

ПЕРМСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Н. Ю. Лисовенко

И. А. Толмачева

БИОХИМИЯ



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Н. Ю. Лисовенко
И. А. Толмачева

БИОХИМИЯ

*Допущено методическим советом
Пермского государственного национального исследовательского университета
в качестве учебно-методического пособия для студентов,
обучающихся по специальности «Фармация»*



Пермь 2024

УДК 574(075.8)
ББК 28.04я73
Л634

Лисовенко Н. Ю.

Л634 Биохимия [Электронный ресурс] : учебно-методическое пособие / Н. Ю. Лисовенко, И.А. Толмачева ; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Пермь, 2024. – 7,22 Мб ; 148 с. – Режим доступа: <http://www.psu.ru/files/docs/science/books/uchebnie-posobiya/biohimiya-lisovenko-Tolmacheva.pdf>. – Заглавие с экрана.

ISBN 978-5-7944-4162-8

Учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с программой дисциплины «Биохимия» и включает теоретический материал, лабораторные работы, примеры тестовых заданий и экзаменационные вопросы. Цель издания – помочь студентам овладеть практическими навыками при работе с биологическими объектами, разобраться в наиболее сложных вопросах курса и подготовиться к тестовым заданиям и экзамену.

Предназначено для студентов специальности 33.05.01 «Фармация». Рекомендуется студентам направлений 04.03.01 «Химия», 04.03.02 «Химия, физика и механика материалов» и специальности 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия» химического факультета.

*Печатается по решению ученого совета химического факультета
Пермского государственного национального исследовательского университета*

**УДК 574(075.8)
ББК 28.04я73**

Рецензенты: лаборатория биологически активных соединений «ИТХ УрО РАН» (зав. лабораторией, к. хим. н., **В. В. Гришко**); профессор кафедры биологии факультета (кинологического) Пермского военного института войск национальной гвардии Российской Федерации, к. биол. н., доцент **И. О. Крылова**

ISBN 978-5-7944-4162-8

© ПГНИУ, 2024
© Н. Ю. Лисовенко, И. А. Толмачева, 2024

Содержание

Введение.....	5
Правила техники безопасности при работе.....	6
в биохимической лаборатории	
Занятие № 1. Простые белки (часть 1).....	7
Лабораторная работа № 1. Хроматографическое определение аминокислот.....	7
Лабораторная работа № 2. Цветные реакции на белки и аминокислоты.....	10
Лабораторная работа № 3. Реакции осаждения белка.....	15
Лабораторная работа № 4. Определение изоэлектрической точки желатина по мутности его растворов.....	19
Лабораторная работа № 5. Определение изоэлектрической точки желатина по вязкости его растворов.....	20
Занятие № 2. Простые белки (часть 2).....	22
Лабораторная работа № 1. Биохимическое исследование мышечной ткани.....	22
Занятие № 3. Простые белки (часть 3).....	24
Лабораторная работа № 1. Количественное определение белка биуретовым методом. Построение калибровочных кривых.....	24
Занятие № 4. Сложные белки.....	27
Лабораторная работа № 1. Гидролиз нуклеопротеидов дрожжей.....	28
Занятие № 5. Ферменты (часть 1).....	33
Лабораторная работа № 1. Свойства ферментов. Качественные пробы на присутствие ферментов.....	33
Занятие № 6. Ферменты (часть 2).....	42
Лабораторная работа № 1. Определение активности фермента каталазы по Баху и Опарину.....	42
Занятие № 7. Углеводы (часть 1).....	43
Лабораторная работа № 1. Качественные реакции на моносахариды.....	54
Лабораторная работа № 2. Качественные реакции на дисахариды...	56
Лабораторная работа № 3. Качественные реакции на полисахариды.....	57
Лабораторная работа № 4. Определение глюкозы и билирубина в моче.....	58
Занятие № 7. Углеводы (часть 2).....	59
Лабораторная работа № 1. Биохимический анализ тканей яблока...	59
Занятие № 8. Липиды.....	64
Лабораторная работа № 1. Свойства и химия липидов.....	73

Занятие № 9. Обмен липидов.....	79
Лабораторная работа № 1. «Кинетика действия липазы».....	79
Занятие № 10. Витамины.....	80
Лабораторная работа № 1. «Качественные реакции на витамины»...	81
Занятие № 11 (Вариативная часть).....	86
Лабораторная работа № 1. Определение содержания глюкозы в крови методом Хагендорна-Иенсена.....	86
Лабораторная работа № 2. Обнаружение кетоновых тел в моче.....	87
Лабораторная работа № 3. Кислотный гидролиз белков и формоловое титрование по Серенсену.....	89
Лабораторная работа № 4. Качественные реакции на некоторые гормоны.....	90
Лабораторная работа № 5. Определение концентрации общего холестерина в сыворотке и плазме крови энзиматическим колориметрическим методом на биохимическом анализаторе Stat Fax® 4500.....	92
Воспроизведение и экспрессия генетической информации.....	95
Репликация.....	96
Транскрипция.....	100
Транскрипция генов.....	101
Транскрипция в бактериальных клетках.....	102
Транскрипция в эукариотических клетках.....	103
Биосинтез белка (трансляция).....	106
Инициация.....	107
Элонгация.....	112
Генетический код.....	114
Свойства генетического кода.....	115
Терминация.....	116
Процессинг полипептидных цепей.....	117
Регуляция биосинтеза белка.....	119
Примерные тестовые задания по теме «Аминокислоты и белки».....	124
Примерные тестовые задания по теме «Ферменты».....	127
Примерные тестовые задания по теме «Углеводы и липиды».....	130
Экзаменационные вопросы по дисциплине «Биохимия».....	133
Термины и определения.....	136
Рекомендуемая литература.....	147

Введение

Биохимия является одним из фундаментальных разделов современной биологии, изучающим химические основы функционирования живых систем, а именно: основные классы органических веществ живых организмов и пути их превращения.

Задачи курса: формирование представлений об организации живых систем на молекулярном уровне и единстве их происхождения; ознакомление с процессами превращения веществ и энергии, протекающими в живых организмах, и их регуляцией; изучение роли и перспектив биохимии в решении практических вопросов биотехнологии, сельского хозяйства и медицины; ознакомление с основными принципами и методами биохимических исследований.

Пособие состоит из трех основных разделов. В первом разделе представлен лабораторный практикум по биохимии. После описания каждой работы приведен перечень вопросов для самопроверки.

Второй раздел включает контрольные задания для самостоятельной работы студентов по основным темам курса, в том числе тестовые задания.

В третьем разделе находится информация о воспроизведении и экспрессии генетической информации.

В конце пособия приведен перечень наиболее употребительных в современной биохимии терминов и даны их определения.

Представлен список рекомендуемых библиографических источников, включая основную и дополнительную литературу.

Правила техники безопасности при работе в биохимической лаборатории

При работе в лаборатории необходимо соблюдать меры предосторожности, придерживаясь следующих правил:

1. На занятия в лабораторию приходите подготовленными в соответствии с учебным планом, при себе иметь тетрадь для ведения записей.

2. Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде. Работу в лаборатории необходимо выполнять в рабочих халатах и, при необходимости, в перчатках.

3. Выполнять работу на предоставленном рабочем месте, которое следует содержать в порядке во время работ и оставлять чистым по окончании работы.

4. При работе с химическими веществами нельзя пробовать их на вкус. Все опыты с концентрированными кислотами, щелочами, газообразными веществами, органическими растворителями следует производить в вытяжном шкафу.

5. При попадании на кожу кислоты с высокой концентрацией ее необходимо смыть водой и после этого обработать слабым раствором гидрокарбоната натрия.

6. При попадании на кожу щелочи с высокой концентрацией ее нужно смыть водой, а затем слабым раствором уксусной кислоты.

7. При сильных ожогах кожу необходимо смочить крепким раствором перманганата калия.

8. Перед тем как зажечь спиртовку, необходимо убедиться, что поблизости нет горючих жидкостей (спирт, эфир и др.). Зажигать спиртовку можно только спичкой. В пробирке можно нагревать только небольшое количество раствора, жидкость должна занимать не более 1/3 объема пробирки. Пробирку при нагревании направлять отверстием от себя, но не на товарищей. Прогреть жидкость в пробирках равномерно, не допуская перегрева в одном месте и выбрасывания. Нельзя нагревать жидкость в закрытых сосудах.

9. Нельзя набирать реактивы в пипетку ртом, следует пользоваться грушей.

10. Концентрированные кислоты и другие вредные и ядовитые вещества нужно выливать в специально отведенную для этого емкость.

11. Запрещается оставлять без присмотра включенные электроприборы.

12. Все работы в лаборатории следует проводить с максимальной осторожностью, аккуратно, внимательно, чтобы не навлечь несчастный случай.

Занятие № 1. Простые белки (часть 1)

Белки представляют собой высокомолекулярные органические соединения, построенные из сотен или тысяч аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями. Разнообразие существующих в природе белков зависит от особенностей аминокислотного состава, количества аминокислотных остатков и порядка их сочетания.

Простые белки построены из аминокислот и при гидролизе распадаются соответственно только на аминокислоты. По характеру растворимости простые белки растений можно разделить на следующие группы:

– *альбумины* – белки, растворимые в воде; они легко высаливаются из водных растворов с помощью солей; широко распространены в органах и тканях животных и растений;

– *глобулины* – нерастворимы в чистой воде, но растворяются в слабых водных растворах различных солей; встречаются как в животных, так и в растениях, особенно много их в белках семян бобовых;

– *глутелины* – белки растительного происхождения, растворимые в растворах щелочей, поскольку содержат большое количество дикарбоновых аминокислот (глутамат, аспартат);

– *проламины* – белки растительного происхождения, растворимые в 50–70 %-ном растворе этилового спирта; встречаются исключительно в семенах злаков, у которых они (совместно с глутелинами) составляют основную массу клейковины.

Лабораторная работа № 1.

Хроматографическое определение аминокислот

Метод хроматографии на бумаге является одной из модификаций хроматографического метода, предложенного М.С. Цветом в 1903 г. и используется для разделения смесей разнообразных органических веществ. Разделение веществ происходит вследствие различия в распределении их между двумя жидкими фазами, одна из которых подвижна. Неподвижная фаза – вода – удерживается твердым носителем (в данном случае бумагой), не вступая с ним во взаимодействие. Нанесенные на бумагу вещества переходят в подвижную фазу (органический растворитель) и, перемещаясь с различными скоростями по бумажным капиллярам, разделяются.

Суть метода заключается в том, что каплю смеси аминокислот или гидролизата белка наносят на полоску фильтровальной бумаги, конец которой опускают в подходящий органический растворитель. Растворитель увлекает за собой нанесенные на бумагу аминокислоты, скорость перемещения которых зави-

сит от химического строения и их способности растворяться в растворителе. Чем меньше растворимость аминокислот в воде и больше растворимость в органическом растворителе, тем быстрее они перемещаются за фронтом органического растворителя. Положение аминокислот на бумаге можно обнаружить путем цветной реакции с нингидрином: производят опрыскивание из пульверизатора высушенной полоски бумаги 0,1–0,2%-ным спиртовым раствором нингидрина. Аминокислоты обнаруживаются в виде пятен, окрашенных в голубой, фиолетовый или оранжевый цвета в зависимости от структуры аминокислоты. Скорость перемещения отдельных аминокислот может быть выражена с помощью коэффициента распределения (R_f).

Коэффициентом распределения называется отношение расстояний от места нанесения аминокислоты до середины ее пятна (**a**) к расстоянию от места нанесения аминокислоты до фронта растворителя (**b**):

$$R_f = \frac{a \text{ (мм)}}{b \text{ (мм)}}$$

Для однотипных веществ при постоянных условиях величина R_f является ориентиром, позволяющим их идентифицировать. Чем больше различие в величинах R_f разделяемых веществ, тем лучше их разделение.

Цель работы. Ознакомиться с хроматографическим методом разделения аминокислот, разделить смесь аминокислот и осуществить их идентификацию.

Выполнение восходящей хроматографии. На нижнем конце полоски хроматографической бумаги длиной 10 см, шириной 4,5 см на расстоянии 1 см от края отчеркивают карандашом черту, и на нее наносят капилляром поочередно примерно через 0,5–0,8 мм каждую из предложенных аминокислот и контрольную задачу из смеси аминокислот. Нанесение капилляром повторяют 2–3 раза (для большей яркости пятен). Сверху подписывают карандашом названия аминокислот. Приготовленную бумажную полоску опускают в хроматографическую камеру с элюентом (бутанол:уксусная кислота:вода) таким образом, чтобы она погрузилась в жидкость на 2–3 мм (рис. 1). Камеру плотно закрывают пришлифованным стеклом и оставляют на 30–45 минут. За это время фронт растворителя поднимается на 9 см, полоску достают, высушивают и опрыскивают из пульверизатора раствором нингидрина, снова высушивают и нагревают над плиткой (при проявлении нельзя класть хроматограмму на стол, она должна находиться на весу. Нельзя брать за смоченную поверхность руками, поскольку при этом остаются отпечатки пальцев). В местах, где присутствуют аминокислоты, появляются синие или фиолетовые пятна, их обводят карандашом и вычисляют коэффициенты распределения аминокислот по вы-

шеуказанной формуле. Данный метод позволяет определять микроколичества аминокислот. Наряду с восходящей хроматографией нередко используют и радиальную хроматографию.

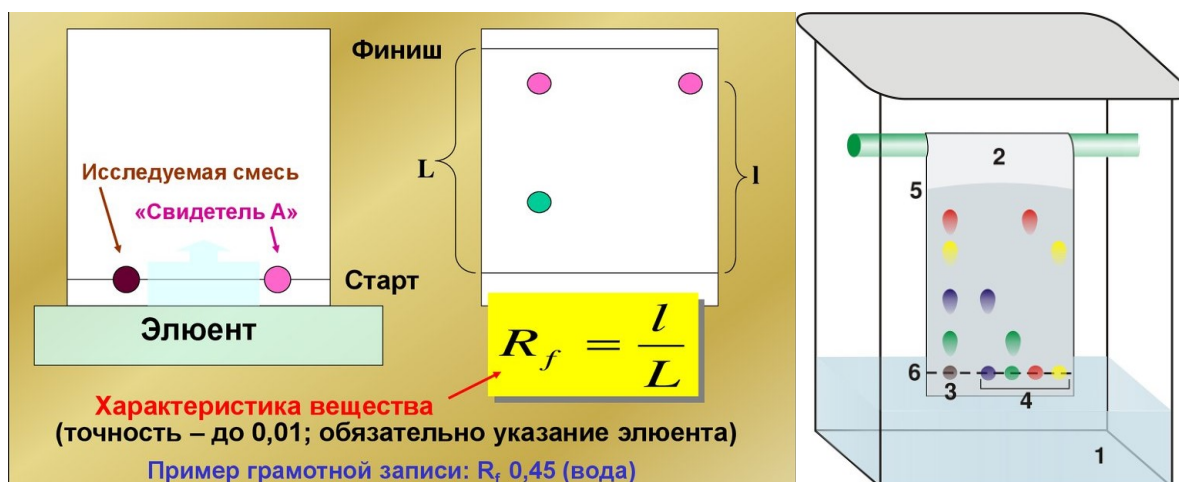


Рис. 1. Восходящая ТСХ

Выполнение радиальной хроматографии. Бумажный диск диаметром 12 см (большим, чем диаметр чашки Петри) делят карандашом на 4 равные части. В центре диска делают небольшой вырез, в который помещают ножку высотой 2 см, сделанную из фильтровальной бумаги в виде трубочки. В центре карандашом чертят круг диаметром 1 см и на него в каждый сектор наносят капилляром определенную аминокислоту, подписывают ее сверху карандашом, бумажный диск высушивают. На дно чашки Петри наливают примерно 10 мл элюента, бумажный диск накладывают на края чашки Петри так, чтобы ножка касалась раствора, чашку Петри накрывают крышкой и оставляют при комнатной температуре на 1 ч. Высушенную хроматограмму проявляют раствором нингидрина, равномерно смачивая данным раствором ее поверхность, бумажный диск высушивают (при проявлении нельзя класть хроматограмму на стол, она должна находиться на весу. Нельзя брать за смоченную поверхность руками, поскольку при этом остаются отпечатки пальцев) (рис. 2). Вычисляют R_f (аналогично восходящей хроматограмме).

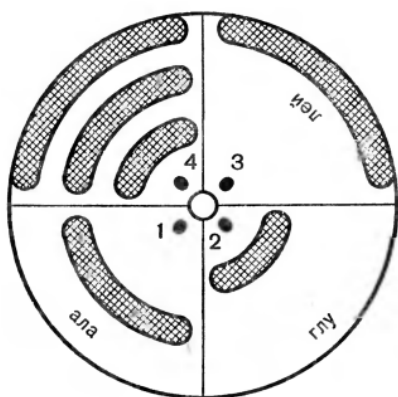


Рис. 2. Радиальная ТСХ

Указания к составлению отчета по работе

Студенты записывают принцип хроматографического метода, зарисовывают или подклеивают в тетрадь полученные хроматограммы. Линейкой измеряют расстояние от места нанесения капли раствора до середины каждого пятна и от

места нанесения капли раствора до линии фронта растворителя, вычисляют коэффициент распределения для каждой аминокислоты. *Сопоставлением пятен на хроматограмме и вычисленным R_f определяют состав аминокислот в задаче.*

Лабораторная работа № 2. **Цветные реакции на белки и аминокислоты**

Белки можно обнаружить с помощью двух типов реакций: цветных и осаждения. При взаимодействии белка с отдельными химическими веществами возникают окрашенные продукты реакции, образование которых обусловлено наличием в молекуле белка той или иной аминокислоты или химической группировки. Поэтому так называемые цветные реакции на белки часто используют для установления белковой природы вещества, изучения аминокислотного состава различных природных белков, количественного определения белков, количественного определения в белке той или иной аминокислоты.

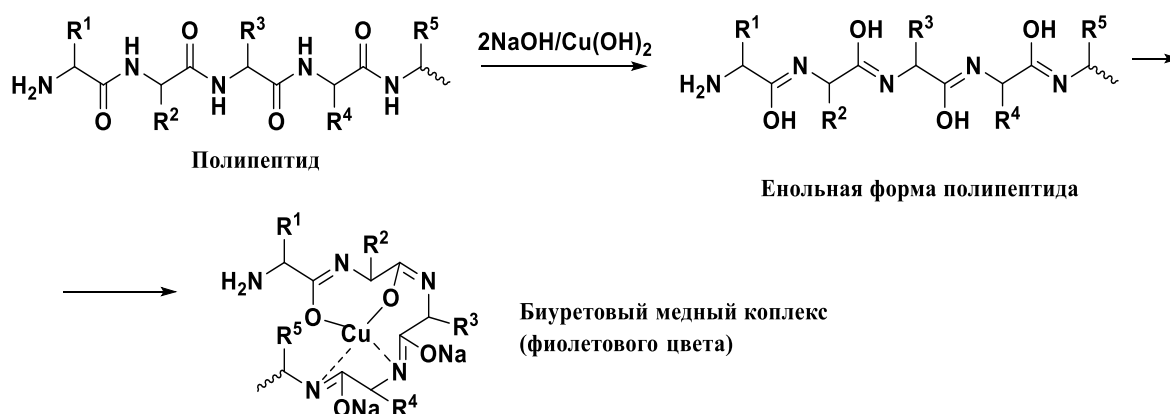
Наиболее известными качественными реакциями на белки и аминокислоты являются: биуретовая, ксантопротеиновая, нингидриновая, реакция Фоля и др.

Биуретовая реакция на белки обусловлена наличием между аминокислотными остатками пептидных связей, которые в щелочной среде образуют с ионами меди окрашенные солеобразные комплексные соединения (красно-фиолетового или сине-фиолетового цвета).

Ксантопротеиновая реакция обусловлена присутствием в белке циклических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана, которые при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образуют нитропроизводные желтого цвета (реакция нитрования бензольного кольца).

Нингидриновая реакция является качественной реакцией на все альфа-аминокислоты. При нагревании с избытком нингидрина аминокислота дегидрируется, декарбоксилируется с образованием CO_2 , NH_3 и альдегида, а нингидрин превращается в восстановленный нингидрин. Нингидрин, восстановленный нингидрин и аммиак затем конденсируются с образованием окрашенного соединения. Если аминокислота содержит свободную аминогруппу, образуется пигмент сине-фиолетового цвета.

Реакция Фоля обусловлена присутствием в белке аминокислот цистина и цистеина, содержащих слабосвязанную серу. При нагревании растворов белка со щелочью эти аминокислоты разрушаются с образованием сульфида натрия; последний, взаимодействуя с уксуснокислым свинцом, образует бурый (или черный) осадок сульфида свинца. Серосодержащая аминокислота метионин более устойчива и при слабом щелочном гидролизе не разрушается.



