурная – для декстринов Г35-Г40, красная – для эритродекстринов Г20-Г30, коричневая –

для декстринов Г12-Г15. Ахроодекстрины, не окрашивающиеся йодом, имеют величину не более 12 глюкозных единиц. Образование ахроодекстринов завершает первую стадию гидролиза крахмала. Накопление низкомолекулярных сахаров происходит во второй, стационарной, медленнотекущей стадии.

Различные α -амилазы при длительном воздействии на крахмал расщепляют его на смесь олигосахаридов с преобладанием характерных сахаров. Конечный продукт расщепления крахмала – глюкоза образуется в незначительном количестве.

α -амилаза принадлежит к числу ферментов с достаточно высокой термостабильностью. Мезофильные бактерии продуцируют фермент, стабильный при температуре до 80 °С, чаще не выше 70 °С. Амилаза термофилов может обладать поразительной стабильностью. Так α -амилаза *B. licheniformis*, выпускаемая в виде коммерческого препарата Термамил, в присутствии 1 мМ CaCl_2 и 31,5% крахмала не теряет активности при 90 °С, а при 100 °С время полуинактивации составляет более 3 ч. Амилазы кальций-независимые (так называемые «истинные»), как правило, менее термостабильны, чем кальций-зависимые.

В семенах растений присутствуют два типа α -амилазы: α -амилаза созревания и α -амилаза прорастания. В созревающем зерне синтезируется α -амилаза созревания, которая затем переходит в латентную форму, локализуясь на мембранах алейронового слоя. Первый этап гидролиза крахмала при прорастании осуществляется этой α -амилазой. И только на следующем этапе в работу включается вновь синтезируемый фермент – α -амилаза прорастания. Ее синтез в клетках зародыша и алейронового слоя начинается при влажности зерна выше 28%. Две формы α -амилазы семян злаков различаются по термостабильности: α -амилаза созревания при 70°С теряет 50% своей активности, тогда как α -амилаза прорастания при этой температуре только незначительно снижает свою активность.

В процессе прорастания семян в результате гидролиза и фосфоролиза крахмал распадается на более простые соединения. По мере набухания сухих семян в период прорастания возрастает активность гидролитических ферментов, при этом содержание крахмала падает, а сахаров возрастает.

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, колориметрическое определение негидролизованного амилазами остаточного крахмала. Активность амилаз выражается в миллиграммах гидролизованного крахмала за 1 ч на 1

см³ раствора ферментов или в миллиграммах гидролизованного крахмала на 1 мг белка за 1 ч (удельная активность).

Средства измерений, оборудование

Спектрофотометр, термостат

Реактивы и материалы:

1. Раствор Люголя: 0,1 г кристаллического йода и 0,2 г калия йодида помещают в градуированную пробирку. Доводят дистиллированной водой до 10 см³ и перемешивают.

2. 0,5% раствор крахмала: К 75 см³ кипящей воды приливают взвесь 0,5 г крахмала в 10 см³ холодной воды, кипятят примерно 1 мин, охлаждают, переносят в мерную колбу на 100 см³, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

3. 1 М раствор хлороводородной кислоты: содержимое ампулы фиксана 1 М переносят в колбу объемом 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

4. 0,1 М раствор хлороводородной кислоты: содержимое ампулы фиксана 0,1 М переносят в колбу объемом 1000 см³ и доводят объем до метки.

5. 1% раствор хлорида натрия: 1,0 г хлорида натрия переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

6. Ацетатный (натрий-ацетатный) буфер:

6.1 0,2 М раствор ацетата натрия (СН₃СООNa·3Н₂О): 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.

6.2 0,2 М раствор уксусной кислоты: 1,20 г уксусной кислоты, переносят в колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой.

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

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

Порядок выполнения работы

1. Приготовление ферментной вытяжки

1.1 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.

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

1.3 Добавляют еще по 1 см³ раствора NaCl и продолжают растирание.

1.4 Затем суспензии отдельно количественно переносят в градуированные пробирки вместимостью 10 см³.

1.5 Ступку с пестиком ополаскивают небольшими порциями раствора NaCl, следя за тем, чтобы объем суспензии в пробирке не превысил 10 см³.

1.6 Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 30 мин.

1.7 Затем пробирки вынимают из холодильника и центрифугируют в течение 15 мин при 3000 об/мин.

1.8 Надосадочную жидкость (препарат амилаз) осторожно сливают в чистые сухие колбы вместимостью 50 см³, закрывают и при необходимости помещают в холодильник.