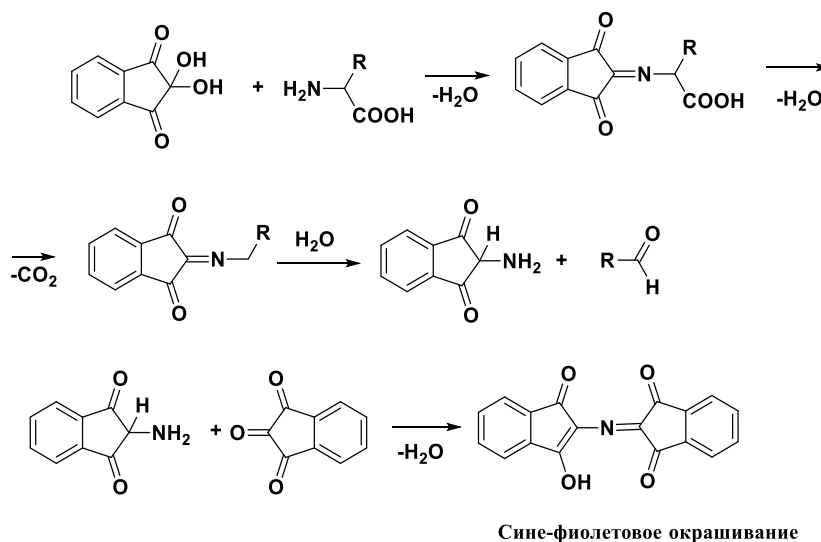
Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на белок и аминокислоты.

Опыт 1. Биуретовую реакцию на пептидную связь способны давать вещества, которые содержат не менее двух пептидных связей $-\text{CO}-\text{NH}-$.

Порядок выполнения опыта. К 5 каплям раствора белка добавляют 3 капли 10%-ного раствора едкого натра и 1 каплю 1%-ного раствора сернокислой меди, перемешивают, и содержимое пробирки приобретает **сине-фиолетовый** цвет. Нельзя добавлять избыточное количество сернокислой меди, так как синий осадок гидрата окиси меди маскирует фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

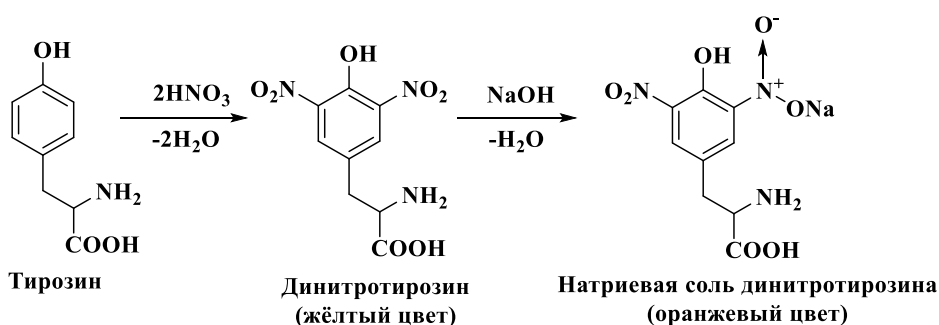
Опыт 2. Нингидриновая реакция на аминокислоты характерна для аминогрупп, находящихся в α -положении. Нагревание растворов белка, α -аминокислот и пептидов с нингидрином дают синее или фиолетовое окрашивание.

Порядок выполнения опыта. К 5 каплям раствора белка приливают 5 капель 0,1%-ного водного раствора нингидрина, кипятят 1–2 мин, в результате появляется розово-фиолетовое или **сине-фиолетовое** окрашивание. С течением времени раствор синее.



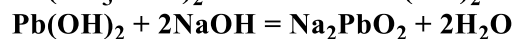
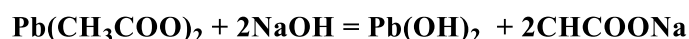
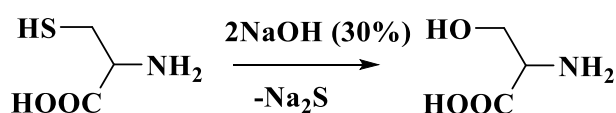
Опыт 3. Ксантопротеиновая реакция открывает ароматические аминокислоты: триптофан, фенилаланин, тирозин и др.

Порядок выполнения опыта. К 5 каплям раствора белка добавляют 3 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятят. Вначале появляется осадок свернувшегося белка, который при нагревании окрашивается в желтый цвет. После охлаждения в пробирку наливают по каплям 10%-ный раствор едкого натра до появления оранжевого окрашивания натриевой соли динитротирозина. Реакция обусловлена нитрованием бензольного кольца аминокислот с образованием нитросоединений **желтого** цвета. При подщелачивании возникает хиноидная структура, окрашенная в **оранжевый** цвет.



Опыт 4. Реакция Фоя указывает на присутствие в белке цистеина и цистина, содержащих слабосвязанную серу. Метианин также содержит серу, но этой реакции не дает, поскольку сера связана в нем прочно.

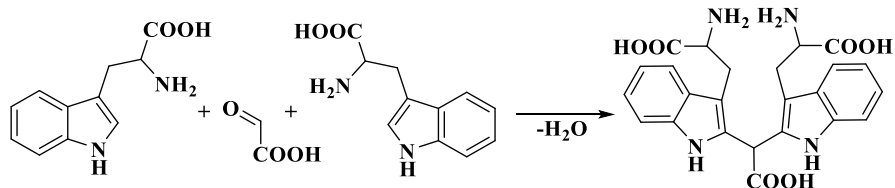
Порядок выполнения опыта. К 5 каплям раствора белка прибавляют 5 капель 30%-ного раствора гидроксида натрия и 1 каплю 5%-ного раствора уксуснокислого свинца, кипятят и дают постоять 1–2 мин, после чего появляется **бурый** или **черный** осадок сульфида свинца.



Опыт 5. Реакция Адамкевича обусловлена наличием в белке аминокислоты триптофана.

Порядок выполнения опыта. В пробирку наливают 5 капель яичного или пшеничного белка или раствора желатины, добавляют 5 капель концентрированной уксусной кислоты, слегка нагревают и затем подслаивают равным объемом концентрированной серной кислоты. На границе двух слоев появляется **красно-фиолетовое** кольцо, постепенно распространяющееся на всю жидкость.

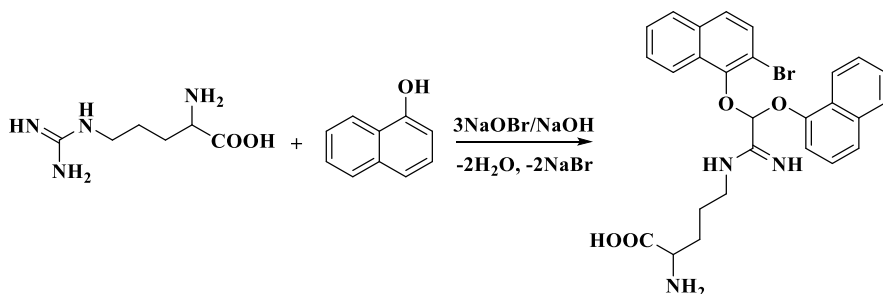
Триптофан, присутствующий в белке, реагирует с глиоксиловой кислотой, присутствующей в виде примеси в концентрированной уксусной кислоте, образуя окрашенный продукт конденсации. Концентрированная серная кислота принимает участие в реакции в качестве водоотнимающего средства. Интенсивность окраски зависит от количества триптофана в белке. В яичном и соевом белке его в два раза больше, чем в пшеничном, в желатине триптофан отсутствует. При использовании вместо уксусной кислоты тростникового сахара (в этом случае реакция называется по имени Шульца–Распайля) в реакции принимает участие оксиметилфурфурол, образующийся из фруктозы.



Опыт 6. Реакция Сакагучи обусловлена присутствием в белке аминокислоты аргинина, имеющей в своем составе гуанидиновую группировку.

Порядок выполнения опыта. В пробирку помещают 5 капель яичного или пшеничного белка и добавляют 5 капель 10%-ного раствора едкого натра и 3 0,1%-ного спиртового раствора α -нафтола и 1–5 капель 2%-ного раствора гипобромита натрия. Жидкость в пробирке окрашивается в **красный** цвет. Присутствие аммиака и избыток гипобромита мешают прохождению реакции.

В результате реакции аргинина с α -нафтолом образуется продукт конденсации окисленного аргинина α -нафтолом. Гипобромид играет роль окислителя.

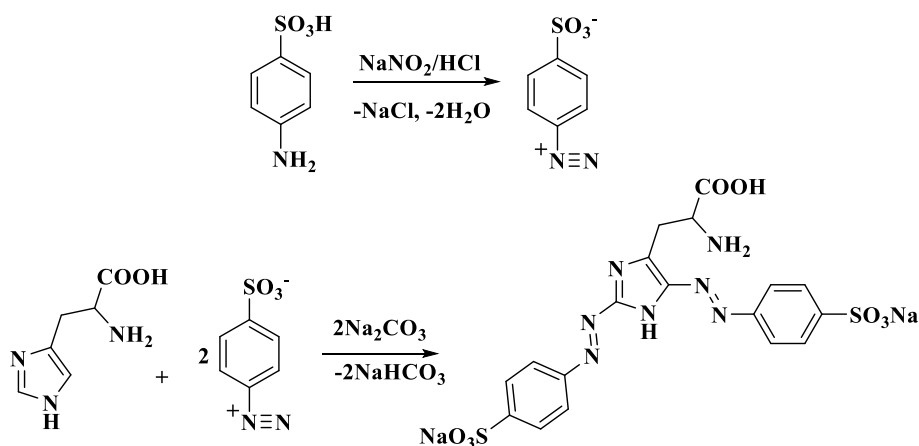


Опыт 7. Реакция Паули обусловлена присутствием в белке аминокислот гистидина или тирозина, которые, реагируя с диазобензосульфокислотой, образуют азакраситель красного цвета.

Порядок выполнения опыта. В пробирку наливают 3 капли 1%-ной сульфаниловой кислоты, 3 капли 5%-ного раствора азотистокислого натрия и перемешивают. К полученному диазореактиву добавляют 5 капель яичного или пшеничного белка и 3–5 капель 10%-ного раствора углекислого натрия. Жидкость окрашивается в красный цвет. Если реакцию производить с раствором желатины, то окраска получается меньшей интенсивности, так как в желатине нет тирозина и мало гистидина. Описанная реакция может быть выполнена иным путем. К небольшому количеству приготовленного диазореактива добав-

ляют 5 капель 10%-ного раствора соды и осторожно по стенке пробирки наслаивают раствор белка. На границе двух жидкостей появляется **красное** кольцо. При смешивании вся жидкость окрашивается в **оранжевый** или **желтый** цвет.

Химизм реакции основан на образовании азокрасителя:



Реакция Паули не является строго специфичной для гистидина и тирозина, так как ее вызывают любые вещества, имеющие в своей структуре фенольное, имидазольное или тиазольное кольцо (адреналин, тиамин, гистамин и др.). Однако все они отсутствуют в белке и не мешают реакции.

Опыт 8. Нитропруссидная реакция обусловлена присутствием в белке серусодержащих аминокислот, которые при кипячении со щелочью разрушаются, образуя сернистый натрий. Нитропруссид натрия $[\text{NaFe}^{+3}(\text{CN})_5 \text{NO}]$ при взаимодействии с сернистым натрием превращается в соединение, окрашенное в красный цвет.

Порядок выполнения опыта. В пробирку помещают 5 капель раствора яичного или пшеничного, или соевого белка, 5 капель 10–30%-ного раствора щелочи и кипятят несколько минут. После охлаждения добавляют 1–3 капли нитропруссид натрия. В пробе с яичным или пшеничным белком получается **красное** окрашивание, исчезающее при стоянии. В пробе с раствором желатины жидкость окрашивается в **желтый** цвет.

Химизм реакции детально не установлен. Белки, не содержащие цистина, цистеина и метионина или содержащие их в небольшом количестве, нитропруссидную реакцию не дают.

Указания к составлению отчета по цветным реакциям. Наблюдения оформляются в виде табл. 1 с указанием типа реакции (общая, групповая, специфическая).

Таблица 1

№ п/п	Название и тип реакции	Используемые реактивы	Наблюдаемое окрашивание	Группировки, которые открываются в белке

Лабораторная работа № 3. Реакции осаждения белка

На устойчивость белка в растворе влияет наличие заряда и гидратной оболочки. Осаждение белка бывает обратимым и необратимым. Обратимое осаждение наблюдается при действии органических растворителей или растворов солей щелочных и щелочно-земельных металлов (высаливание). При снятии факторов, вызывающих обратимое осаждение, белок переходит в нативное состояние. При денатурации белки утрачивают свою биологическую активность.

Связи, стабилизирующие белковую молекулу и определяющие ее структуру

Ионная связь относится к электростатическим взаимодействиям.

Водородная связь возникает между боковыми цепями аминокислот и пептидными связями.

Дисульфидная связь образуется между цистеиновыми остатками (внутримолекулярная связь).

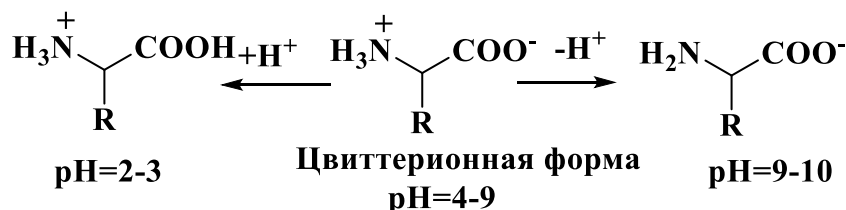
Гидрофобная связь отражает взаимодействие неполярных групп.

Гидратируемые группы. Молекулы воды, окружающие белковую молекулу, при определенных условиях могут образовывать структуру, подобную структуре льда. Этот водный слой способствует структурной стабильности белковой молекулы.

Цель работы. Ознакомиться с реакциями осаждения и высаливания растворов белков.

Опыт 1. Осаждение белков при кипячении

Почти все белки свертываются при нагревании в нейтральной или слабокислой среде. В сильноокислых и щелочных средах растворы белков при кипячении не коагулируют и могут дать осадок лишь при добавлении нейтральной соли (NaCl и др.). Устойчивость белка в растворе зависит от приобретения положительного заряда в сильноокислой среде и увеличения отрицательного заряда в щелочной среде.



При понижении pH диссоциация карбоксильной группы подавляется, и молекула становится положительно заряженной. При повышении pH происхо-

дит отрыв протона аминогруппы и молекула приобретает отрицательный заряд. Наиболее полное и быстрое осаждение белков происходит в *изоэлектрической точке* (это такое значение рН, при котором частицы белка не передвигаются в электрическом поле ни к аноду, ни к катоду). Для большинства белков изоэлектрическая точка соответствует слабокислой среде (рН~5).

Порядок выполнения опыта. В 5 пробирок наливают по 5 капель 1%-ного раствора яичного белка. Первую пробирку нагревают до кипения, при этом жидкость мутнеет. Во второй пробирке раствор белка нагревают до кипения и прибавляют 1 каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты. При стоянии выпадает хлопьевидный осадок белка, так как частицы белка теряют заряд и приближаются к изоэлектрическому состоянию. В третью пробирку добавляют 5 капель 1%-ного раствора уксусной кислоты для получения сильнокислой реакции среды. При кипячении осадок не образуется, поскольку белковые мицеллы перезаряжаются и несут положительный заряд, повышая их устойчивость. В четвертую пробирку приливают 5 капель 1%-ного раствора уксусной кислоты и 2 капли насыщенного раствора хлористого натрия и нагревают, выпадает белый хлопьевидный осадок белка, так как его частицы теряют заряд вследствие взаимодействия белка с ионами хлористого натрия. В пятую пробирку добавляют 2 капли 10%-ного раствора едкого натра. При кипячении жидкости осадок не образуется, поскольку в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка увеличивается.

Указания к составлению отчета: Необходимо отметить в табл. 2 положительный результат осаждения плюсом, а отрицательный – минусом и сделать выводы по работе, касающейся изоэлектрической точки.

Таблица 2

Нейтральная среда	Слабокислая среда	Сильнокислая среда	Сильнокислая среда + электролит	Щелочная среда

Опыт 2. Высаливание

Высаливанием называют осаждение белков с помощью больших концентраций нейтральных солей: NaCl, (NH₄)₂SO₄ и др. Реакция высаливания обусловлена дегидратацией макромолекул белка и одновременной нейтрализацией электрического заряда. Для высаливания различных белков требуется неодинаковая концентрация одних и тех же солей. Хлористый натрий осаждает слабее, чем сернокислый аммоний, вследствие меньшей дегидратирующей способности. При высаливании белок обычно не теряет своих естественных свойств, например, он может вновь проявлять ферментативную активность. Метод вы-

саливания позволяет разделить белки на различные белковые фракции: альбумины, глобулины и др.

Порядок выполнения опыта

1) В пробирку наливают 20 капель раствора белка и прибавляют порошок хлористого натрия до полного насыщения раствора. Через несколько минут появляется осадок глобулинов. Содержимое пробирки отфильтровывают, в фильтрате остается альбумин, который в нейтральных растворах не выпадает даже при добавлении хлористого натрия. К фильтрату прибавляют по каплям 1%-ный раствор уксусной кислоты (15–20 капель), альбумин выпадает в осадок, его отфильтровывают и проверяют фильтрат на отсутствие белка при помощи биуретовой реакции;

2) К 15 каплям раствора белка добавляют 15 капель насыщенного раствора *сернокислого аммония* и перемешивают, выпадает осадок глобулинов. Его отфильтровывают, в фильтрате остается альбумин, к нему добавляют порошок сернокислого аммония до полного насыщения. Выпадает осадок яичного альбумина, его отфильтровывают, фильтрат проверяют на отсутствие белка с помощью биуретовой реакции.

Указания к составлению отчета: необходимо отметить положительный результат осаждения белков плюсом, а отрицательный – минусом; результаты занести в табл. 3 и сделать выводы о высаливающей способности указанных растворов.

Таблица 3

Применяемый раствор белка и название белковых фракций	Что осаждается в насыщенном растворе NaCl	Что осаждается в слабокислой среде после высаливания NaCl	Что осаждается в полунасыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Что осаждается в насыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Опыт 3. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Осаждение белков солями тяжелых металлов, в отличие от высаливания, происходит при небольших концентрациях солей. Соли тяжелых металлов вызывают необратимое осаждение белков, т.е. денатурацию. Способность белка прочно связывать ионы тяжелого металла в виде нерастворимых осадков используется как противоядие при отравлении солями ртути, меди, свинца и др.

Порядок выполнения опыта

1) Осаждение медным купоросом. К 5 каплям раствора яичного белка прибавляют 1 каплю 10%-ного раствора сернокислой меди, образуется **бледно-голубой** осадок, нерастворимый в воде. В другой пробирке к такой же порции

белка приливают 1 каплю 10%-ного раствора сернокислой меди, а затем еще 10 капель и наблюдают растворение осадка в избытке реактива;

2) Осаждение белков уксуснокислым свинцом. К 5 каплям раствора белка приливают 2 капли 5%-ного раствора уксуснокислого свинца. Образуется нерастворимый в воде осадок, но легко растворяющийся в избытке осадителя.

Опыт 4. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Концентрированные минеральные кислоты вызывают денатурацию белка. В избытке минеральных кислот (за исключением азотной) выпавший осадок белка растворяется.

Порядок выполнения опыта

1) Осаждение азотной кислотой. К 5 каплям концентрированной азотной кислоты приливают по стенке пробирки равный объем раствора белка. На границе двух жидкостей образуется осадок в виде небольшого белого кольца.

2) Осаждение серной кислотой проводят аналогично. При избытке кислоты образующийся осадок растворяется.

Опыт 5. Осаждение белков органическими кислотами

Органические кислоты вызывают необратимое осаждение белков. Наибольшее применение получили трихлоруксусная CCl_3COOH и сульфосалициловая $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})(\text{COOH})\text{SO}_3\text{H}$.

Порядок выполнения опыта

1) Осаждение сульфосалициловой кислотой. К 5 каплям раствора белка добавляют 2 капли 20%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Выпадает осадок белка.

2) Осаждение трихлоруксусной кислотой проводят аналогично.

Опыт 6. Осаждение белков органическими растворителями

В органических растворителях (спирт, ацетон) белки не растворяются. В зависимости от природы белка для его осаждения требуются различные концентрации спирта. При осаждении спиртом раствор белка должен быть нейтральным или слабокислым, но не щелочным. Успешнее реакция проходит в присутствии хлористого натрия вследствие снятия заряда с частиц белка. При кратковременном действии и на холоде реакция осаждения белка спиртом обратима. При длительном воздействии происходит денатурация белка.

Порядок выполнения опыта. К 5 каплям раствора белка приливают 15–20 капель этилового спирта (или ацетона), раствор мутнеет. Добавляют 1 каплю насыщенного раствора хлористого натрия, при стоянии выпадает осадок белка.

Опыт 7. Осаждение белков алкалоидными реактивами

Осаждение белков алкалоидами относится к необратимым реакциям. Наиболее часто используются танин, пикриновая кислота и др. Механизм осаждения белков алкалоидными реактивами связан с образованием нерастворимых солеобразных соединений с основными азотистыми группами белка.

Порядок выполнения опыта. К 5 каплям раствора белка прибавляют 1–2 капли насыщенного раствора танина (он представляет собой сложный эфир галловой кислоты и глюкозы) и 1–2 капли 1%-ного раствора уксусной кислоты. Выпадает осадок белка **желтовато-серого** цвета. Аналогичную реакцию можно провести с пикриновой кислотой.

Указания к составлению отчета: результаты реакций записывают в табл. 4. Появление осадка обозначают плюсом, растворение осадка – минусом и делают обоснованные выводы по работе.

Таблица 4

Название веществ, осаждающих белки	Используемые реактивы	Характер и цвет осадка	Особенности реакции

Лабораторная работа № 4. Определение изоэлектрической точки желатина по мутности его растворов

Белки – это сложные органические соединения, содержащие кислотные и основные группы. Обладая одновременно кислотными и основными свойствами, белки могут образовывать биполярные ионы. Повышение концентрации ионов водорода приводит к уменьшению кислотной диссоциации белка и переводит его в катион, тогда как понижение концентрации ионов водорода, напротив, переводит белковые частицы в анионы. Однако при определенном значении рН число положительных ионов сравнивается с числом отрицательных ионов и заряд белка может быть близким или равным нулю. В этом случае говорят о том, что белок находится в изоэлектрическом состоянии. То есть, одним из важных признаков белка является его изоэлектрическая точка – значение рН, при котором белок находится в виде нейтральных молекул. Белки в изоэлектрической точке наименее устойчивы и легко выпадают в осадок.

Цель работы. Определить изоэлектрическую точку желатина.

Порядок выполнения работы. В 5 пробирок наливают по 1 мл заранее заготовленных растворов № 1–5 (0,2 М раствора уксуснокислого натрия и 0,2 М раствора уксусной кислоты). В каждую пробирку к 1 мл заготовленной буфер-

ной смеси приливают по 0,5 мл 1%-ного раствора желатины, перемешивают и добавляют по 2 мл этилового спирта. Содержимое пробирок вновь перемешивают и оставляют на 5 мин. Через 5 мин отмечают, в какой пробирке и при каком рН произошло наибольшее помутнение раствора. В табл. 5 отмечают отсутствие мути знаком «минус», наличие и степень мутности – одним или двумя знаками «плюс».

Таблица 5

Растворы, №	Количество 0,2 М раствора CH_3COONa , мл	Количество 0,2 М раствора CH_3COOH мл	рН смеси	Добавлено 1%-ного раствора желатины, мл	Добавлено раствора этанола, мл	Степень мутности
1	0,1	0,9	3,8	0,5	2	
2	0,2	0,8	4,15	0,5	2	
3	0,5	0,5	4,75	0,5	2	
4	0,8	0,2	5,35	0,5	2	
5	0,9	0,1	5,70	0,5	2	

Выводы по работе должны быть связаны с наблюдением влияния реагентов на осаждение белка и на изоэлектрическую точку.

Лабораторная работа № 5.

Определение изоэлектрической точки желатина по вязкости его растворов

Порядок выполнения работы. С помощью пипетки отбирают по 25 мл раствора желатины в восемь пронумерованных колб по 100 мл. В эти же колбы прикапывают объемы 0,1 н. соляной кислоты или гидроксида натрия, указанные в табл. 6, для придания растворам нужного значения рН. Далее измеряют вязкость свежеприготовленных растворов с помощью вискозиметра. Для этого раствор с помощью груши засасывают в вискозиметр на 3–4 см выше верхней метки над шариком вискозиметра. Грушу отсоединяют от вискозиметра и последний приподнимают в штативе так, чтобы конец капилляра вискозиметра находился над уровнем жидкости в ячейке. Секундомером измеряют не менее трех раз время прохождения мениском расстояния от верхней до нижней метки на вискозиметре. По окончании измерения вискозиметр тщательно промывают

горячей водой и определяют время истечения чистого растворителя (дистиллированной воды). Данные записывают в табл. 6.

Таблица 6

Номер колбы	pH раствора	Время истечения, с	$\eta_{\text{отн}} = t/t_0$	$\eta_{\text{уд}} = (t/t_0) - 1$
1	3,0			
2	3,5			
3	4,0			
4	4,5			
5	5,1			
6	7,0			
7	9,0			
8	11,0			

Указания к составлению отчета: по полученным данным строят кривую зависимости удельной вязкости от pH исследуемых растворов и по минимуму на кривой находят изоэлектрическую точку.

Занятие № 2. Простые белки (часть 2)

Лабораторная работа № 1.

Биохимическое исследование мышечной ткани

Опыт 1. 20 г измельченной мышечной ткани (говяжий фарш готовится лаборантом) экстрагируют двойным объемом дистиллированной воды (40 мл) при встряхивании в течение 10 мин. Экстракт фильтруют через марлю, затем экстракцию повторяют. Водные экстракты объединяют, делят на две части, колбы подписывают.

Опыт 2. Остаток мышечной ткани экстрагируют при встряхивании тройным объемом 10%-ного раствора хлористого аммония (60 мл) или 5%-ного раствора сульфата магния 10 мин и отделяют солевой экстракт фильтрованием через марлю.

Опыт 3. В первой части водного экстракта, полученного в опыте 1, цветными реакциями обнаруживают наличие белка (в водный экстракт переходят белки: миоген, глобулин и миохром).

Опыт 4. Вторую часть водного экстракта, полученного в опыте 1, освобождают от белка кипячением в слабокислой среде (подкисляют уксусной кислотой). Осадок белка отфильтровывают. В фильтрате обнаруживают наличие фосфатов, хлоридов, сульфатов качественными реакциями. Молочную кислоту определяют следующим образом: в три пробирки наливают по 1 мл 1%-ного раствора фенола, добавляют по каплям раствор хлорного железа до появления фиолетовой окраски фенолята железа. В первую пробирку приливают 1 мл воды (эта пробирка служит контролем), во вторую – приливают 1 мл стандартного раствора молочной кислоты (0,5%), в третью – полученный безбелковый мышечный экстракт. В пробирках, содержащих молочную кислоту, наблюдают замену фиолетовой окраски раствора на желтую.

Опыт 5. В солевом экстракте мышцы, полученном в опыте 2, цветными реакциями доказывают наличие белка (миозина и актомиозина). Устанавливают границы высаливания миозина. Для этого в 12 пробирок наливают по 2 мл солевого экстракта, затем приливают уменьшающиеся объемы воды (как это указано в табл. 7, стр. 22) и возрастающие объемы насыщенного раствора сульфата аммония (табл. 7, стр. 22). Пробирка с минимальной концентрацией сульфата аммония, дающая заметное осаждение белка, показывает нижнюю границу высаливания. Например, осадок начал образовываться с третьей пробирки, тогда нижняя граница высаливания будет на уровне 15% полного насыщения сульфатом аммония. После некоторого отстаивания выпавшие осадки отфильтровывают и к фильтратам добавляют по 3 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Пробирка с минимальной концентрацией сульфата аммония, в которой при

этом не образуется осадка и жидкость остается прозрачной, определяет верхнюю границу высаливания. Так, если первая из пробирок, в которой жидкость осталась прозрачной, № 11, то верхняя граница высаливания составляет 60% от полного насыщения сульфатом аммония.

Выводы должны содержать результаты общих цветных реакций на белки, а также на хлориды, сульфаты, молочную кислоту, должно быть показано различие белков по образованию цветных реакций, найдены границы высаливания миозина.

Таблица 7

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Белок, мл	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Вода, мл	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,0	1,0
Сульфат аммония, мл	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6,0	7,0
% насыщ	5,0	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	70

Занятие № 3. Простые белки (часть 3)

Лабораторная работа № 1.

Количественное определение белка биуретовым методом.

Построение калибровочных кривых

Для количественного определения белков в биологическом материале или лекарственных препаратах чаще всего употребляются азотометрия, фотокolorиметрия, фотонейфелометрия и спектрофотометрия.

Азотометрия основана на определении содержания азота белка после минерализации исследуемого образца. Поскольку белки содержат в среднем 16% азота, то найденное количество его умножают на 6,25 (так как $100:16=6,25$) и получают содержание белка в пробе. Эти методы (к ним относится классический метод Кьельдаля и его модификации) очень трудоемки и не всегда надежны, так как процентное содержание азота в разных белках колеблется от 14 до 19.

Фотокolorиметрические методы основаны на так называемых «цветных» реакциях на функциональные группы белков. Среди них наибольшее применение нашли биуретовая реакция на пептидные группы и реакция Фолина на ароматические радикалы аминокислот (тирозин, триптофан). Биуретовый метод более специфичен, так как пептидные связи имеются только в белках и пептидах. Он широко применяется в клинико-биохимических исследованиях. Метод Лоури, основанный на реакции Фолина, высокочувствительный, но малоспецифичный, поскольку сходную окраску дают свободные ароматические аминокислоты и многие другие соединения, содержащие фенольную группу.

Фотонейфелометрические методы определения содержания белка основываются на оценке степени мутности его взвеси в растворах. Эти методы не получили широкого распространения.

Спектрофотометрические методы делятся на прямые и косвенные. Последние представляют собой более чувствительный и точный вариант фотокolorиметрического. После проведения цветной реакции на белки проводят спектрофотометрию окрашенного раствора и по светопоглощению его в монохроматическом свете рассчитывают содержание белка.

Прямой метод состоит в измерении светопоглощения раствора белка в ультрафиолетовой области при 200–220 нм (в этой области абсорбируют пептидные группы белка) и при 280 нм (зона поглощения ароматических радикалов аминокислот, в основном триптофана и тирозина). Эти методы весьма удобны и не требуют предварительного образования окрашенных комплексов. Более специфична спектрофотометрия при 200–220 нм, чем при 280 нм, так как в последнем случае мешает светопоглощение различных низкомолекулярных ароматических соединений, содержащихся в биологическом материале.

Биуретовый метод основан на образовании окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей белка с ионами двухвалентной меди в щелочной среде (биуретовая реакция). Интенсивность развивающейся окраски раствора прямо пропорциональна концентрации белка и определяется фотометрически. Для количественного определения белка измеряют интенсивность окраски стандартных растворов белка с известной концентрацией (величину оптической плотности $D_{ст}$). По полученным данным строят график зависимости оптической плотности окрашенных растворов от концентрации в них белка (стандартную калибровочную кривую) (рис. 3).

Цель работы. Количественно определить содержание альбумина в растворе с неизвестной концентрацией белка.

Порядок выполнения работы: измеряют оптическую плотность D_x окрашенного раствора с неизвестной концентрацией белка и по стандартной кривой определяют в нем концентрацию белка. В качестве стандартного белка обычно используют раствор сывороточного альбумина.

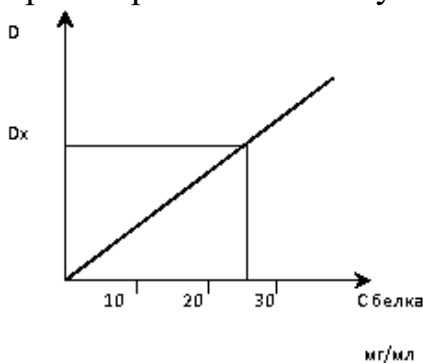


Рис. 3. График зависимости оптической плотности раствора от концентрации белка

Указания к составлению отчета: результаты измерений занести в табл. 8, построить стандартную кривую и определить по ней концентрацию белка в неизвестном растворе.

Таблица 8

Реактивы, мл	Контроль	Стандартный белок 10 мг/мл	Стандартный белок 20 мг/мл	Стандартный белок 30 мг/мл	Неизвестный белок X мг/мл
Раствор сывороточного альбумина, мл	—	0,2	0,2	0,2	0,2
H ₂ O, мл	0,2	—	—	—	—
Биуретовый реактив, мл	5	5	5	5	5
Перемешивают и инкубируют 30 мин при комнатной температуре					
Фотометрируют против H ₂ O ($\lambda = 545$ нм, толщина кюветы 1 см). D_{545}					
$D_{ст} - D_k$; $D_x - D_k$					

При отчете по теме студент должен ответить на следующие вопросы:

1. Что такое «белок»?
2. Как связаны между собой аминокислоты в молекуле белка?
3. Напишите строение следующих полипептидов: а) глицил-аланил-валил-лейцил-изолейцин; б) трионил-аспарагил-лизил-тирозин; в) аргинил-триптофанил-лизил-пролин; г) серил-цистеил-аланин.
4. Какой преобладающий заряд несет молекула каждого из указанных веществ?
5. Какие цветные реакции возможны для этих веществ?
6. Какой реакции среды характеризуется изоэлектрическая точка каждого из полипептидов?
7. В чем заключается механизм цветных реакций на белки?
8. Каковы методы определения N- и C-концевых аминокислот?
9. Опишите гидролиз белка, назовите виды гидролиза.
10. От чего зависит растворимость белка, какие факторы стабилизируют белок в растворе?
11. Рассмотрите уровни организации белковых молекул.
12. Укажите связи, формирующие каждую структуру.
13. Чем различаются структуры молекул глобулярных и фибриллярных белков?
14. Каковы общие механизмы осаждения белка из раствора?
15. Что такое «высаливание белков»?
16. Что такое «денатурация белка»? Назовите факторы, вызывающие денатурацию белка.

Занятие № 4. «Сложные белки»

На этом занятии исследуются сложные белки дрожжей, молока и слюны.

Сложные белки содержат непосредственно белковую часть – апопротеин и небелковый компонент – простетическую группу. В зависимости от строения последней принято различать следующие сложные белки:

Фосфопротеины – это сложные белки, простетической группой которых является остаток фосфорной кислоты. Тип связи между апопротеином и небелковым компонентом – сложноэфирная, которая образуется при взаимодействии ОН-группы серина или треонина с фосфорной кислотой. К протеинам этого класса относятся казеиноген молока, фосфорилированные модификации гистонов, ферменты (РНК-полимеразы, некоторые фосфотрансферазы, фосфатазы) и другие, а также овальбумин белка и вителлин, фосвитин желтка яиц, ихтуллин икры рыб.

Нуклеопротеины – сложные белки, простетической группой которых являются нуклеотиды, и в первую очередь нуклеиновые кислоты – ДНК и РНК. В качестве апопротеина выступают белки гистоны, реже протамины.

Хромопротеины («цветные белки») своей окраской обязаны простетической группе – пигменту. В зависимости от строения различают следующие подклассы: гемопротеины, флавопротеины, родопсин.

Гемопротеины (красные) – сложные белки, простетической группой которых служит гем. Он представлен порфирином, состоящим из четырех пиррольных колец, соединенных метеновыми мостиками. В центре располагается атом Fe^{2+} или Mg^{2+} .

Металлопротеины – сложные белки, где роль небелкового компонента выполняют ионы металлов. Связь между ними ионная или координационная (донорно-акцепторная). Типичными представителями таких белков являются железосодержащие белки, к примеру, ферритин.

Гликопротеины или гликоконъюгаты. В них простетическая группа представлена углеводными компонентами и связана с белком О-гликозидными (иногда N-гликозидными) связями. Небелковый компонент некоторых гликопротеидов редко бывает представлен одним моносахаридом; как правило, это олиго- или полисахаридные разветвленные цепочки.

Липопротеины – сложные белки, простетическая группа в которых – липиды: нейтральные жиры (ТАГ), эфиры холестерина, ФЛ. Между компонентами возникает гидрофобное взаимодействие, реже ионная или эфирная связи.

Цель работы. Закрепить знания о структуре и физико-химических свойствах сложных белков для того, чтобы понять методы разделения и очистки белков, а также принципы функционирования белков в организме.

Лабораторная работа № 1. Гидролиз нуклеопротеидов дрожжей

Порядок выполнения работы. В большую широкогорлую пробирку помещают 0,1 г сухих пекарских дрожжей, 4 мл 10%-ного раствора серной кислоты, закрывают пробкой, в которую вставлена в качестве холодильника трубка 25–30 см (рис. 4.).

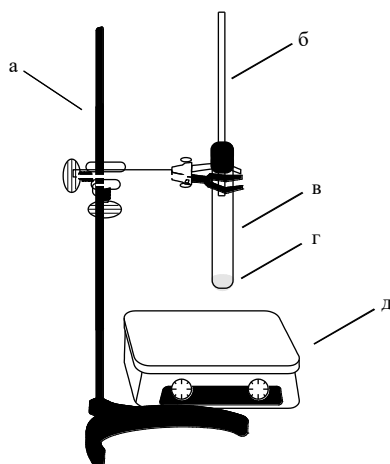
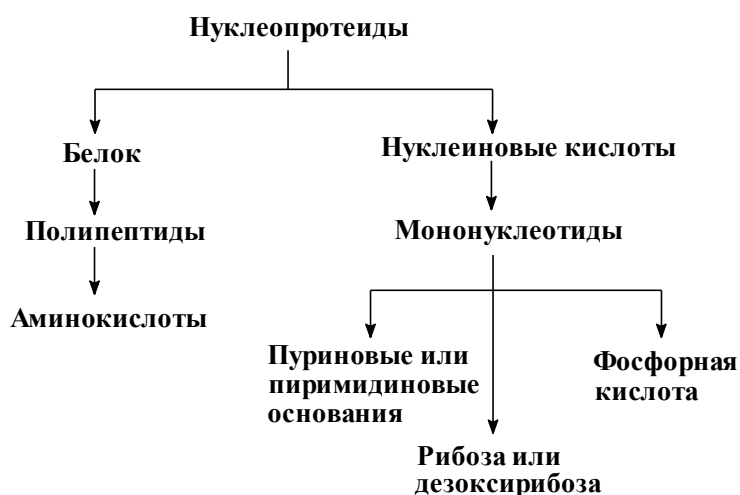


Рис. 4. Установка для гидролиза фосфо- или нуклеопротеидов: а – штатив, б – трубка-холодильник, в – широкая пробирка, г – молоко или иная исследуемая жидкость, д – электрическая плитка

Гидролиз проводят путем нагревания на электрической плитке около часа, считая с момента закипания. После окончания гидролиза жидкость охлаждают и фильтруют через складчатый фильтр. При гидролизе образуются следующие продукты:



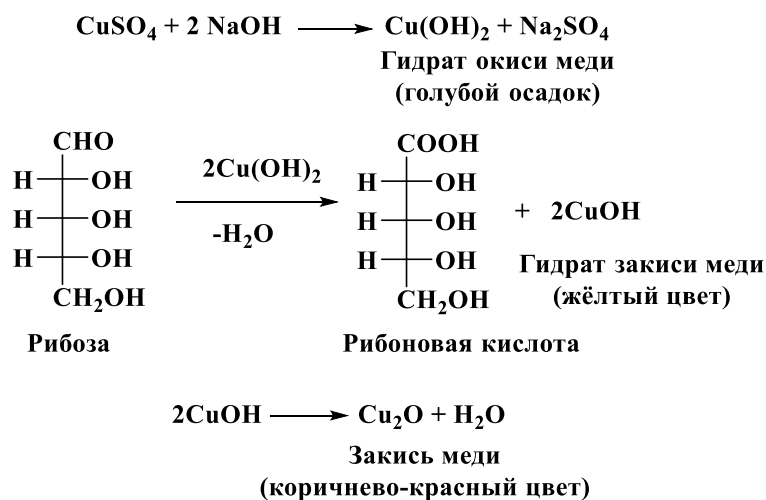
Опыт 1. С фильтратом прodelьывают следующие реакции:

1. **Биуретовая реакция на полипептиды** (см. занятие 1). Для выполнения реакции нужно нейтрализовать кислую среду гидролизата до щелочной.

2. **Проба на пуриновые основания.** К 10 каплям фильтрата добавляют 2–3 капли концентрированного раствора аммиака для нейтрализации и 5 капель 1%-ного раствора нитрата серебра. При стоянии выпадает рыхлый осадок бурого цвета, обусловленный образованием серебряных соединений пуриновых оснований (необходимо соблюдать pH среды).

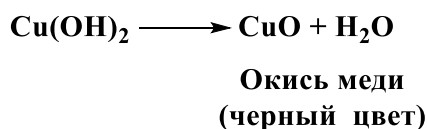
3. **Качественные реакции на углеводы (рибозу или дезоксирибозу),** основанные на способности рибозы и дезоксирибозы, имеющих свободный гликозидный гидроксил восстанавливать медь.

Проба Троммера заключается в восстановлении окисной меди в закисную. Реакция протекает по следующему уравнению:



К 5 каплям гидролизата добавляют 5 капель 30%-ного раствора едкого натра и несколько капель 7%-ного раствора сульфата меди до появления исчезающей мути гидроокиси меди Cu(OH)_2 . При нагревании до кипения выпадает желтый осадок гидрата закиси меди CuOH или красный осадок закиси меди Cu_2O .