2. Приготовление субстрата

В химические пробирки вносят реактивы согласно таблице:

Реактивы, см ³	Опыт	Контроль
Ацетатный буфер, рН=5,5	3,0	3,0
Крахмал, 2% раствор	3,0	3,0
Ферментный препарат	0,5	-
H ₂ O	-	0,5
Термостат, 37°C, 20 мин		
1 М HCl	2,0	2,0
	↓	↓
В мерные колбы вместимостью 25 см ³		
H ₂ O	≈12,5	≈12,5
0,1 М HCl	0,5	0,5
Раствор Люголя	0,02	0,02
Смесь из пробирок	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		

3. Активность амилазы (в мг гидролизованного крахмала за 1 ч на 1 см³ ферментативного раствора) рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{E_k - E_0}{E_k} \times \frac{3 \times 2}{60},$$

где E_k и E₀ – оптическая плотность контрольного и опытного раствора, 3 – пересчетный коэффициент на 1 ч, 2 – пересчетный коэффициент на 1 см³ 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. Опишите роль крахмала у растений.
2. Дайте характеристику амилазы.
3. Перечислите амилазы встречающиеся в организме животных. Их биологическая роль.

Лабораторная работа № 8

Количественное определение содержания гликогена в тканях

Цель работы: определить содержание гликогена в печени и мышечной ткани.

Задачи работы:

1. Приготовить серию градуировочных растворов 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.

Резервной формой глюкозы в организме животных является гликоген. Синтез и распад гликогена обеспечивают постоянство концентрации глюкозы в крови и создают депо для её использования тканями по мере необходимости. Гликоген – разветвлённый гомополимер глюкозы, в котором остатки глюкозы соединены в линейных участках α -1,4-гликозидной связью. В точках ветвления мономеры соединены α -1,6-гликозидными связями. Эти связи образуются примерно с каждым десятым остатком глюкозы, с древообразной структурой с молекулярной массой $>10^7$ Да, что соответствует приблизительно 50 000 остатков глюкозы. Таким образом, в молекуле гликогена имеется только одна свободная аномерная ОН-группа и, следовательно, только один восстанавливающий (редуцирующий) конец. В клетках животных гликоген – основной резервный полисахарид. При полимеризации глюкозы снижается растворимость образующейся молекулы гликогена и, следовательно, её влияние на осмотическое давление в клетке. Гликоген хранится в цитозоле клетки в форме гранул диаметром 10-40 нм. С гранулами связаны ферменты, участвующие в метаболизме гликогена, что облегчает их взаимодействие с субстратом. Разветвлённая структура гликогена содержит большое количество концевых мономеров, что способствует работе ферментов, отщепляющих или присоединяющих мономеры при распаде или синтезе гликогена, так как эти ферменты могут одновременно работать на нескольких ветвях молекулы. Гликоген депонируется главным образом в печени и скелетных мышцах.

После приёма пищи, богатой углеводами, запас гликогена в печени может составлять примерно 5% от её массы. В мышцах запасается около 1% гликогена, но масса мышечной ткани значительно больше и поэтому общее количество гликогена в мышцах в 2 раза больше, чем в печени. Гликоген может синтезироваться во многих клетках, например в нейронах, макрофагах, клетках жировой ткани, но содержание его в этих тканях незначительно. В организме может содержаться до 450 г гликогена.

Распад гликогена печени служит в основном для поддержания уровня глюкозы в крови в постабсорбтивном периоде. Поэтому содержание гликогена в печени изменяется в зависимости от ритма питания. При длительном голодании оно снижается почти до нуля. Гликоген мышц служит резервом глюкозы – источника энергии при мышечном сокращении. Мышечный гликоген не используется для поддержания уровня глюкозы в крови.

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:

Спектрофотометр, водяная баня, весы центрифуга.

Реактивы и материал:

1. Йодный реактив: 0,13 г кристаллического йода и 1,3 г калия йодида переносят в градуированную пробирку, доводят до 5 см³ дистиллированной водой и перемешивают.

2. Насыщенный раствор кальция хлорида: в склянку вносят дистиллированную воду и добавляют хлористый кальций до прекращения растворения.

3. Рабочий йодный реактив: смешивают 65 см³ раствора кальция хлорида и 0,25 см³ йодного реактива. Объемы реактивов могут быть изменены в зависимости от количества исследуемых проб. Раствор готовится непосредственно перед добавлением к пробам.

4. Насыщенный раствор хлорида аммония: в стеклянный стаканчик вносят дистиллированную воду и добавляют хлорид аммония до прекращения растворения.

5. 33% раствор гидроксида калия: 8,25 г гидроксида калия, переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

6. 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 тем-

пературе 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).

7. 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 репреципитации 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, 1,2 см³ 96% этилового спирта и повторяют п.3, 4, 5.

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°C 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.

13. 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.

14. 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.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Строение, функции гликогена. Биологическое значение обмена гликогена в печени и мышцах.
2. Гормональная регуляция обмена гликогена.
3. Опишите принцип определения гликогена в тканях.

Лабораторная работа № 9

Количественное определение содержания липидов в тканях

Цель работы: определить содержание липидов (холестерола и триацилглицеролов) в животных тканях.

Задачи работы:

1. Приготовить растворы, необходимые для выполнения лабораторной работы

2. Провести экстракцию триацилглицеролов и холестерина из тканей органическими растворителями.

3. Количественно определить содержание липидов в тканях, используя метод сравнения оптических плотностей.

Липиды – вещества, имеющие различное химическое строение, но обладающие общим свойством: они хорошо растворимы в полярных растворителях. При экстракции липидов учитывается то, что они способны не только к гидрофобным взаимодействиям, но и к образованию водородных, электростатических и ковалентных связей (сложно-эфирных, амидных гликозидных). Относительно неполярные растворители (хлороформ, бензол, диэтиловый эфир) разрушают комплексы, образованные гидрофобными взаимодействиями в жировой ткани, хиломикроны, комплексы альбумина с жирными кислотами. Полярные растворители (этанол, метанол) разрушают водородные и электростатические связи. Их применяют в смеси со слабополярными растворителями при экстракции липидов из плазматических мембран, митохондрий, эндоплазматического ретикулума и других органоидов. Липиды, находящиеся в комплексах, образованных ковалентными связями, растворителями не экстрагируются. Их можно выделить только после гидролиза комплекса слабыми растворами кислот или щелочей в органическом растворителе.

В основе выделения липидов лежат такие операции как экстракция, очистка их от нелипидных компонентов, концентрация и определение суммарного выхода липидов. Среди известных в настоящее время методов выделения липидов из биологического материала в лабораторной практике наиболее распространен метод экстракции хлороформ-метаноловой смесью (по Фолчу), реже прибегают к экстракции спиртово-эфирной смесью.

Принцип экстракции по Фолчу заключается в разрушении липидно-белковых связей полярными растворителями (в данном случае метанолом), что облегчает последующее экстрагирование липидов неполярным растворителем (хлороформом, диэтиловым или петролейным эфиром). Метод пригоден для извлечения липидов из любых тканей животного и растительного происхождения.

1. Определение холестерина в тканях

Реактивы и материалы:

1. Смесь хлороформ:метанол (2:1).

2. 0,9% раствор хлорида натрия: 0,9 г натрия хлорида растворить в 100 см³ дистиллированной воды.

3. Подкисленная дистиллированная вода: 0,05 см³ серной кислоты растворить в 100 см³ дистиллированной воды.

4. Наборы реактивов для определения холестерина и триацилглицеролов

Порядок выполнения работы

1. Гомогенизация и экстракция липидов

1.1. Навеску ткани массой 200 мг гомогенизируют в ступке с 0,35 см³ физиологического раствора.

1.2. В градуированные на 20-25 см³ пробирки вносят по 0,125 см³ гомогената и 3 см³ смеси хлороформ-метанол (соотношение 2:1).

1.3. Пробирки встряхивают в течение 90 секунд.

1.4. Пробирки оставляют стоять на 10 мин.

1.5. В пробирки добавляют по 0,63 см³ подкисленной дистиллированной воды.

1.6. Каждую пробирку переворачивают из вертикального положения в горизонтальное положение 20 раз.

1.7. Пробирки оставляют на ночь.

1.8. На следующий день отбирают 1,5 см³ нижней фазы и выпаривают на водяной бане до капли при температуре 70-90°C.

1.9. В пробирку добавляют 0,125 см³ метанола и встряхивают.

1.10. Определение концентрации холестерина и триацилглицеролов проводят с использованием стандартного набора реактивов.