Избыток CuSO_4 мешает реакции, так как приводит к образованию большого количества Cu(OH)_2 , который при нагревании распадается с образованием черного осадка окиси меди



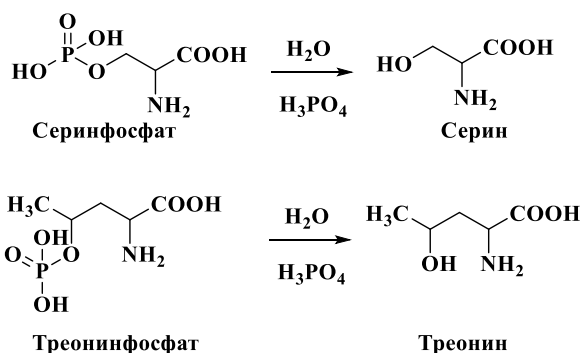
Молибденовая проба на фосфорную кислоту. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель молибденового реактива, представляющего собой раствор молибденовоокислого аммония в азотной кислоте, и кипятят. При охлаждении пробирки под струей холодной водопроводной воды выпадает кристаллический осадок **лимонно-желтого** цвета, обусловленный образованием фосфорномолибденовоокислого аммония



**Фосфорномолибденовокислый
аммоний (лимонно-жёлтый цвет)**

Опыт 2. Гидролиз казеина и открытие в гидролизате фосфорной кислоты

В молоке содержится сложный белок казеин, который относится к фосфорпротеидам. Фосфорпротеиды в качестве небелковой части содержат остаток фосфорной кислоты. Фосфорная кислота связана с белком через гидроксильную группу оксиаминокислот: серина и треонина.



Порядок выполнения опыта. В большую широкогорлую пробирку помещают 4 мл молока, приливают 4 мл 10%-ного раствора NaOH, закрывают пробкой, в которой вставлена трубка длиной 25–30 см, и закрепляют так же, как и при гидролизе нуклеопротеидов дрожжей. Гидролиз проводят при нагревании около получаса, считая с момента закипания, жидкость охлаждают, нейтрализуют концентрированной азотной кислотой до слабокислой реакции на лакмус (12–15 капель). При этом выпадает осадок неполного гидролиза белка. Его отфильтровывают и с фильтратом проделывают молибденовую пробу на фосфорную кислоту (см. предыдущую работу). Выпадает кристаллический осадок **лимонно-желтого** цвета, обусловленный образованием фосфорномолибденовокислого аммония (см. *молибденовую пробу*).

Опыт 3. Выделение казеина из молока

В молоке казеин находится в виде растворимой кальциевой соли. При подкислении молока до pH 4,7 (изоэлектрическая точка) выпадает в осадок казеин (в форме электронейтральных молекул).

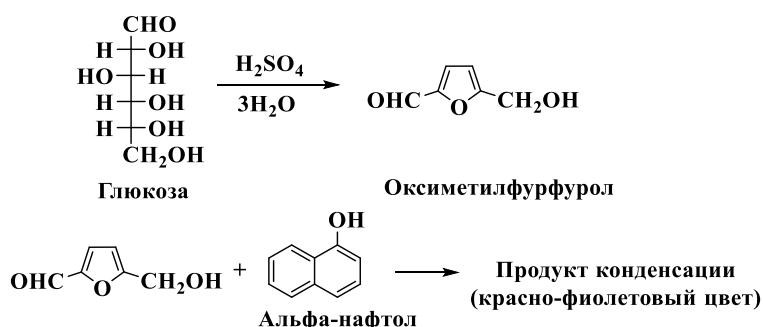
Порядок выполнения опыта. К 2 мл молока добавляют 2 мл дистиллированной воды и 2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты. Образуется осадок казеина, который отфильтровывают, фильтрат отбрасывают, а с осадком казеина проделывают общие цветные реакции на белки.

Опыт 4. Выделение гликопротеида из слюны и нафтоловая проба на углеводный компонент

При гидролизе различные гликопротеиды дают наряду с аминокислотами углеводов.

В пробирку собирают 2 мл слюны и по каплям (4–5 капель) прибавляют концентрированную уксусную кислоту до выпадения в осадок **гликопротеида** (тривиальное название – муцина). Жидкость осторожно сливают, задерживая сгусток муцина стеклянной палочкой. Со сгустком муцина проделывают нафтоловую пробу на его углеводную часть. Реакция обусловлена тем, что при действии концентрированной серной кислоты из глюкозы образуется оксиметилфурфурол, который, конденсируясь с α -нафтолом, образует соединение, имеющее фиолетовое окрашивание.

Порядок выполнения опыта. К сгустку муцина добавляют 1–2 капли 1%-ного спиртового раствора α -нафтола, перемешивают и осторожно по стенке пробирки наслаивают концентрированную серную кислоту (в объеме, равном содержимому пробирки). На границе двух слоев жидкости постепенно появляется окрашенное кольцо, хорошо заметное на белом фоне:



Указания к составлению отчета: результаты реакций записывают в табл. 9.

Таблица 9

Название белков	Название простетической группы	Структура простетической группы	Употребляемые реактивы	Продукты реакции	Окрашивание	Особенности реакции

В выводах приводятся названия сложных белков, структура которых доказана цветными реакциями.

При отчете по теме студент должен ответить на следующие вопросы:

1. Классификация сложных белков. В чем заключается отличие сложных белков от простых?

2. Напишите схему распада нуклеопротеидов.
3. В чем отличие отдельных мононуклеотидов? Каковы продукты их гидролиза?
4. Напишите химические формулы АТФ, ЦТФ, УДФ, АМФ, УМФ.
5. Как соединяются между собой мононуклеотиды в молекуле нуклеиновых кислот?
6. Напишите химические формулы ФАФГФЦФУ, ЦФАФТФГФ.
7. Что такое ДНК и РНК?
8. Какова структурная организация ДНК?
9. Какие виды РНК существуют? Чем они различаются? Каковы их функции?
10. Что такое «фосфопротеиды»? Как связана фосфорная кислота с белковой частью в фосфопротеидах?
11. Что такое «гликопротеиды»? Какие продукты образуются при гидролизе углеводной части гликопротеидов?

Занятие № 5. Ферменты (часть 1)

Ферменты (энзимы) – наиболее важный класс белковых веществ, универсальный по своей биологической функции. Они представляют собой специфичные и высокоэффективные катализаторы химических реакций, протекающих в живой клетке. Обмен веществ был бы невозможен без резкого ускорения реакций, на которых он основан, без согласования во времени и пространстве различных биохимических процессов.

Как известно, катализаторы не создают той или иной реакции, а лишь ускоряют достижение равновесия, увеличивая скорости как прямого, так и обратного превращения. Ферменты, как и любые катализаторы, ускоряют биохимические реакции за счет снижения энергии активации – того энергетического барьера, который отделяет одно состояние системы от другого. Ферменты выступают не только как ускорители, но и как своеобразные организаторы обменных процессов.

Цель работы. Доказать, что свежий картофельный сок и экстракт хрена являются источниками каталазы и пероксидазы и определить условия протекания реакций, катализируемых этими ферментами. Доказать действие альдегидоксидазы молока.

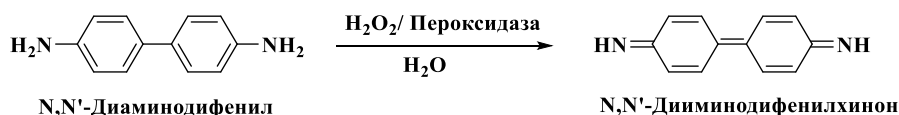
Лабораторная работа № 1.

Свойства ферментов.

Качественные пробы на присутствие ферментов

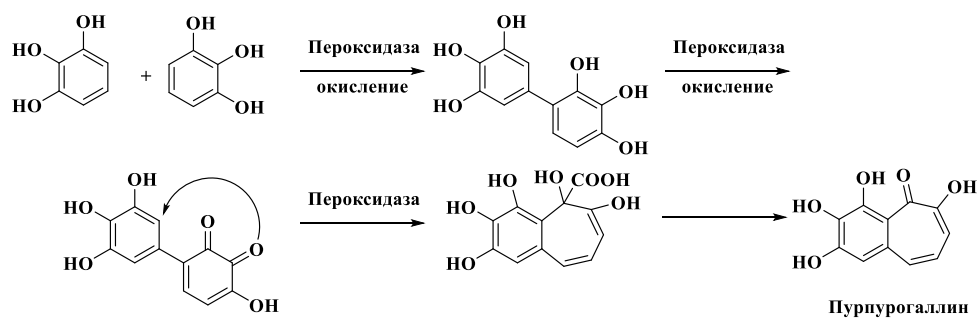
Опыт 1. Открытие пероксидазы в хрене (бензидиновая проба)

Порядок выполнения опыта. К 10 каплям водного экстракта хрена добавляют 5 капель спиртового раствора бензидина (N,N'-диаминодифенила) и затем 2 капли 0,5% раствора перекиси водорода. Возникает **темно-синее** окрашивание вследствие окисления бензидина в N,N'-дииминодифенилхинон.



Опыт 2. Открытие пероксидазы в картофеле

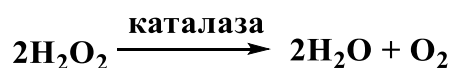
Порядок выполнения опыта. Небольшое количество протертого картофеля переносят в пробирку, добавляют 10–20 капель 1%-ного раствора пирогаллола и 1–2 капли 2%-ного раствора перекиси водорода. При стоянии выпадает **желто-бурый** осадок пурпурогаллина.



Многokратное дегидрирование (окисление) пиpогаллола осуществляется с участием пероксидазы, содержащейся в картофеле.

Опыт 3. Действие каталазы

Каталаза ускоряет реакцию расщепления пероксида водорода на молекулярный кислород и воду:



В этой реакции одна молекула пероксида водорода окисляется и служит донором электронов, а другая восстанавливается и является акцептором электронов.

Порядок выполнения опыта. Для обнаружения каталазы в картофельном соке очищенный от кожуры картофель натереть на терке, затем отжать через марлю, сок собрать в пробирку. Внести 10 капель сока в пробирку с очень слабым раствором H_2O_2 (5 мл воды и 10 капель 3 %-ной пероксида водорода). Пронаблюдать за реакцией в пробирке. То же самое проделать с предварительно прокипяченной порцией сока. Объяснить результаты.

Опыт 4. Открытие альдегидоксидазы в сыром молоке

Альдегидоксидаза накапливается в молоке при размножении в нем микрофлоры. Она обнаруживается по обесцвечиванию метиленового синего, раствор которого прибавляют к молоку. При наличии альдегидоксидазы происходит восстановление метиленового синего до его бесцветной формы. Донором атомов водорода может служить формальдегид.

Порядок выполнения опыта. В три пробирки наливают по 5 мл молока, содержимое одной пробирки кипятят 2–3 минуты и охлаждают. В прокипяченное молоко и в одну из пробирок с некипяченным молоком добавляют 1 мл 0,4%-ного раствора формальдегида, в другую пробирку с некипяченным молоком – 1 мл воды. Затем во все пробирки прибавляют по 1 мл 0,01%-ного раствора метиленового синего, доливают по 0,5 мл вазелинового масла (для предотвращения попадания кислорода воздуха) и ставят на водяную баню при температуре 40°C. Через некоторое время жидкость с некипяченным молоком обесцвечивается вследствие образования восстановленной формы метиленово-

го синего. Если раствор с восстановленным метиленовым синим перемешать на воздухе, то он снова приобретает **синее** окрашивание. Поскольку в первой пробирке фермент инактивирован нагреванием, а во второй пробирке с некипяченым молоком отсутствовал субстрат (формальдегид) – обесцвечивания метиленового синего не наблюдается.

Опыт 5. Влияние рН на действие ферментов. Определение рН оптимума действия амилазы

Ферменты весьма чувствительны к изменению кислотности среды, в которой они действуют. Для каждого фермента имеется определенная концентрация протонов, при которой он наиболее активен. Изменение кислотности среды в ту или иную сторону от оптимума рН вызывает понижение активности фермента.

Одним из амилолитических ферментов является α -амилаза. При гидролизе крахмала α -амилазой образуются декстрины различной молекулярной массы и смесь мальтозы и глюкозы. Мальтоза и глюкоза являются конечными продуктами при полном расщеплении крахмала амилазами. Различают следующие промежуточные продукты расщепления крахмала, дающие разную окраску с йодом:

- *амилодекстрины* (средняя молекулярная масса около 10000) окрашиваются йодом в сине-фиолетовый цвет, осаждаются спиртом;
- *эритродекстрины* (средняя молекулярная масса 4000–6000) окрашиваются йодом в красно-бурый цвет, осаждаются спиртом;
- *ахродекстрины* (средняя молекулярная масса 3700) почти не окрашиваются йодом, растворяются в 70 %-ном спирте;
- *мальтодекстрины* (средняя молекулярная масса около 1000) не окрашиваются йодом, не осаждаются спиртом.

Цель работы. Изучить влияние значения рН на активность ферментов (на примере α -амилазы слюны).

Порядок выполнения опыта. В стаканчиках на 50 мл готовят буферные растворы в соответствии с данными, приведенными в табл. 10. Определяют рН растворов с помощью индикаторной бумаги. Берут 5 пробирок, в каждую приливают по 2 мл буферных растворов, 1 мл 1 %-ного раствора крахмала, 2 мл слюны, разведенной в 20 раз.

Таблица 10

№ пробы	Объем 0,2 М Na_2HPO_4 , мл	Объем 0,1 М лимонной кислоты, мл	рН	Реакция с йодом (окрашивание)
1	5,84	9,15	4,0	
2	10,30	6,96	5,8	
3	15,70	4,78	6,8	
4	18,48	0,92	7,4	
5	19,78	0,28	8,0	

Для получения слюны, разведенной в 10 раз, следует 20 мл воды подержать во рту 2 мин. Затем полученный раствор разбавляют в 2 раза.

Содержимое каждой пробирки перемешивают и оставляют на 10–15 мин. Время ориентировочное. Необходимо контролировать ход гидролиза через каждые 5 мин. Для этого из пробирки с рН 6,8 берут на фарфоровую чашечку 1 каплю жидкости и проводят реакцию с йодом. Опыт лучше прекращать при неполном расщеплении крахмала (красноватая окраска продуктов реакции).

Для прекращения опыта во все пробирки добавляют по 2 капли йода. Отмечают визуально особенности гидролиза крахмала под действием амилазы слюны, и результаты работы заносят в табл.10.

На основании полученной в пробирках окраски судят о степени расщепления крахмала в зависимости от рН. Там, где крахмал расщепляется наиболее полно, значение рН для действия амилазы оптимально.

Вывод. Сделать заключение о влиянии изменения рН на активность ферментов и объяснить полученные результаты.

Опыт 5. Количественное определение активности амилазы слюны в присутствии активатора и парализатора фермента

Регуляция деятельности ферментов осуществляется как в клетке, так и вне ее путем присоединения к молекуле ряда низкомолекулярных веществ. Функцию активаторов часто выполняют ионы металлов и некоторые анионы. Ингибиторами могут быть неорганические соли, метаболиты, гормоны.

Данный метод основан на определении минимального «порогового» количества фермента, которое способно при определенных условиях опыта расщепить 1 мл 0,1%-ного раствора крахмала. Это минимальное количество фермента принимается за единицу амилазной активности. Амилазная активность слюны (А) выражается количеством миллилитров 0,1%-ного раствора крахмала, которое может расщепить 1 мл неразведенной слюны при температуре 38°C в течение 30 мин. Результаты работы по определению амилазной активности фиксируют в форме табл. 11.

Цель работы. Определить «пороговое» количество фермента α -амилазы слюны, необходимое для расщипления крахмала в различных условиях.

Порядок выполнения опыта. Заготавливают 3 ряда из 6 одинаковых пронумерованных пробирок. В каждую пробирку наливают по 1 мл дистиллированной воды. В первую пробирку первого ряда добавляют 1 мл слюны, разведенной 1:10 (для разведения слюны в 10 раз к 1 мл ее добавляют 9 мл дистиллированной воды). Содержимое первой пробирки перемешивают, а затем 1 мл переносят во вторую пробирку. Содержимое второй пробирки перемешивают тем же способом и 1 мл смеси переносят в третью пробирку и т.д. Из шестой

пробирки 1 мл смеси выбрасывают. Таким же образом разводят слюну во втором и третьем рядах. В каждом ряду получают разведение фермента в 20, 40, 80 и более раз.

Во все пробирки первого ряда добавляют по 1 мл дистиллированной воды, в пробирки второго ряда – по 1 мл 0,1%-ного раствора хлористого натрия, в пробирки третьего ряда – по 1 мл 0,1%-ного раствора сульфата меди. Во все пробирки добавляют из бюретки по 2 мл 0,1%-ного раствора крахмала. Содержимое перемешивают и пробирки оставляют при комнатной температуре на 30 мин. По истечении указанного времени пробирки доливают доверху водой, добавляют по 3-4 капли 1%-ного раствора йода и содержимое пробирок перемешивают. Жидкость в пробирках окрашивается в **желтый**, **красный**, **синий** цвета. Желтое окрашивание свидетельствует о полном расщеплении крахмала, красное – о расщеплении крахмала до декстринов. В каждом ряду отмечают наибольшее разведение слюны, при котором произошло полное расщепление крахмала, заполняют табл. 11 и рассчитывают амилазную активность.

Таблица 11

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	Амилазная активность
Разведение слюны	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	
Окраска при добавлении йода, Ряд с водой							
Окраска при добавлении йода, Ряд с NaCl							
Окраска при добавлении йода, Ряд с CuSO ₄							

Пример расчета:

Рассчитывают количество слюны в последней пробирке с желтоватой окраской. Если слюна в ней, например, была разведена в 160 раз, составляют следующую пропорцию:

1/160 слюны расщепила 2 мл 0,1%-ного раствора крахмала

1 мл слюны расщепил X мл 0,1%-ного раствора крахмала

$$X = \frac{2 \text{ мл} \times 1 \text{ мл}}{1/160} = 320 \text{ мл } 0,1\% \text{ р-ра крахмала}$$

$$\text{или } A \frac{38}{30} = 320.$$

По результатам опыта и расчетов делается **вывод** о влиянии на амилазную активность хлорида натрия и сульфата меди.

Опыт 6. Термолабильность ферментов

Свойство ферментов разрушаться при кипячении является характерной особенностью, отличающей ферменты от других катализаторов, и называется «термолабильностью ферментов». После непродолжительного кипячения ферменты теряют способность проявлять каталитическое действие. Потеря каталитической активности при кипячении обусловлена денатурацией ферментов. При низких температурах ферменты хорошо сохраняются. Повышение и понижение температуры сильно изменяют скорость ферментативной реакции.

Цель работы. Показать влияние температуры на активность ферментов.

Порядок выполнения опыта. В две пробирки наливают по 5 капель слюны и по 20 капель дистиллированной воды, получают слюну, разведенную в 5 раз. В одной пробирке раствор слюны кипятят в течение 2–3 мин и охлаждают под струей водопроводной воды, в другой – оставляют без кипячения. В обе пробирки добавляют по 10 капель 0,5%-ного раствора крахмала, жидкость в пробирках перемешивают и оставляют при комнатной температуре. Через 5 мин содержимое каждой пробирки делят на две части. С одной частью проводят реакцию с йодом на крахмал, с другой – пробу Фелинга или Троммера на сахар (мальтозу, глюкозу). В пробирке, где фермент разрушен кипячением, расщепления крахмала не происходит. Результаты работы записывают в форме табл. 12:

Таблица 12

Материал исследования	Субстрат	Контрольные реакции		Чем обусловлена реакция
		на крахмал с J_2	на сахар (реакция Фелинга)	
Свежая слюна	Крахмал			
Прокипяченная слюна	Крахмал			

Выводы по работе должны содержать положения о влиянии температуры на активность фермента.

Опыт 7. Специфичность ферментов

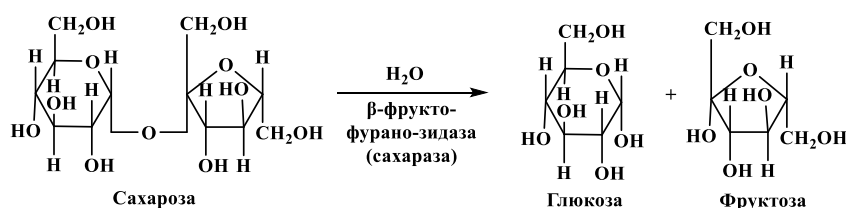
Специфичностью называется способность ферментов ускорять отдельные химические реакции только между строго определенными веществами. Специфичность проявляется в том, что каждый фермент действует только на определенный субстрат. Так, амилаза расщепляет полисахарид крахмал и не действует на дисахариды мальтозу и сахарозу. β -Фруктофуранозидаза (или сахараза) расщепляет только сахарозу и не расщепляет крахмал и другие дисахариды.

Цель работы. Показать специфичность действия ферментов.