2. Определение содержания холестерина

Принцип: При каталитическом действии ферментов холинэстеразы и холестериноксидазы эфиры холестерина гидролизуются с образованием холестерина, который в свою очередь окисляется с образованием перекиси водорода. Образующаяся перекись под действием пероксидазы окисляет субстрат с образованием окрашенного продукта, определяемого фотометрическим методом. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации общего холестерина в пробе.

2.1. Для определения холестерина в пробирки внести реактивы в соответствии с объемами, указанными в таблице.

	Объем, см ³		
	Опытная проба	Стандартная проба	Холостая проба
Образец	0,01	-	-
Стандартный раствор		0,01	-
Реагент	1,0	1,0	1,0

2.2. Пробы перемешать и инкубировать 5 мин при температуре 37°C

2.3. Измеряют оптическую плотность опытной (*A_{оп.}*) и стандартной пробы (*A_{ст.}*) относительно холостой пробы.

2.4. Концентрацию холестерина в исследуемой жидкости (Спр.) в ммоль/л определяют по формуле:

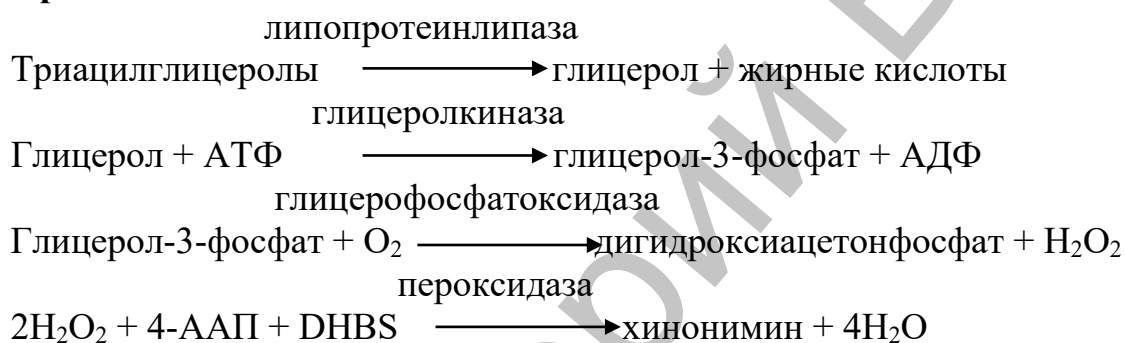
$$\text{Спр.} = \frac{\text{Сст.}}{\text{Аст.}} \times \text{Апр} ,$$

где Спр. – концентрация холестерина, Сст. – концентрация стандарта, Апр. – оптическая плотность пробы, Аст – оптическая плотность стандарта.

2.5. Рассчитать содержание холестерина в ткани, учитывая разведение и выразить полученные результаты в мг/г.

3. Определение содержания триацилглицеролов

Принцип:



Интенсивность окраски хинонимина, определяемая фотометрическим методом, прямо пропорциональна концентрации триацилглицеролов в пробе.

3.1. Для определения триацилглицеролов в пробирки вносят реактивы в соответствии с объемами, указанными в таблице.

	Объем, см ³		
	Опытная проба	Стандартная проба	Холостая проба
Образец	0,01	-	-
Стандартный раствор		0,01	-
Реагент	1,0	1,0	1,0

3.2. Пробы перемешивают и инкубируют 10 мин при температуре 37°С

3.3. Измеряют оптическую плотность опытной (Аоп.) и стандартной пробы (Аст.) относительно холостой пробы. Стабильность окраски 15 мин.

3.4. Концентрацию триацилглицеролов в исследуемой жидкости (Спр.) в ммоль/л определяют по формуле:

$$\text{Спр.} = \frac{\text{Сст.}}{\text{Аст.}} \times \text{Апр} ,$$

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

Средства измерений, оборудование:

Спектрофотометр, весы

Реактивы и материалы:

1. 2% раствор метафосфорной кислоты: 1 г метафосфорной кислоты переносят в мерную колбу на 50 см³ и доводят дистиллированной водой до метки.

2. 0,21 М раствор фосфата натрия (м.м. 163,9 г/моль): 1,7 г фосфата натрия переносят в мерную колбу на 50 см³ и доводят водой до метки.

3. Смесь 2% раствора метафосфорной кислоты и 0,21 М раствора Na₃PO₄ в соотношении 3:2 (V/V, рН 7,3 - 7,4).

Порядок выполнения работы

1. Приготовление гомогената: 1 г растительного материала гомогенизируют с 10 см³ 2%-ной метафосфорной кислоты.