Порядок выполнения опыта. В две пробирки наливают по 10 капель 0,5%-ного раствора крахмала и добавляют в первую пробирку 5 капель разведенной в 5 раз слюны (амилаза), во вторую – 5 капель вытяжки из дрожжей, содержащей β -фруктофуранозидазу (фермент сахаразу), перемешивают и оставляют при комнатной температуре (или ставят на водяную баню при температуре 38–40°C). В две другие пробирки наливают по 10 капель 0,5%-ного раствора сахарозы (свекловичного сахара) и в первую пробирку добавляют 5 капель вытяжки из дрожжей, во вторую – 5 капель разведенной в 5 раз слюны и оставляют при тех же условиях. Через 5 мин в первые 2 пробирки с крахмалом добавляют по 1 капле 0,1%-ного раствора йода и отмечают окрашивание. С содержимым двух других пробирок (опыт с сахарозой) проделывают реакции Фелинга или Троммера.

Реакция Фелинга является модификацией **реакции Троммера**, в которой вместо гидроксида меди употребляется алкоголь меди с сегнетовой солью.

К 3 каплям 7%-ного раствора сульфата меди (II) прибавляют 3 капли щелочного раствора сегнетовой соли. К полученному реактиву Феллинга добавляют 5–6 капель содержимого пробирок, жидкость перемешивают и нагревают до начала кипения. В присутствии глюкозы выпадает **желтый** осадок гидроксида меди (I) или **красный** осадок оксида меди (I). Действие ферментов обнаруживается либо по исчезновению субстрата, либо по появлению продуктов расщепления (мальтоза, глюкоза, фруктоза). Следует иметь в виду, что сахароза не имеет свободных полуацетальных гидроксильных групп и реакции восстановления не дает, в то время как продукты ее гидролиза (глюкоза и фруктоза) обладают восстанавливающей способностью.



Результаты работы фиксируют в табл. 13.

Таблица 13

№ опыта	Фермент	Субстрат	Контрольные реакции	
			реакция с J_2 на присутствие исходного субстрата	реакция Фелинга на присутствие продуктов расщепления
1	Амилаза (слюны)	Крахмал		
2	Фруктофуранозидаза (сахараза) дрожжей	Крахмал		
3	Фруктофуранозидаза (сахараза) дрожжей	Сахароза		
4	Амилаза (слюны)	Сахароза		

Выводы по работе должны содержать наблюдения: за активностью амилазы (слюны) по отношению к крахмалу и сахарозе; активностью сахаразы (дрожжей) на крахмал и сахарозу.

Опыт 7. Влияние температуры на скорость ферментативного катализа

Скорость ферментативной реакции увеличивается примерно вдвое с повышением температуры на $\sim 10^\circ\text{C}$. С 50°C начинается денатурация фермента от нагревания. Для большинства ферментов оптимальная температура находится в пределах $40\text{--}45^\circ\text{C}$.

Цель работы. Показать влияние различных температур на скорость ферментативного катализа.

Порядок выполнения опыта. В четыре пробирки наливают по 10 капель 0,5%-ного раствора крахмала и ставят первую пробирку в лед, вторую – в штатив при комнатной температуре $15\text{--}20^\circ\text{C}$, третью – в водяную баню при температуре 45°C и четвертую – при температуре 75°C . В четыре другие пробирки наливают по 2–3 мл дистиллированной воды и по одной капле 0,1%-ного раствора йода. Через 5 мин в пробирки с крахмалом добавляют по 10 капель слюны, разведенной в 10 раз, перемешивают и оставляют стоять при температуре 0, 20, 45 и 75°C . По истечении 5 мин из каждой пробирки отбирают по 1–2 капли жидкости в заготовленные пробирки с йодом. Если во всех пробирках жидкость окрашивается в синий цвет, реакцию повторяют через следующие 5 мин во вновь заготовленных пробирках. Различные окраски при реакции с йодом обусловлены разной скоростью ферментативного катализа при разных температурах. Максимальная скорость наблюдается при температуре 45°C , а минимальная – при 0 и 75°C .

Результаты работы фиксируют в табл. 14.

Таблица 14

	0°C	20°C	45°C	75°C
Окраска исследуемого раствора при реакции с йодом				
Название окрашенного продукта				

Выводы по работе должны содержать данные о наиболее оптимальной температуре для активности фермента.

При отчете по теме студент должен ответить на следующие вопросы:

1. Какие вещества называются ферментами? Какова их химическая природа?
2. Опишите строение ферментов, их активный центр, аллостерический центр.

3. Что такое «специфичность действия ферментов»? Назовите виды специфичности.
4. Каково влияние концентрации субстрата и фермента на скорость ферментативной реакции?
5. Каково влияние температуры и pH среды на активность действия ферментов?
6. Активирование ферментативных реакций.
7. Ингибирование ферментов: а) обратимое (конкурентное и неконкурентное); б) необратимое ингибирование; в) типы ингибиторов.
8. Классификация и номенклатура ферментов.
9. Механизм действия ферментов.
10. Механизм действия НАД, НАДФ.
11. Механизм действия ФАД.
12. Окислительное фосфорилирование АДФ, его связь с тканевым дыханием.
13. Регуляция ферментативной активности.

Занятие № 6. Ферменты (часть 2)

Лабораторная работа № 1.

Определение активности фермента каталазы по Баху и Опарину

Активность фермента каталазы можно определить по количеству оставшегося после действия фермента перексиду водорода. Количество оставшегося пероксида водорода определяют титрованием раствора перманганата калия в кислой среде. Реакция протекает по следующему уравнению:



Порядок выполнения опыта. В две пробирки вносят по 5 мл препарата каталазы (2 г картофеля, порезанного на кусочки, растирают в ступке, настаивают в 100 мл воды в течение 30 мин и фильтруют). В первую пробирку (контрольную) прибавляют 3 мл раствора 10%-ного раствора серной кислоты, 10 мл 0,1%-ного раствора перекиси водорода на фосфатном буфере (35 мл 0,2 М Na_2HPO_4 и 13,6 мл 0,2 М NaH_2PO_4) и ставят на водяную баню при температуре 37°C на 30 мин. Через 30 минут во вторую пробирку вносят 3 мл раствора серной кислоты для предотвращения действия фермента. Содержимое пробирок переносят в две колбы для титрования на 100 мл и титруют 0,002 М раствором KMnO_4 до образования устойчивого розового окрашивания.

В отчете к работе рассчитать активность каталазы Е в 5 мл препарата, которая определяется количеством разложенного пероксида водорода и рассчитывается по следующей формуле:

$$E = \frac{(B-A) \times Q \times C}{T}$$

(B-A) – разность результатов титрования контрольного и исследуемого образцов;

Q – количество пероксида водорода (1,7 мг), соответствующее 1 мл 0,002 М KMnO_4 ;

C – количество пероксида водорода в мкмоль, соответствующее 1 мг (26,5 мкмоль);

T – время действия фермента (30 мин).

Занятие № 7. Углеводы (часть 1)

Значение углеводов для растительных и животных организмов исключительно велико. В животных организмах они выполняют энергетическую функцию и входят в состав многих важных биологически активных структур. В растительных организмах углеводы являются основным энергетическим и главным опорным материалом для клеток и тканей.

Все углеводы по своему строению – это многоатомные спирты, содержащие альдегидную или кетонную группы. При изучении углеводов следует обратить внимание на классификацию, по которой углеводы делятся на три группы в зависимости от числа структурных единиц, входящих в молекулы: моносахариды, олигосахариды и полисахариды. Далее нужно уяснить строение важнейших представителей отдельных групп углеводов и уметь объяснить образование циклических форм моносахаридов, в которых вместо карбонильной группы возникает гликозидный (полуацетальный) гидроксил. В свойствах моносахаридов следует знать оптическую изомерию, окислительно-восстановительные свойства, образование гидразонов и озаонов. В дисахаридах важно понимать, как моносахариды связаны между собой и каким образом расположена гликозидная связь.

Следует обратить особое внимание на полисахариды, которые в зависимости от состава и строения могут быть гомополисахаридами и гетерополисахаридами, а при изучении производных углеводов – на гликозиды и аминосахара.

Изучение обмена углеводов, являющихся основным источником энергии, необходимой организму для его жизнедеятельности, следует начать с процессов переваривания углеводов в органах пищеварения и всасывания. Далее необходимо рассмотреть роль печени в превращении моносахаридов в глюкозу, в синтезе гликогена и процессе ауторегуляции содержания глюкозы в крови, который дополняется нервно-гормональной регуляцией (рис. 5). В печени часть глюкозы используется на образование запасных отложений гликогена. Синтез и распад гликогена катализируется различными ферментами и контролируется независимо друг от друга (рис. 6). Часть глюкозы используется самой печенью для получения энергии, необходимой для протекающих в ней многочисленных реакций. Кроме того, определенное количество глюкозы в печени превращается в жиры.

Нужно знать роль инсулина, секретируемого β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы, являющегося единственным гормоном, обладающим резким сахаропонижающим действием. В настоящее время наиболее вероятной представляется мембранная локализация первичного действия инсулина. Имеются доказательства наличия специфического акцептора инсулина на внешней плазматической мембране жировых клеток и образования инсулин-рецепторного комплекса. Предполагается, что в жировых клетках и частично в клетках печени в передачах инсулиновых сигналов принимают участие аде-

нилатциклаза и ц-АМФ. В мышцах инсулин легко проникает внутрь клетки. Без инсулина мышцы и печень не способны использовать глюкозу.

Кроме инсулина в обмене углеводов принимают участие и некоторые другие гормоны: глюкагон (гормон поджелудочной железы) и адреналин (гормон мозгового слоя надпочечников), которые способствуют активации глюкогенфосфорилазы печени и мышц, вызывая превращение гликогена в глюкозу (*глюкогенез*).

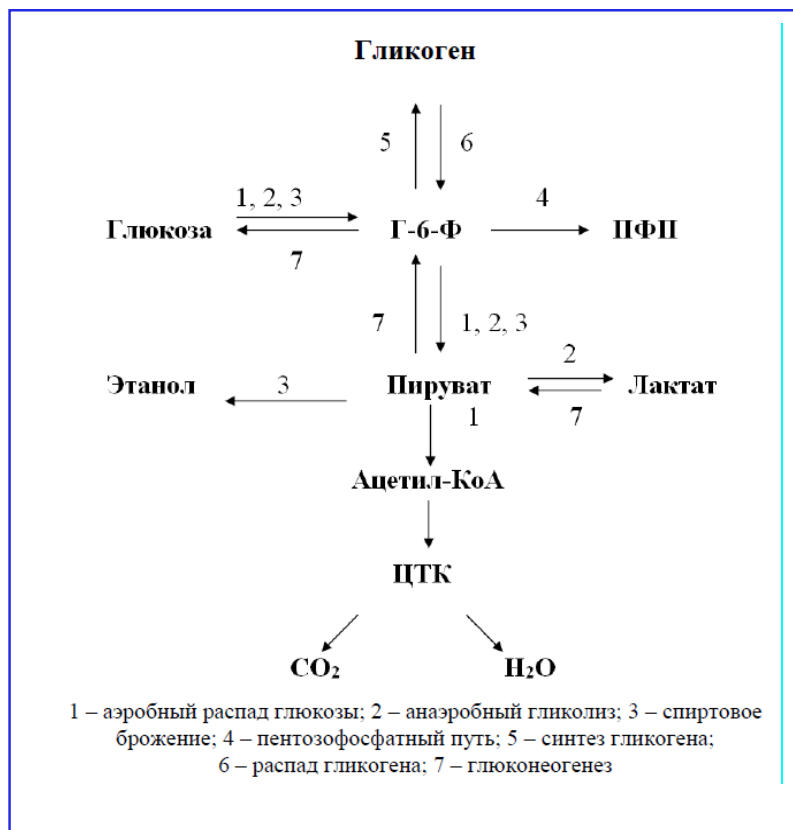


Рис. 5. Общая схема путей метаболизма глюкозы

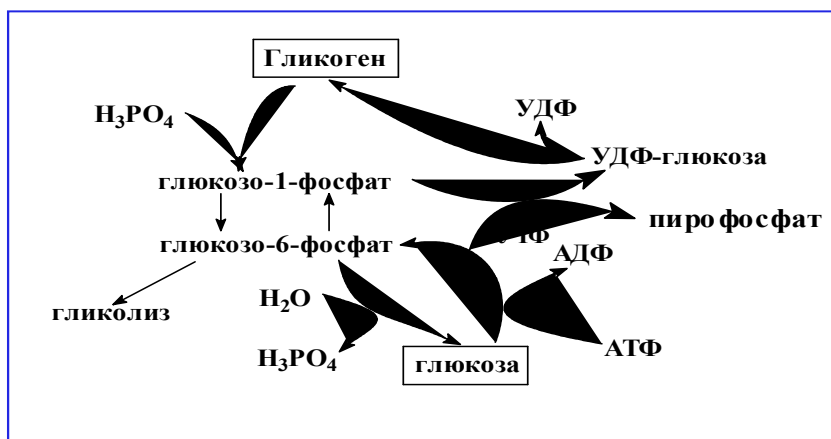


Рис. 6. Общая схема расщепления и синтеза гликогена

Здесь надо обратить внимание на фермент фосфорилазу, которая «переводит» полисахариды из запасной в метаболически активную форму – фосфорный эфир глюкозы. Фосфорилаза существует в двух формах, одна из которых фосфорилаза «а» – активная, а фосфорилаза «в» – неактивная. Обе формы могут диссоциировать на субъединицы. Неактивная форма «в», состоящая из двух субъединиц, фосфорилируется в активную фосфорилазу «а» (содержащую четыре субъединицы) – киназу фосфорилазы.

Действие гликогенфосфорилазы на гликоген приостанавливается в точках ветвления до тех пор, пока не произойдет расщепление α -1,6 гликозидных связей, катализируемое ферментом амило-1,6-гликозидазой. Образующийся под действием фосфорилазы глюкозо-1-фосфат превращается при участии фосфоглюкомутаза в глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф), который далее может превращаться по различным метаболическим путям (рис. 7).

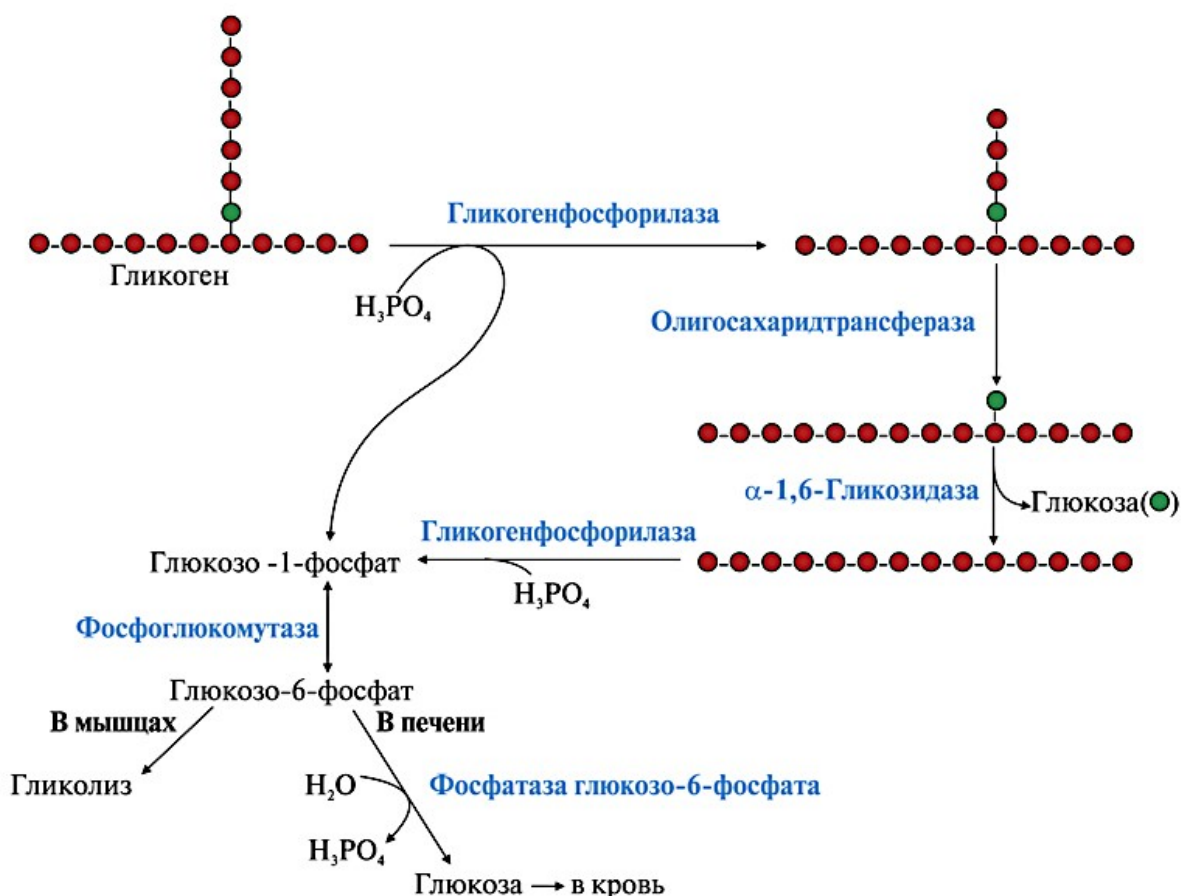


Рис. 7. Метаболические пути гликогена

Наиболее распространенным в животном организме является процесс анаэробного распада углеводов – **гликолиз**, который начинается с глюкозы (рис. 8).

Студент должен знать все последовательные реакции процесса, а также ферменты, катализирующие их и промежуточные продукты, которые образу-

ются на пути превращения глюкозы в молочную кислоту, роль АТФ и фосфорной кислоты в этом процессе. Особенно нужно обратить внимание на сопряженную с фосфорилированием реакцию окисления фосфоглицеринового альдегида под действием глицеральфосфатдегидрогеназы. В результате этой реакции образуются восстановленный НАД и 1,3-фосфоглицериновая кислота, содержащая макроэргическую фосфатную связь, в которой аккумулировалась энергия окисления глицеральдегид-3-фосфата. Богатый энергией фосфорный остаток переносится с 1,3-дифосфоглицериновой кислоты на АДФ, образуя АТФ. Еще одна молекула АТФ образуется при превращении енолфосфопировиноградной кислоты в пировиноградную кислоту. Таким образом, при расщеплении одной молекулы глюкозы в процессе гликолиза образуются четыре молекулы АТФ и две молекулы молочной кислоты. При подведении энергетического баланса нужно учесть, что из четырех молекул АТФ одна расходуется на образование глюкозо-6-фосфата, а другая – образование 1,6-дифосфата.

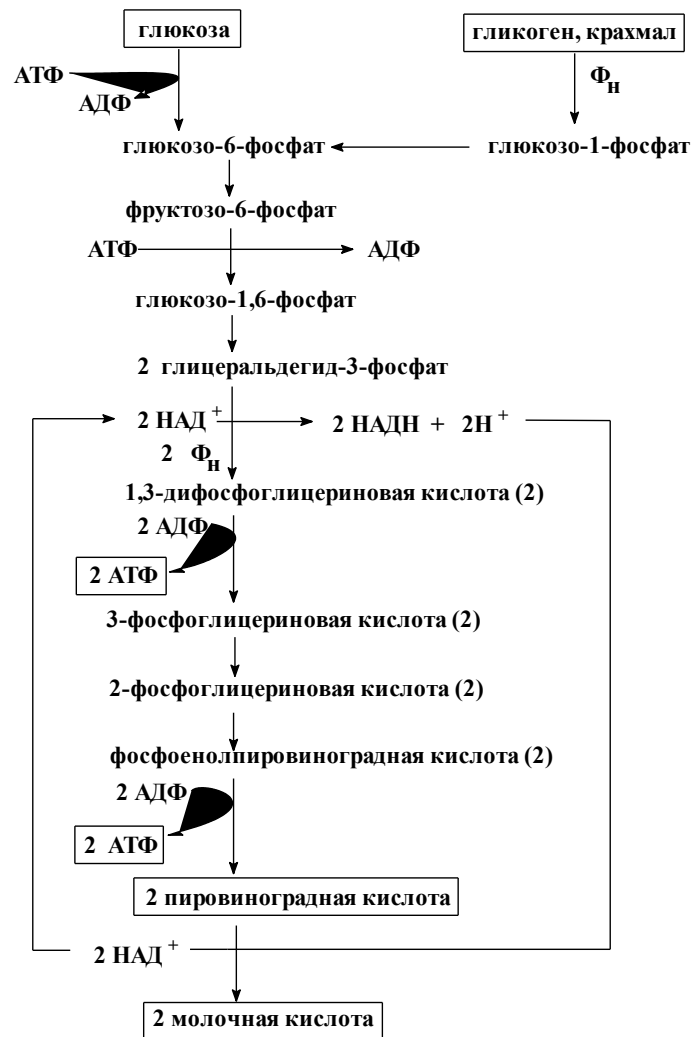


Рис. 8. Схемы гликолиза и гликогенолиза

Процесс спиртового брожения, который имеет место в дрожжевых клетках, сходен с процессом гликолиза в животных тканях. Различие их – только на конечных этапах распада углеводов. При спиртовом брожении происходит декарбоксилирование пировиноградной кислоты с образованием уксусного альдегида, который и служит акцептором водорода с восстановленного НАД. Конечным продуктом спиртового брожения являются этиловый спирт и углекислый газ.

Процесс анаэробного расщепления углеводов может начаться с гликогена (*гликогенолиз*) под действием фермента фосфорилазы (рис. 8), при этом образуется глюкозо-6-фосфат, который включается в гликолиз. Превращение одного глюкозного остатка гликогена в молочную кислоту так же, как при гликолизе, сопровождается синтезом четырех молекул АТФ.

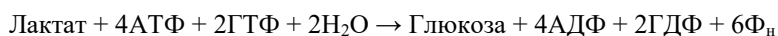
Пировиноградная кислота является промежуточным продуктом гликолиза и гликогенолиза. В условиях достаточного снабжения тканей кислородом (аэробные условия) молочная кислота из нее не образуется, кроме немногих тканей, которые слабо снабжаются кровью (хрусталик и роговица глаза, злокачественные опухоли). Однако в условиях большой физической нагрузки в мышцах истощаются запасы кислорода и накапливается молочная кислота. Некоторая часть молочной кислоты поступает в кровь и переносится в печень, где она снова окисляется в пировиноградную кислоту, которая в процессе *глюконеогенеза* превращается в глюкозу или гликоген.

Глюконеогенезом называется синтез глюкозы и гликогена из соединений неуглеводной природы. Если гликолиз – центральный путь катаболизма углеводов, то глюконеогенез – анаболический процесс, наиболее важный путь биосинтеза моносахаридов и полисахаридов в организме у человека, животных и многих бактерий. У фотосинтезирующих организмов он играет второстепенную роль.

Основными субстратами глюконеогенеза служат молочная кислота, глицерин и аминокислоты: молочная кислота под действием лактатдегидрогеназы превращается в пировиноградную кислоту, а затем в фосфоенолпируват.

При физической нагрузке в мышцах продуцируется большое количество молочной кислоты, особенно если нагрузка интенсивная, максимальной мощности. Также молочная кислота непрерывно образуется эритроцитами, независимо от состояния организма. С током крови она поступает в гепатоцит и здесь превращается в пируват. Далее реакции идут по классической схеме.

Суммарная реакция глюконеогенеза из молочной кислоты:



Ряд аминокислот являются глюкогенными, то есть их углеродные скелеты в той или иной степени способны включаться в состав глюкозы. Такими является большинство аминокислот, кроме лейцина и лизина, атомы углерода которых никогда не участвуют в синтезе углеводов. На схеме в качестве примера синтеза глюкозы из аминокислот приведено участие в этом процессе глутамата, аспартата, серина и аланина (рис. 9).

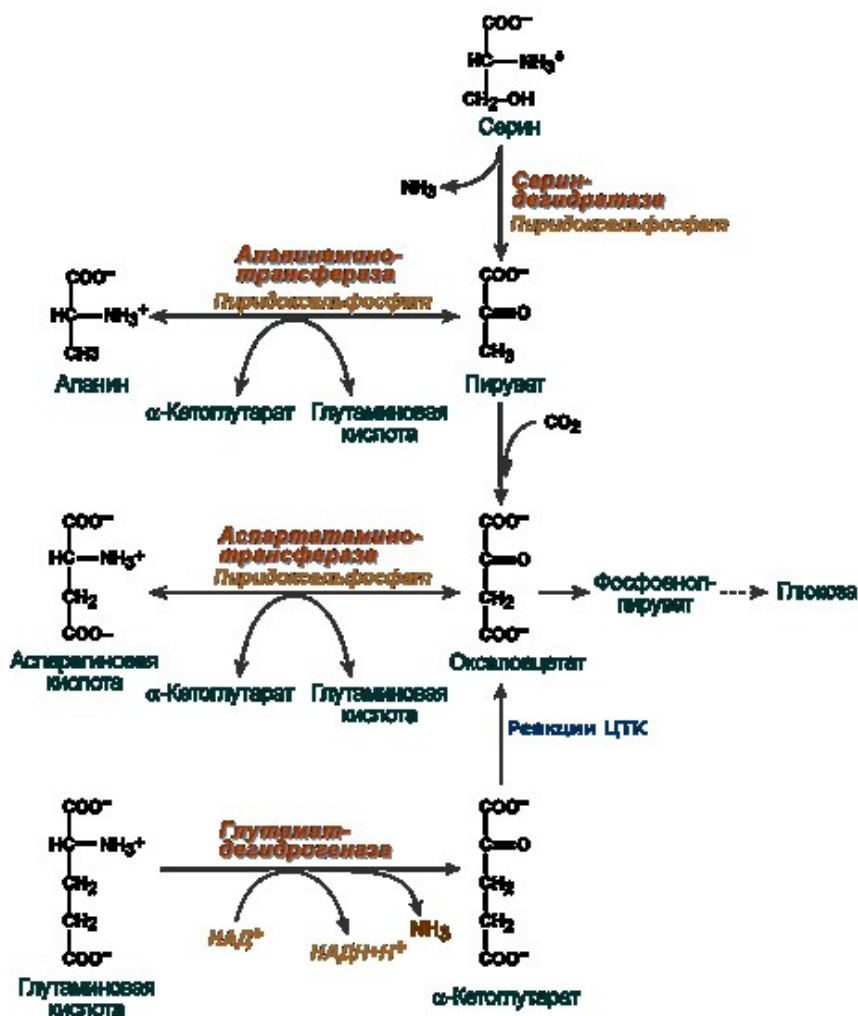


Рис. 9. Синтез глюкозы из аминокислот

При физической нагрузке под влиянием адреналина или при голодании под влиянием глюкагона и кортизола в адипоцитах активно происходит распад триацилглицеролов (**липолиз**). Одним из продуктов этого процесса является спирт глицерин, который поступает в печень. Глицерин, образующийся при расщеплении жира, включается в глюконеогенез путем его фосфорилирования и превращается в фосфо-глицериновый альдегид и фосфодиоксиацетон (рис. 10).

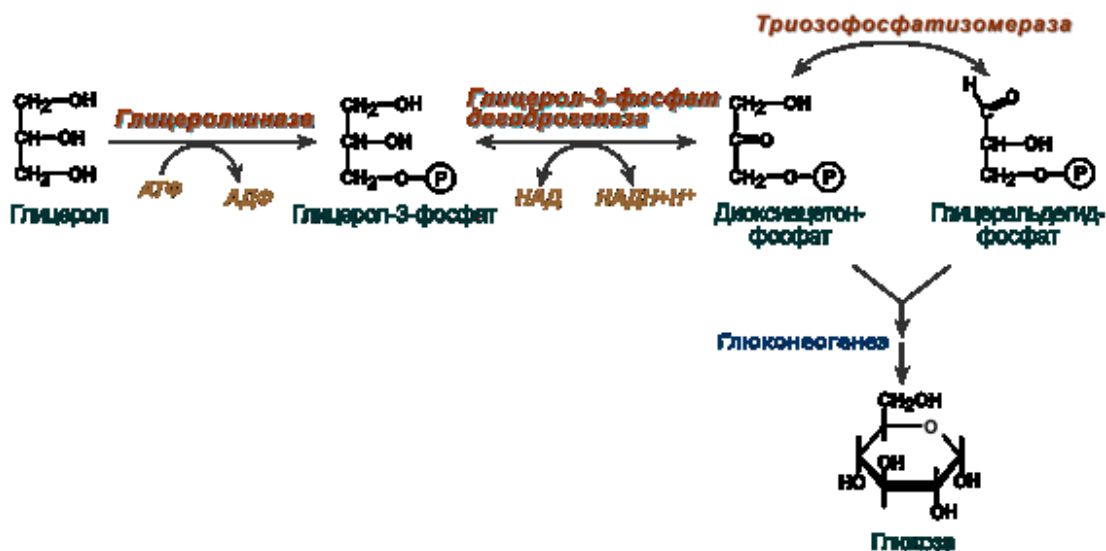


Рис. 10. Синтез глюкозы из глицерина

При рассмотрении процесса глюконеогенеза нужно учитывать, что большинство его стадий представляет собой обращение реакций гликолиза (только три стадии гликолиза, протекающие с выделением значительного количества энергии, необратимы, поэтому глюконеогенез идет в обход этих стадий) (рис. 11).

Для общего составления представления процесса в целом полезно рассмотреть схему (гликолиз происходит в направлении сверху вниз, а глюкогенез – в обратном направлении).

Необходимо обратить внимание на *центральную роль глюкозо-6-фосфата* в обмене углеводов. Он образуется из глюкозы или гликогена и дальнейшие его превращения могут протекать по различным метаболическим путям.

Далее следует перейти к рассмотрению пентозофосфатного пути превращения углеводов (его также называют «пентозным циклом», «фосфоглюконатным путем»), в процессе которого в клетке образуется НАДФН, необходимый для биосинтеза многих веществ, и пентозофосфаты, участвующие в синтезе нуклеиновых кислот и нуклеотидов.

Пентозный цикл имеет две фазы, все реакции протекают в цитоплазме, ядрах, митохондриях. Первая фаза окислительная: глюкозо-6-фосфат окисляется до пентозофосфатов. Вторая фаза неокислительная, представляющая собой взаимопревращения трех-, четырех-, пяти-, шести-, семиуглеродных сахарофосфатов, в результате которых регенерируется глюкоза-6-фосфат. Реакции пентозофосфатного пути являются ключевыми в процессе фотосинтеза, вызывающими образование сахаров.

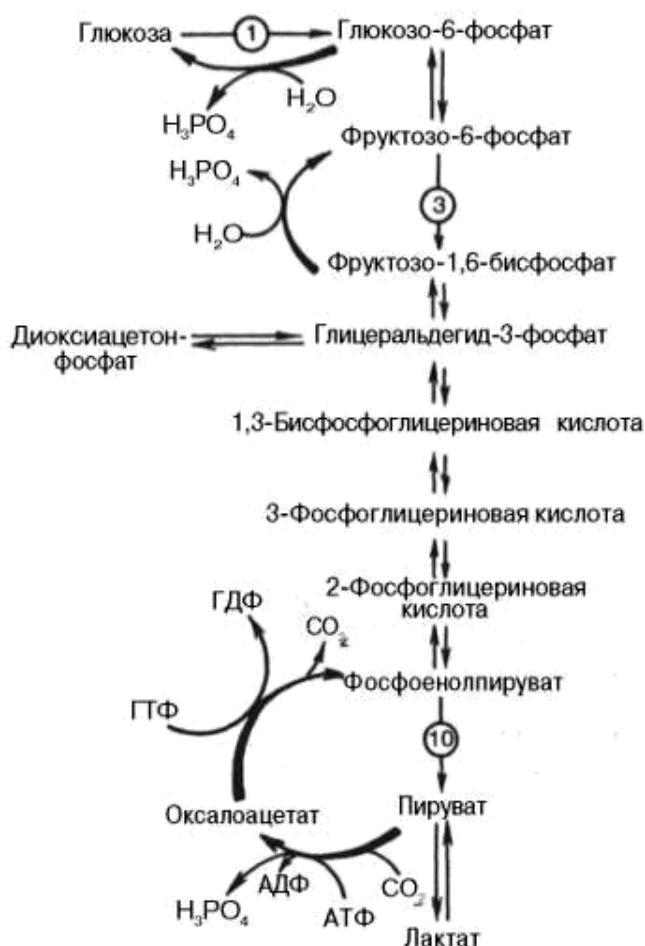


Рис. 11. Схема глюконеогенеза

Пировиноградная кислота – промежуточный продукт гликолиза и обмена некоторых аминокислот, а также глицерина, входящего в состав жиров, которые в аэробных условиях окисляются до углекислого газа и воды.

Пировиноградная кислота связывает гликолиз с циклом трикарбоновых кислот. Пируват переносится из цитозоля в матрикс митохондрий с помощью переносчика по механизму симпорта с протоном. В матриксе митохондрий пируват превращается в ацетил-КоА. Этот процесс называется *окислительное декарбоксилирование пирувата* и катализируется *пируватдегидрогеназным комплексом (пируватдегидрогеназной системой)* (рис. 12). Высокая концентрация пируватдегидрогеназного комплекса обнаружена в сердечной мышце и почках.

Пируватдегидрогеназный комплекс является *классическим мультиферментным комплексом*, в котором промежуточные продукты остаются связанными на поверхности молекулы фермента до образования конечного продукта.

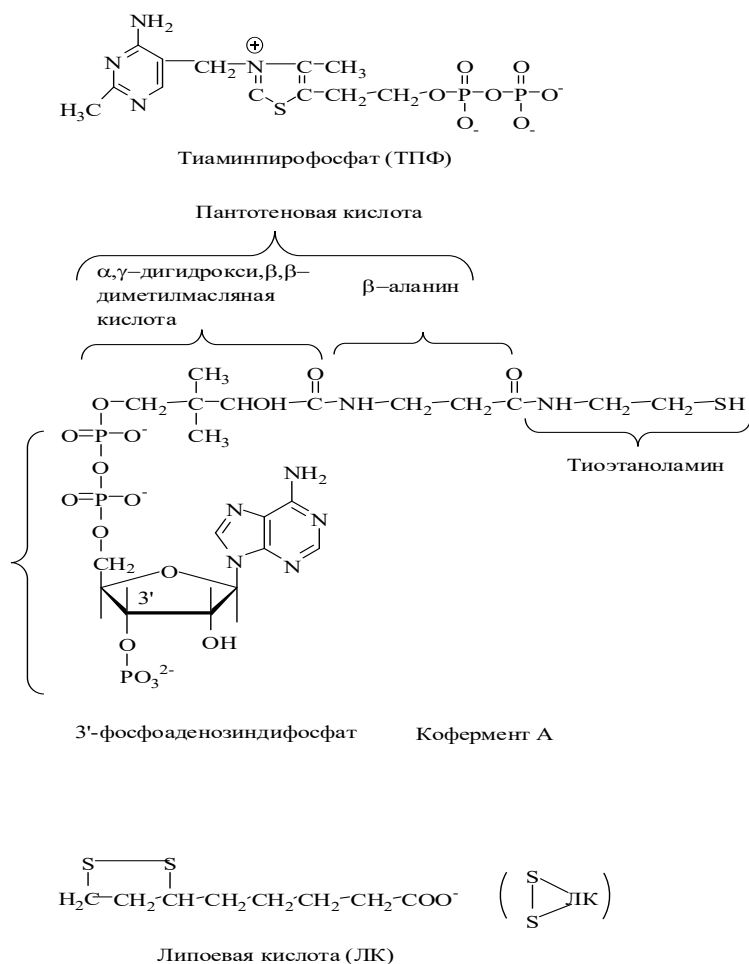


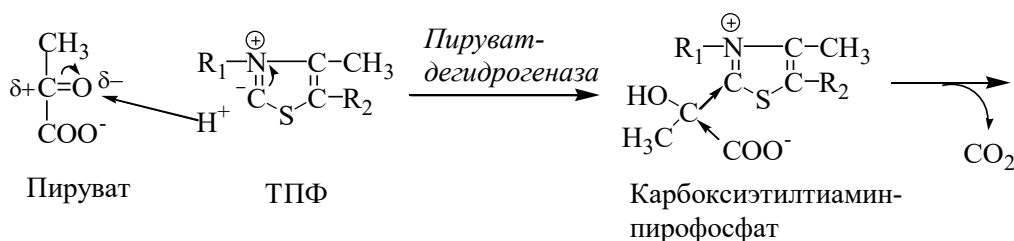
Рис. 12. Состав пируватдегидрогеназного комплекса

В состав пируватдегидрогеназного комплекса входит 3 фермента и 5 кофакторов (рис. 12). Фермент – *пируватдегидрогеназа* содержит кофактор тиаминпирофосфат (производное витамина В₁); Второй фермент – *дигидролипонтрансацетилаза* содержит кофакторы липоевую кислоту (ЛК, 6,8-дитиооктановая кислота) и кофермент А (HS-КоА), причем остаток липоевой кислоты присоединен к апоферменту путем образования амидной связи между карбоксильной группой ЛК и ε-аминогруппой лизина белка (образуется длинная «рука», состоящая из 13 атомов углерода); Третий фермент - *дигидролипиддегидрогеназа* содержит кофакторы ФАД и НАД⁺.

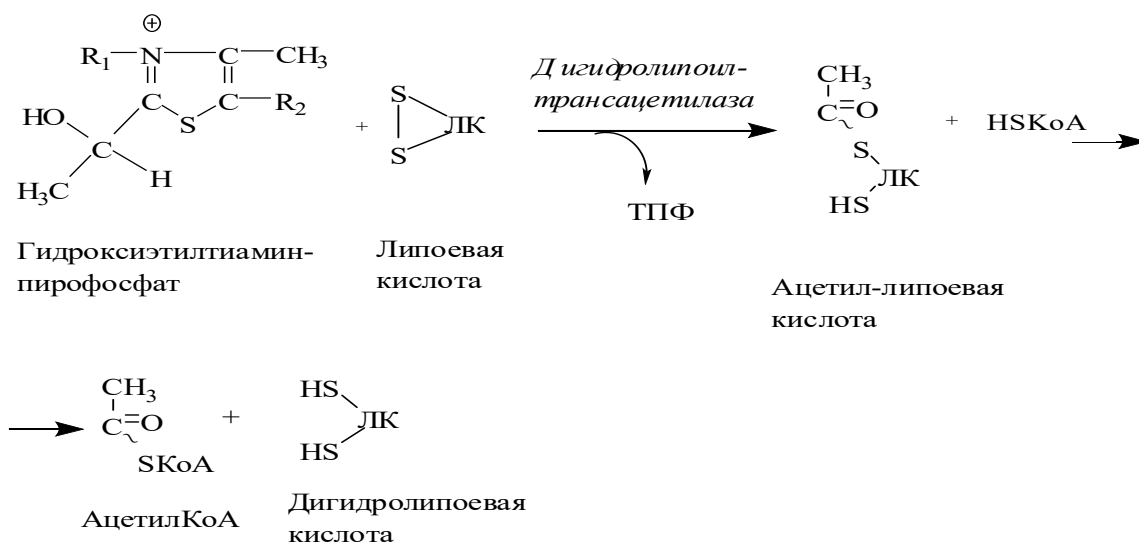
Студенты должны знать, в какой последовательности участвуют ферменты в окислительном декарбоксилировании. **Механизм окислительного декарбоксилирования пирувата** состоит из трех этапов.

I этап. Пируват взаимодействует с кофактором пируватдегидрогеназы тиаминпирофосфатом. Основную роль играет второй углеродный атом тиазольного кольца ТПФ, который легко теряет протон, превращаясь в карбанион. Карбанион атакует частично положительно заряженный α-углеродный атом пирувата с возникновением связи С–С. Сильно электрофильный атом азота в кар-

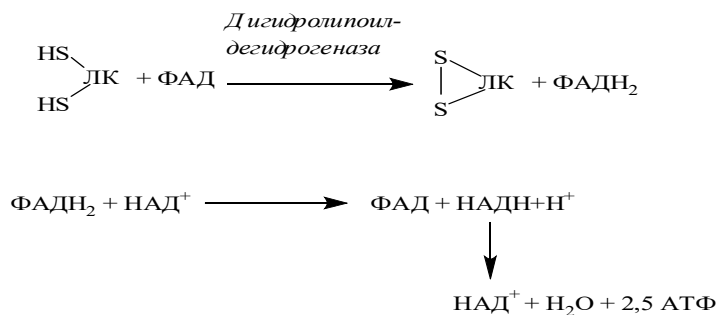
боксииэтил-ТПФ способствует его декарбоксилированию с образованием гидроксиэтил-ТПФ.



II этап. В следующей реакции, катализируемой дигидролипоилтрансацилазой, гидроксиэтил-ТПФ взаимодействует с липоевой кислотой. Происходит перенос гидроксиэтильной группы на один из атомов серы ЛК. При этом гидроксиэтильная группа окисляется в ацетильную. **В процессе окисления гидроксиэтильной группы и восстановления SH-группы ЛК возникает макроэргическая связь.** Затем ацетильный остаток переносится на второй кофермент дигидролипоилтрансацилазы – HS-КоА, а ЛК полностью восстанавливается. Образованный ацетил-КоА отделяется от полиферментного комплекса.



III этап. Восстановленная форма ЛК окисляется дигидролипоилдегидрогеназой.



Студенты должны знать, как проходит **регуляция пируватдегидрогеназного комплекса**. Превращение пирувата в ацетил-КоА – процесс **необратимый**. Поэтому синтез глюкозы из ацетил-КоА невозможен. Обычно ацетил-КоА далее превращается двумя путями: 1) ацетильная группа ацетил-КоА окисляется до CO_2 и H_2O через ЦТК и сопряженные цепи переноса электронов с выделением и запасанием энергии в виде АТФ; 2) используется для синтеза кетоновых тел, холестерина и жирных кислот.