2. Гомогенат переносят в мерную колбу емкостью 50 см³. Объем доводят до метки смесью 2% раствора метафосфорной кислоты и 0,21 М раствора сульфата натрия.

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

4. Измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 265 нм против холостой пробы (смесь метафосфорной кислоты и сульфата натрия в соотношении 3:2).

5. Результаты вычисляют с учетом коэффициента молярной экстинкции аскорбиновой кислоты при 265 нм – $1,655 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

6. Содержание аскорбиновой кислоты выражают в мкг/г сырого веса.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Антиоксидантная активность аскорбиновой кислоты.
2. Устойчивость аскорбиновой кислоты.
3. Принцип фотометрического определения аскорбиновой кислоты.
4. Суточная потребность витамина С для человека.
5. Перечислите основные источники витамина С.

Лабораторная работа № 11

Количественное определение растительных фенолов

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

Задачи работы:

1. Определить содержание фенольных соединений и флавоноидов в спиртовых экстрактах растений.

2. Сравнить суммарное содержание фенолов и флавоноидов в листьях различных растений.

Образование фенольных соединений является одной из характерных особенностей растительной клетки. Одной из важнейших функций фенольных соединений является их участие в окислительно-восстановительных процессах. Сходные с убихинонами фенольные соединения являются компонентами электронтранспортной цепи хлоропластов. Они принимают участие в темновых реакциях фотосинтеза и называются пластохинонами.

Фенольные соединения обладают высокой реакционной способностью, характеризуются многообразием биологических свойств. Многие фенольные соединения являются антиоксидантами. Поэтому они находят все более широкое применение в пищевой промышленности для стабилизации жиров.

1. 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, оборудование:

Спектрофотометр, весы, центрифуга

Реактивы и материалы:

1. Реактив Фолина-Чиокальтеу.

2. 10% раствор карбоната натрия: 2,5 г карбоната натрия, переносят в мерную колбу емкостью 25 см³ и доводят водой до метки.

3. Материал: сухие листья растений

Порядок выполнения работы

1. **Получение экстракта.** Навеску растительного материала (0,5 г) измельчают, заливают 10 см³ 96 % этанола и оставляют в темном месте на ночь.

2. Экстракт сливают, материал заливают 10 см³ 70% этанола и ставят на водяную баню с обратным холодильником на 30 мин.

3. К 0,5 см³ полученного спиртового экстракта добавляют 3,5 см³ дистиллированной воды, 0,1 см³ реактива Фолина-Чиокальтеу, 2 см³ 10% раствора карбоната натрия, тщательно перемешивают.

4. Выдерживают 15 мин в темном месте.

5. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 720 нм против H₂O.

6. 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; V₁ – объем экстракта, см³ (50 см³); V₂ – объем раствора для спектрофотометрирования, см³

(10 см³); V₃ – объем экстракта, взятый для определения, см³ (0,2 см³); 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.

2. 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 для количественной оценки, особенно в условиях дифференциальной спектрофотометрии. При этом в присутствии AlCl₃ 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. **0,05 М раствор хлорида алюминия в этаноле:** 0,17 г хлорида алюминия, помещают в мерную колбу вместимостью 25 см³ и доводят до метки этанолом.

2. **Материал:** сухие листья растений.

Порядок выполнения работы

1. К 0,5 см³ полученного спиртового экстракта прибавляют 2,5 см³ 0,05 М раствора алюминия хлорида в этаноле.

2. Инкубация при комнатной температуре 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 вычисляют 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; V₁ – объем экстракта, см³ (50 см³); V₂ – объем раствора для спектрофотометрии, см³ (5,1 см³); V₃ – объем экстракта, взятый для определения, см³ (0,1 см³); m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Вопросы и задания для подготовки к лабораторному занятию

1. Функции фенольных соединений и флавоноидов в растительных объектах.
2. Принцип определения фенольных соединений и флавоноидов в растительных объектах.

Учебное издание

ДАНЧЕНКО Елена Олеговна

ЧИРКИН Александр Александрович

БАЛАЕВА-ТИХОМИРОВА Ольга Михайловна

ТОЛКАЧЁВА Татьяна Александровна

**ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА
ЖИВОТНЫХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ**

Методические рекомендации
к выполнению лабораторных работ

Технический редактор

Г.В. Разбоева

Компьютерный дизайн

Е.В. Крайло

Подписано в печать 2020. Формат 60x84^{1/16}. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 3,10. Уч.-изд. л. 2,42. 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.