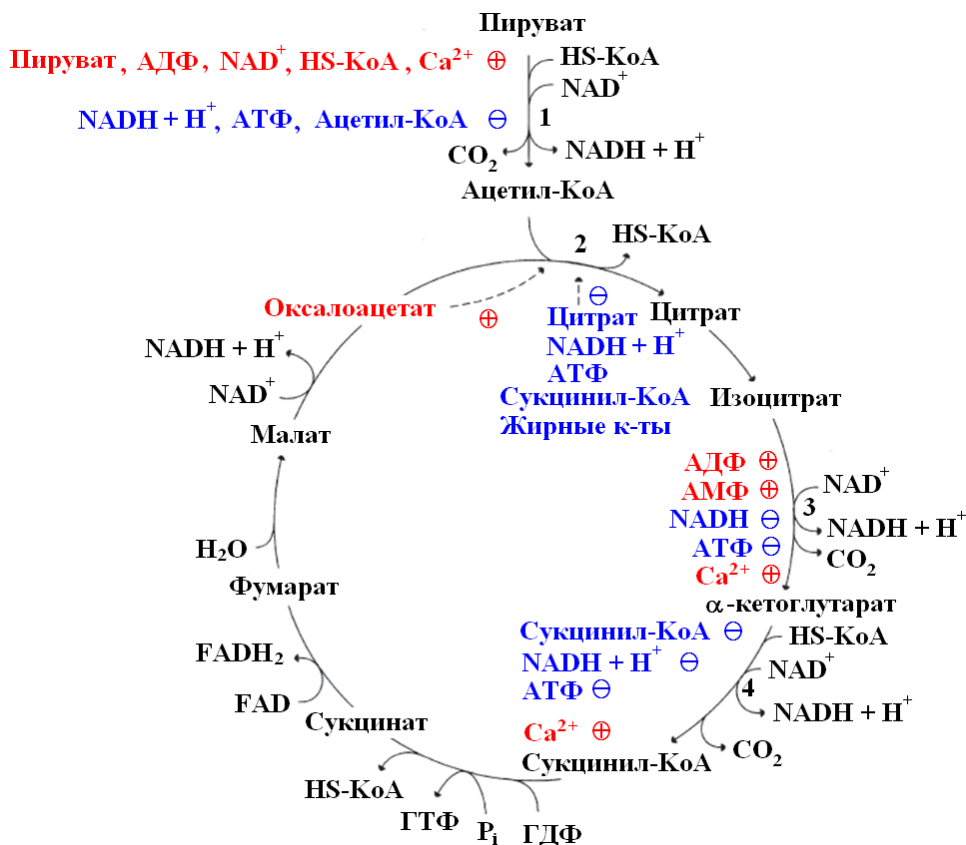


Рис. 13. Схема цикла Кребса

Пируватдегидрогеназный комплекс регулируется методом фосфорилирования-дефосфорилирования. Повышение величин отношений $\text{НАДН}/\text{НАД}^+$, ацетил-КоА/КоА или АТФ/АДФ способствует **фосфорилированию фермента протеинкиназой и деактивации комплекса**. Следовательно, пируватдегидрогеназный комплекс **инактивируется, если клетка богата энергией и биосинтетическими предшественниками**.

Пируват и АДФ, наоборот, **активируют пируватдегидрогеназный комплекс посредством ингибирования протеинкиназы**.

Ацетил-КоА конденсируется с щавелевоуксусной кислотой и вступает в цикл Кребса (цикл трикарбоновых кислот, ЦТК, лимоннокислый цикл) (рис. 13).

При одном обороте цикла происходит полное окисление одной ацетильной группы до углекислого газа и воды. Необходимо разобраться в циклической последовательности превращения одних веществ, образующихся в цикле, в другие, и понять биологическое значение данного цикла как центрального в процессе метаболизма и биоэнергетики. При аэробном распаде глюкозы клетка получает до 38 молекул АТФ, т.е. значительно больше, чем при гликолизе. При этом в высокоэнергетических связях АТФ запасается 1311 кДж свободной энергии, более чем 45% выделившейся энергии (всего 2872 кДж). При этом нужно понять, что при окислительных превращениях освобождается лишь незначительное количество энергии, в виде АТФ она аккумулируется только при окислительном декарбоксилировании α -кетоглутаровой кислоты. Основная масса энергии освобождается при транспорте протонов и электронов от окисляемых субстратов на молекулярный кислород при тканевом дыхании.

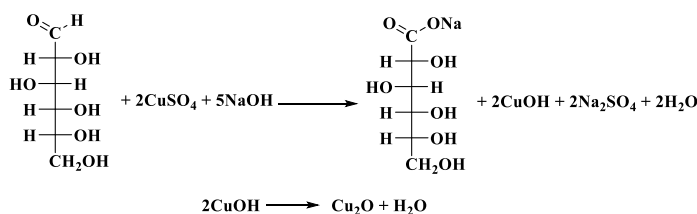
Лабораторная работа № 1. **Качественные реакции на моносахариды**

Благодаря наличию в моносахаридах свободной кетонной или альдегидной групп, они способны окисляться до соответствующих кислот, одновременно восстанавливая соли металлов. Это свойство принято использовать для ряда качественных и количественных определений.

Опыт 1. Качественная реакция на альдозы (реакция Троммера)

Углеводы, молекула которых содержит свободную альдегидную группу, называются «восстанавливающими» или «редуцирующими». Они в щелочной среде способны окисляться и восстанавливать соли меди, серебра, висмута. На этом основан ряд методов качественного определения редуцирующих углеводов. Например, присутствие в растворе восстанавливающих углеводов можно определить *реакцией Троммера*. В щелочном растворе глюкоза и другие восстанавливает гидроксид меди (II) в оксид меди (I). В щелочной среде при добавлении раствора сульфата меди образуется осадок гидроксида меди (II), который в присутствии глюкозы растворяется, окрашивая жидкость в голубой цвет (гидроксид меди I). При нагревании раствор сначала окрашивается в желтый цвет, а затем переходит в красный, так как образуется оксид меди (I). При проведении реакции Троммера необходимо следить, чтобы не было избытка сульфата меди, поэтому он добавляется по каплям до прекращения растворения образующегося гидроксида меди количественно, и избыток гидроксида меди при нагревании теряет воду и переходит в оксид меди (II), выпадающий в виде черного осадка.

Эту реакцию можно представить следующим уравнением:

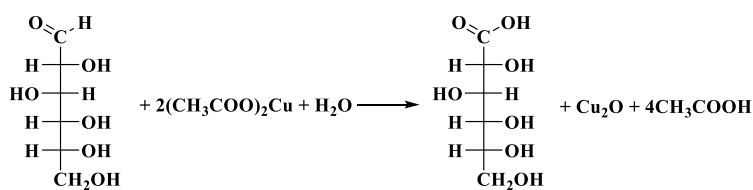


Цель работы. Доказать, что глюкоза – редуцирующий углевод.

Порядок выполнения опыта. К 1 мл 5%-ного раствора глюкозы прибавляют 1 мл 5%-ного раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирки перемешивают и добавляют по каплям 5%-ный раствор сульфата меди (II). Затем пробирку осторожно нагревают, появляется **жёлтое** окрашивание гидроксида меди (I) переходящее в **красное** (оксид меди (I)). При избытке раствора сульфата меди (II) получают **чёрный** осадок оксида меди (II).

Опыт 2. Качественные реакции на альдозы (реакция Барфедда)

Гексозы в реакции с ацетатом меди образуют оксид меди (I). Суммарное уравнение реакции будет иметь следующий вид:

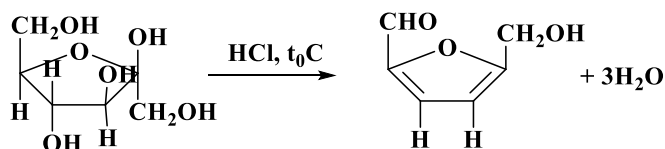


Эта реакция протекает в среде со значением рН близким к нейтральному, что позволяет отличить редуцирующие сахара от моносахаридов.

Порядок выполнения работы. К 1 мл 5%-ного раствора глюкозы прибавляют 1 мл реактива Барфедда. Затем смесь перемешивают и осторожно нагревают над пламенем спиртовки до кипения. Наблюдают за появлением **красного** осадка Cu_2O .

Опыт 3. Качественные реакции на кетозы. Реакция Селиванова

При нагревании фруктозы или других кетоз в присутствии соляной кислоты образуется оксиметилфурфурол:



Оксиметилфурфурол с резорцином образует соединение, окрашенное в вишнево-красный цвет.

Порядок выполнения работы. К 1 мл 5%-ного раствора фруктозы прибавляют несколько капель концентрированной соляной кислоты и 2–3 кристаллика резорцина. Смесь нагревают на водяной бане при температуре 80°C до появления **вишнево-красного** цвета.

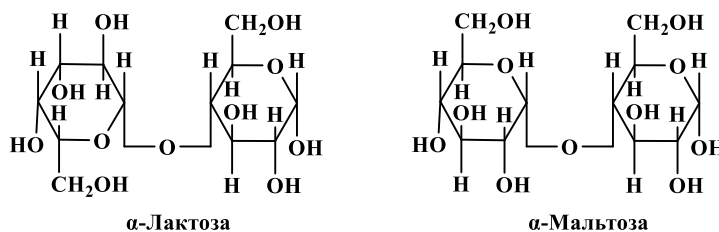
Лабораторная работа № 2. Качественные реакции на дисахариды

Опыт 1. Качественная реакция на лактозу и мальтозу с аммиаком

Дисахариды лактоза и мальтоза с аммиаком в щелочной среде при нагревании образуют окрашенные соединения (лактоза – соединения **коричневого** цвета, мальтоза – **красного** цвета).

Порядок выполнения опыта. В две пробирки помещают по 1 мл 5%-ного раствора лактозы и 5%-ного раствора мальтозы соответственно. В каждую пробирку добавляют по 0,5 мл раствора аммиака и 1 каплю 30%-ного раствора КОН и ставят на водяную баню при 60°C на 30 минут. Отметить цвет раствора в пробирках.

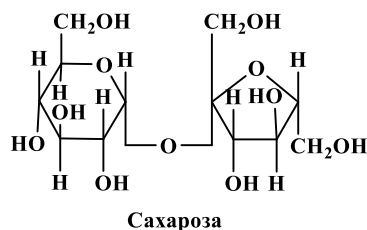
Опыт 2. Восстанавливающая способность лактозы и мальтозы



Благодаря наличию свободной альдегидной группы в молекуле лактозы (в остатке глюкозы) и мальтозы (у второго остатка глюкозы), эти дисахариды обладают восстановительными свойствами, в частности, они дают реакцию Троммера.

Порядок выполнения опыта. В одну пробирку наливают 2 мл 5%-ного раствора лактозы, в другую – 2 мл 5%-ного раствора мальтозы и в каждую из пробирок добавляют несколько капель 5%-ного раствора сернокислой меди и несколько капель 5%-ного раствора гидроксида натрия. Отмечают изменения цвета осадка.

Опыт 3. Определение восстанавливающей способности сахарозы и ее гидролиз



В молекуле сахарозы связь между остатками глюкозы и фруктозы образуется за счет двух гликозидных гидроксильных групп, поэтому она не дает отрицательную

реакцию Троммера. Однако после гидролиза сахарозы образуются моносахариды, которые дают положительную пробу Троммера.

Порядок выполнения опыта. В две пробирки наливают по 6 мл 5%-ного раствора сахарозы. В первую пробирку добавляют 2 капли концентрированной соляной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Вторая пробирка содержит контрольный раствор сахарозы. После гидролиза из первой пробирки отбирают 3 мл раствора и нейтрализуют его, добавляя по каплям 5%-ный раствор гидроксида натрия (проверяют по лакмусовой бумажке). С содержимым обеих пробирок проводят реакцию Троммера и делают выводы.

Опыт 4. Реакция Барфедда

Реакция протекает в среде, близкой к нейтральной. В этих условиях восстанавливающие дисахариды практически не окисляются, что позволяет отличить их от моносахаридов. При взаимодействии моносахаридов с реактивом Барфедда (13,3 г ацетата меди растворяют в 200 мл горячей воды, смесь фильтруют и к фильтрату добавляют 1,9 мл ледяной уксусной кислоты) образуется осадок красно-бурого цвета.

Порядок выполнения опыта. К 5 каплям 5%-ного раствора глюкозы добавляют 5 капель реактива Барфедда. Смесь перемешивают, нагревают до кипения и наблюдают за изменением цвета.

Лабораторная работа № 3.

Качественные реакции на полисахариды

Опыт 1. Качественная реакция на крахмал

При взаимодействии крахмала с йодом образуется комплексное соединение, окрашенное в **синий** цвет. При нагревании окраска исчезает и появляется вновь при охлаждении. Качественная реакция на крахмал основана на том, что молекулы йода, попадая в спирали амилозы (линейная фракция крахмала), испытывают сильное влияние со стороны окружающих ОН-групп, что приводит к увеличению длины связи I—I. Образуются клатраты – комплексные соединения, в которых молекулы-«гости» внедряются в кристаллическую структуру молекул-«хозяев» (молекулы йода располагаются в канале спирали амилозы).

Порядок выполнения опыта. К 10 каплям 1%-ного раствора крахмала добавляют 2 капли 1%-ного раствора йода, наблюдают **синее** окрашивание.

Опыт 2. Гидролиз клетчатки

Клетчатка является достаточно устойчивым соединением. Она не растворима в воде и в подавляющем большинстве растворителей. Устойчивость клет-

чатки объясняется тем, что ее длинные нитевидные молекулы, взаимодействуя друг с другом, образуют прочные мицеллы, которые собраны в фибриллы, располагающиеся вдоль оси волокна. Отрыв индивидуальных молекул клетчатки от этих устойчивых агрегатов затруднен, и только немногие вещества способны нарушать межмолекулярные связи в мицеллах и растворять клетчатку.

Цель работы. Провести гидролиз клетчатки. Доказать наличие свободной глюкозы.

Порядок выполнения опыта. Небольшой кусочек ваты делят на три части. Первая часть не подвергается предварительной обработке, проводят реакцию Фелинга. Вторую заливают 3%-ным раствором серной кислоты и кипятят на водяной бане. Через 10 мин после нейтрализации с содержимым пробирки проводят реакцию Фелинга. Третью часть ваты обрабатывают небольшим количеством 85%-ного раствора серной кислоты до полного ее растворения затем разбавляют 1 мл воды и кипятят на водяной бане в течение 5 минут. После нейтрализации с содержимым пробирки также проводят реакцию Фелинга.

В пробирках, где находилась не обработанная серной кислотой вата, наблюдается отсутствие красного осадка (отрицательная реакция Фелинга). В пробирках, содержащих предварительно обработанную вату, наблюдается **красный** осадок оксида меди (I), что свидетельствует об образовании глюкозы.

Лабораторная работа № 4. **Определение глюкозы и билирубина в моче**

Опыт 1. Полуколичественное определение глюкозы в моче

Порядок выполнения опыта. На предметное стекло в вытяжном шкафу насыпают немного смеси CuSO_4 и Na_2CO_3 (смесь готовится заранее из 1 г сульфата меди (II) и 10 г карбоната натрия) и наносят несколько капель мочи. Нагревают до кипения. **Синий** цвет означает, что глюкозы нет; **желто-зеленый** – глюкозы не более 0,5%; **зеленый** – не более 1%; **коричнево-красный** – до 2%; **красный** – свыше 2%.

Опыт 2. Проба Розина

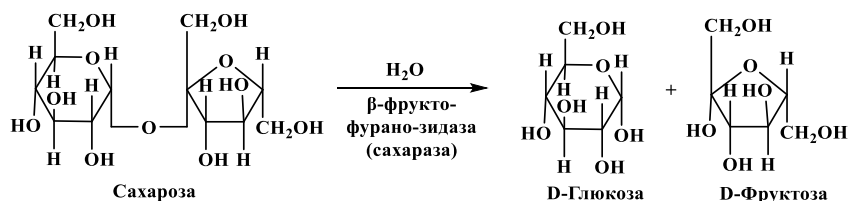
Метод основан на способности билирубина под действием окислителей превращаться в биливердин зеленого цвета.

Порядок выполнения опыта. На 3–4 мл мочи в пробирке осторожно наслаивают 1–2 мл 1%-ного спиртового раствора йода. При наличии желчных пигментов на границе жидкостей появляется **зеленое** кольцо.

Занятие № 7. Углеводы (часть 2)

Лабораторная работа № 1. Биохимический анализ тканей яблока

В яблоках содержатся сахароза, глюкоза, фруктоза и витамин С. Все эти компоненты могут быть количественно определены при анализе тканей яблока.



Для того чтобы определить сахарозу (дисахарид), необходимо предварительно ее гидролизовать до моносахаридов глюкозы и фруктозы по следующей схеме:

Порядок выполнения опыта. Берут навеску в 25 г, прибавляют 150 мл дистиллированной воды (нагретой) и экстрагируют на водяной бане при 60–70°C в течение 1 ч. Температура бани не доводится до 100°C для того, чтобы избежать гидролиза имеющейся в яблоках сахарозы, который может идти под влиянием кислот, содержащихся в плодах (схему см. выше).

По истечении часа вытяжку охлаждают и отфильтровывают через складчатый фильтр (для быстроты фильтрования рекомендуется брать пористую бумагу) в мерную колбу на 250 мл. Остаток на фильтре несколько раз промывают горячей водой (предварительно нагретой на плитке). Охлажденную до комнатной температуры жидкость с промывными водами взбалтывают и доводят в колбе до метки.

Опыт 1. Определение сахаров методом Макена–Шоорля

Метод, разработанный Макеном и Шоорлем, основан на использовании реактива Фелинга с точно известным содержанием меди. Вычисляют количество восстановленной меди по остатку неизрасходованной меди (II), определяемой йодометрически.

Порядок выполнения опыта. В коническую колбу на 250 мл отмеряют пипеткой 10 мл раствора I (сульфат меди) и 10 мл раствора II (сегнетова соль + едкий натр, раствор Фелинга) и добавляют раствор сахара (вытяжку 10 мл). Смесь разбавляют водой до 50 мл. Этот раствор нагревают на плитке до кипения и затем кипятят ровно 2 мин. Затем колбу охлаждают под краном до комнатной температуры, добавляют 3 г йодида калия, растворенного в 10 мл воды, и 10 мл 25%-ной серной кислоты и титруют 0,1 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до перехода от коричневой окраски в желтую. Затем в колбу добавляют 5 мл крахмала и медленно дотитровывают до исчезновения синей окраски в кремовый цвет (йодид ме-

ди (I)). Без добавления вытяжки проводят контрольный опыт. Из объема тиосульфата контрольного опыта вычитают объем тиосульфата в основном опыте и по этому количеству находят по табл. 15 содержание сахара.

В правой половине каждой колонки табл. 15 приведена разность количеств сахара при увеличении объема, израсходованного на титрование раствора тиосульфата натрия на 1мл. Если на титрование израсходовано дробное число миллилитров, то к количеству миллиграммов сахара, соответствующего целому числу миллилитров, прибавляют долю этой разности. Например, на титрование глюкозы израсходовано 3,5 мл тиосульфата. В этом случае количество глюкозы равно $9,4 \text{ мг} + (3,2 : 2) = 11 \text{ мг}$.

Таблица 15

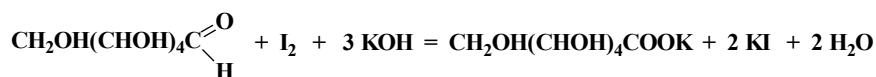
Определения сахаров при помощи раствора Фелинга

Na ₂ S ₂ O ₃ , 0,1н. мл	Медь мг	Глюкоза, мг	Фруктоза, мг
1	6,4	3,2 / 3,1	3,2 / 3,2
2	12,7	6,3 / 3,1	6,4 / 3,3
3	19,1	9,4 / 3,2	9,7 / 3,3
4	25,4	12,6 / 3,3	13,0 / 3,4
5	31,8	15,9 / 3,3	16,4 / 3,6
6	38,12	19,2 / 3,2	20,0 / 3,7
7	44,5	22,4 / 3,2	23,7 / 3,7
8	50,9	25,6 / 3,3	27,4 / 3,7
9	57,3	28,9 / 3,4	31,8 / 3,8
10	63,6	32,3 / 3,4	34,9 / 3,8
11	70,0	35,7 / 3,3	38,7 / 3,7
12	76,3	39,0 / 3,4	42,4 / 3,8
13	82,7	42,4 / 3,4	46,2 / 3,8
14	89,1	45,8 / 3,5	50,0 / 3,7
15	95,4	49,3 / 3,5	53,7 / 3,8
16	101,8	52,8 / 3,5	57,5 / 3,7
17	108,1	56,3 / 3,5	61,2 / 3,8
18	114,4	59,8 / 3,5	60,0 / 3,7
19	120,8	63,3 / 3,6	68,7 / 3,7
20	127,2	66,9 / 3,8	72,4 / 3,8
21	133,5	70,7 / 3,8	76,2 / 3,9
22	139,8	74,5 / 4,0	80,1 / 3,9
23	146,2	78,3 / 4,1	84,0 / 3,8

Опыт 2. Определение глюкозы (в присутствии фруктозы) по Вильметтеру.

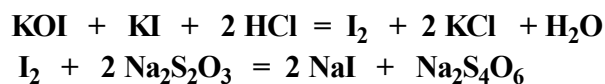
Метод основан на способности йода в щелочной среде окислять только альдегидоспирты, не влияя на кетонспирты.

Реакция идет согласно суммарному уравнению:



Если внести избышек I_2 , то непрореагировавший остаток можно определить в кислой среде титрованием $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Это уравнение состоит из двух реакций:



Порядок выполнения опыта. В две колбы **А** и **Б** вносят по 20 мл 0,1 н раствора I_2 ; в колбу **А** (проба) добавляют 10 мл вытяжки (до гидролиза); в колбу **Б** (контроль) прибавляют 10 мл дистиллированной воды; в обе колбы по каплям прибавляют по 10 мл 0,5 н раствора KOH , все время помешивая; оставляют на 15 мин. Через 15 мин в обе колбы добавляют по 10 мл 10%-ного раствора H_2SO_4 и титруют 0,1 н раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до слабо-желтой окраски, добавляют 2–3 капли раствора крахмала и титруют до обесцвечивания фиолетовой окраски.

1 мл 0,1 н раствора $\text{I}_2(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ соответствует 9,0 мг глюкозы.

Количество глюкозы во взятой смеси равняется

$$C = (B - A) K \cdot 9,0,$$

где **В** – количество 0,1 н раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, затраченное на титрование контроля;

А – количество 0,1 н раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, затраченное на титрование пробы;

К – коэффициент поправки на 0,1 н раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Опыт 3. Определение общей кислотности

Для определения общей кислотности вытяжки берут 25 мл вытяжки (до гидролиза) и оттитровывают при индикаторе фенолфталеин 0,1 н раствором NaOH до **слабо-розовой** окраски. Обычно кислотность выражается в миллилитрах 0,1 н раствора NaOH , пошедшего на титрование кислот, содержащихся в навеске.

Опыт 4. Определение витамина С

Витамин **С** определяется с 2,6-дихлорфенолиндофенолом. Для определения в коническую колбу отмеривают пипеткой 10 мл вытяжки (до гидролиза) и оттитровывают 0,001 н раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола до слабо-розового окрашивания, удерживающегося в течение полминуты. Количество витамина **С** вычисляют, учитывая, что 1 мл 0,001 н раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты (М экв. к-ты = 176, грамм- эквивалент = 88 г), а разведение и количество исходного вещества

$$C = \frac{X \cdot 0,088 \cdot 250 \cdot 100\%}{10 \cdot 25.000}, \text{ где}$$

C – количество витамина С;

X – количество мл 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия;

250 – общее количество водной вытяжки; 10 – аликвота;

25.000 – навеска яблока, (мг).

При отчете по теме студент должен ответить на следующие вопросы:

1. Напишите проекционные формулы Хеуорса для α - и β -форм галактозы. В чем состоит основное различие между этими формами?
2. Напишите формулу дисахарида лактозы в двух аномерных формах α и β .
3. Почему не обнаружены аномерные формы сахарозы? Напишите формулу сахарозы.
4. В чем различие в строении гликогена и целлюлозы?
5. Какова формула нейраминовой кислоты?
6. Что такое «гликозиды»? Каковы формулы амигдалина, гликованилина, синигрина?
7. К какому классу соединений относятся хитин, пектиновые вещества, гемицеллюлоза? Какие структурные единицы и связи содержат эти соединения?
8. Укажите нахождение, состав, рассмотрите строение гиалуроновой кислоты, гепарина.
9. Напишите формулы хондриотинсульфата А, хондриотинсульфата В.
10. Каким путем происходит превращение углеводов в органах пищеварения? Как расщепляются олиго- и полисахариды? Опишите действие ферментов.
11. Каким путем всасываются моносахариды?
12. Как происходит взаимопревращение моносахаридов?
13. Рассмотрите биосинтез гликогена, укажите, какова роль уридиндифосфата (УДФ) в биосинтезе гликогена.
14. Какова роль полипренилфосфатов в биосинтезе полисахарида?
15. Как происходит регуляция постоянства содержания глюкозы в крови? Какова роль печени в регуляции сахара?
16. Гормональный механизм регуляции глюкозы в крови. Какова роль центральной нервной системы?
17. Анаэробное превращение углеводов.
18. Гликолиз и гликогенолиз. Механизм. Энергетическое значение.

19. Гликонеогенез – общий путь биосинтеза моносахаридов и полисахаридов у человека и животных. Запишите уравнения реакций гликонеогенеза.
20. Спиртовое брожение. Механизм. Его отличие от процессов гликолиза.
21. Пентозный цикл и его роль.
22. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты (аэробное превращение).
23. Цикл Кребса – центральный путь метаболизма. Химизм.
24. Энергетическая роль цикла Кребса.

Занятие № 8. Липиды

Липиды наряду с углеводами и белками являются основными компонентами клетки. Функции, выполняемые липидами в организме, разнообразны: они являются структурными компонентами биологических мембран. Липиды – это также энергетический материал для организма: они служат формой, в которой депонируются запасы метаболического топлива, выполняют защитную функцию.

Липиды представляют собой нерастворимые в воде маслянистые или жирные вещества, которые могут быть экстрагированы из клеток неполярными органическими растворителями (эфиром, хлороформом, бензолом, четыреххлористым углеродом).

При изучении темы «Липиды» следует обратить внимание на то, что в отличие от других классов биомолекул – белков и углеводов, липиды неоднородны в химическом отношении. Липиды классифицируют в соответствии с их химическим строением (см. схему классификации липидов).

Студент должен знать химические и биологические свойства важнейших представителей всех классов липидов. Обмен липидов включает следующие основные процессы: переваривание и всасывание липидов, окисление глицерина и жирных кислот, образование ацетоновых (кетонных) тел, биосинтез липидов. При рассмотрении вопроса о пищеварении и всасывании липидов следует помнить, что основная их масса в пище представлена жирами (триацилглицеринами), меньшая – фосфолипидами и стероидами. В переваривании и всасывании липидов очень важную роль играют гидролитические ферменты (липазы, эстеразы, холестеразы) и желчные кислоты. Нужно знать, какие продукты получаются при гидролизе липидов, какие ферменты действуют на определенных стадиях гидролиза, какова роль желчных кислот.

Окисление глицерина (глицерола) и жирных кислот в тканях

Глицерин (глицерол), образующийся при гидролизе липидов, активируется АТФ и затем может участвовать в глюконеогенезе и включаться в гликолитический путь расщепления (рис. 14):

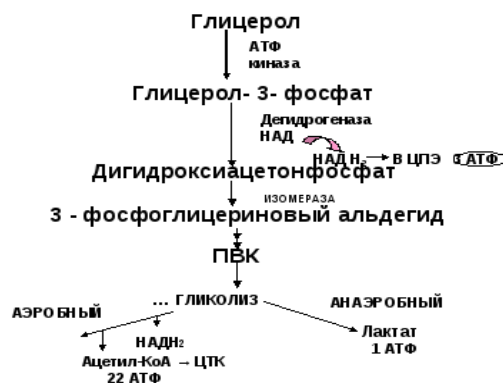


Рис. 14. Окисление глицерола

Жирные кислоты окисляются до ацетил-КоА. Этот многостадийный процесс катализируется мультиферментным комплексом. Активируются жирные кислоты при участии АТФ и HS-КоА. При рассмотрении реакций окисления жирных кислот нужно обратить особое внимание на то, что ацильные производные HS-КоА окисляются только в митохондриях, однако самостоятельно проникать в митохондрии они не способны. Важную роль в транспорте КоА-производных жирных кислот играет карнитин (витамин В_т, 3-гидрокси-4-триметиламмонийбутират) (рис. 15). Ацил-КоА в цитоплазме с карнитином образует ацил-карнитин, который легко проникает через мембрану и внутри митохондрии передает жирную кислоту на внутримиохондриальный КоА-SH. При этом высвободившийся карнитин возвращается в цитоплазму клетки, а ацил-КоА подвергается окислению:

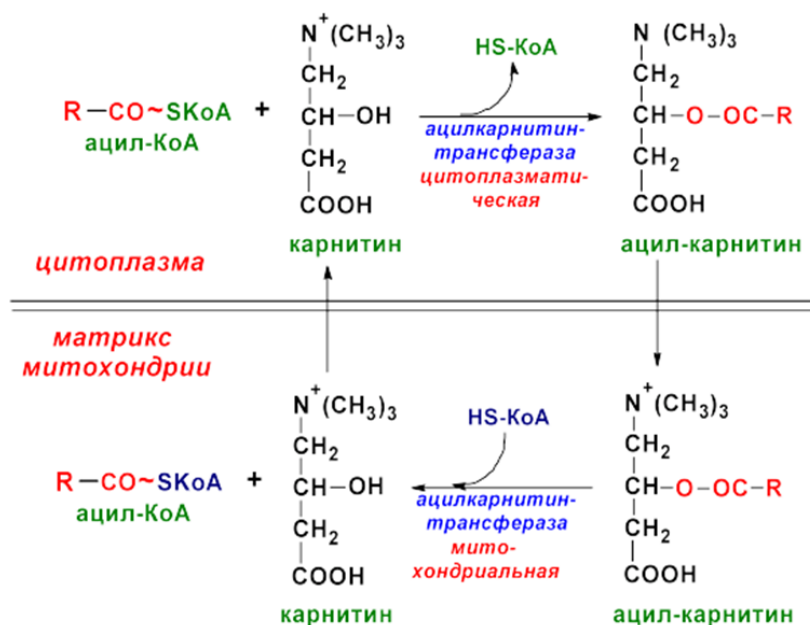


Рис. 15. Роль карнитина в транспорте КоА-производных жирных кислот

Ацил-КоА окисляется путем ряда последовательно повторяющихся реакций, которые в каждом повторении приводят к укорочению цепи жирной кислоты на два углеродных атома начиная с карбоксильного конца молекулы. Чтобы подчеркнуть, что каждый раз перед расщеплением связи C^α-C^β происходит окисление β-углеродного атома, этот процесс называют *β-окислением*. Все промежуточные продукты являются производными КоА. В окислении жирных кислот принимают участие ФАД- и НАД⁺ – зависимые дегидрогеназы, еноил-КоА-гидратаза, ацетил-КоА-ацилтрансфераза (тиолаза).



Рис. 16. Схема классификации липидов

Следует знать, что таким путем полностью окисляются насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты и с четным, и с нечетным числом углеродных атомов, причем жирные кислоты с четным числом атомов полностью распадаются до ацетил-КоА, а при окислении жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов кроме ацетил-КоА образуется молекула пропионил-КоА. Последний превращается в сукцинил-КоА и включается в цикл Кребса. Ненасыщенные жирные кислоты подвергаются β-окислению с участием двух дополнительных ферментов – изомеразы и эпимеразы (рис. 17).

Этот тип окисления жирных кислот – основной путь распада жирных кислот как в животных, так и растительных тканях.

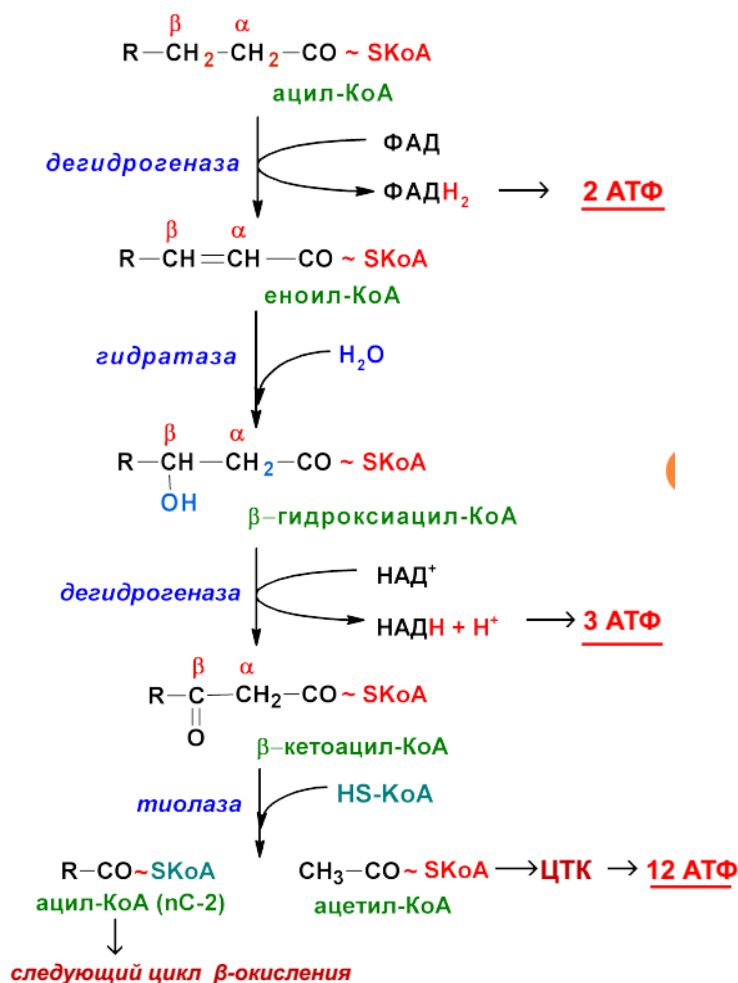


Рис. 17. Схема механизма β-окисления жирных кислот

Студент должен разобраться в реакциях β-окисления и иметь представление об энергетической эффективности этого процесса. Так, при окислении одной молекулы пальмитиновой кислоты синтезируется 130 молекул АТФ. Необходимо задуматься над вопросами: на каких этапах окисления жирных кислот происходит образование АТФ, каков состав важнейших кислот?

Следует иметь в виду, что возможно также *α-окисление* (последовательное отщепление карбоксильного углерода в виде CO₂) и *ω-окисление* (конечный продукт – α, ω-дикарбоновая кислота) жирных кислот.

Метаболизм кетоновых тел

При некоторых условиях (голодание, сахарный диабет, резкие смены диеты и т.д.) из ацетил-КоА в печени образуются кетоновые тела. Надо знать, что под этим термином подразумеваются: ацетоуксусная кислота, 3-гидроксиацетил-КоА и ацетон. Механизм их образования из ацетил-КоА может быть представлен следующей схемой:

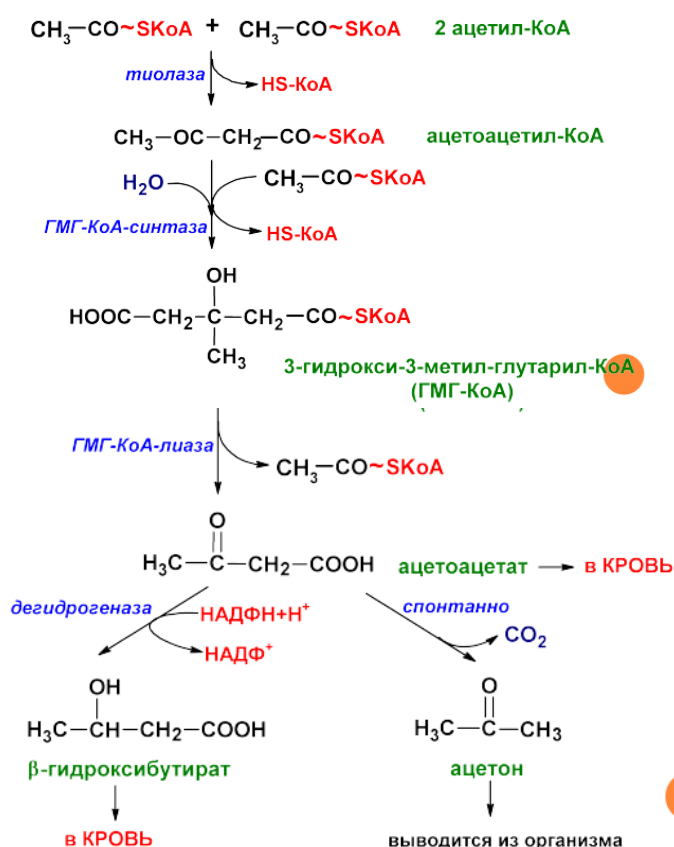


Рис. 18. Синтез кетоновых тел

Если процессы образования кетоновых тел идут слишком интенсивно, в крови появляются ненормально высокие количества этих соединений, что приводит к понижению ее pH.

Биосинтез липидов

В живых организмах энергетический материал в больших количествах запасается в виде жирных кислот и триацилглицеринов.

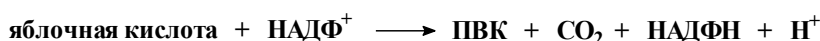
Биосинтез жирных кислот

Необходимо запомнить, что биосинтез жирных кислот не является процессом, обратимым их окислению. Биосинтез жирных кислот имеет ряд характерных особенностей.

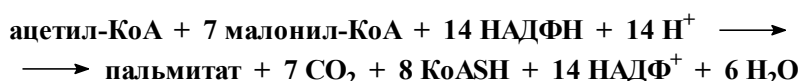
Основным местом синтеза жирных кислот, в отличие от окисления, является цитоплазма клеток. Исходным веществом для биосинтеза служит ацетил-КоА, который образуется из жирных кислот (главным образом), а также из пировиноградной кислоты и некоторых аминокислот (лейцин, изолейцин, лизин, тирозин) – здесь очень четко видна связь обмена углеводов, липидов и белков. В биосинтезе участвует также малонил-КоА, который можно назвать первым продуктом биосинтеза жирных кислот – (он образуется из ацетил-КоА и бикарбоната при участии АТФ и ацетил-КоА – карбоксилазы, содержащей биотин):



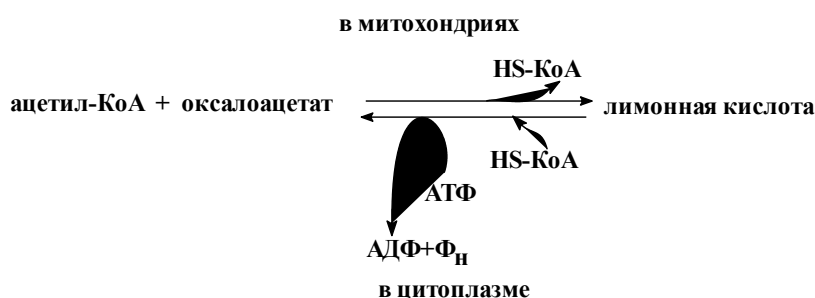
В качестве восстановителя в биосинтезе жирных кислот расходуется НАДФН, образующийся в пентозофосфатном цикле (50%) или при окислении малата:



Конечным продуктом биосинтеза в цитоплазме является пальмитиновая кислота, а из нее уже получают остальные насыщенные и ненасыщенные кислоты. Суммарную реакцию можно изобразить так:



Образующийся в митохондриях ацетил-КоА не способен переходить через мембрану в цитоплазму. Перенос его возможен двумя путями: с помощью цитрата (основной путь) и с помощью карнитина. В свою очередь, цитрат образуется в митохондриях из ацетил-КоА и оксалоацетата. После выхода в цитоплазму он вновь расщепляется АТФ-зависимым ферментом на исходные вещества:



Выше рассматривалась роль карнитина в переносе ацильных групп из цитоплазмы в митохондрии при окислении жирных кислот. По-видимому, он может выполнять эту роль и в обратном процессе, хотя для синтеза жирных кислот этот путь переноса ацильных групп не является главным.

Катализатором биосинтеза является мультиферментный комплекс, состоящий из семи ферментов – синтеза жирных кислот. Центральную роль в этой системе занимает ацилпереносающий белок (АПБ), с которым ковалентно связываются промежуточные продукты биосинтеза жирных кислот. Простетической группой в АПБ является 4-фосфоантотеин, к сульфгидрильной группе которого присоединяются ацильные остатки (подобно тому, как они присоединяются в КоASH). Полагают, что 4-фосфоантотеин образует как бы «подвижную руку», переносящую остатки жирных кислот от активного центра одного фермента к активному центру другого. В синтезе содержится еще одна группа HS-, принадлежащая цистеину.

Для инициирования процесса биосинтеза жирных кислот требуется одна молекула ацетил-КоА: его углеродные атомы превращаются в конце концов в терминальную этильную группу пальмитиновой кислоты (рис. 19). Другие 7 двууглеродных фермента доставляются в форме малонил-КоА. Ацетильная группа переносится на SH-группу цистеинового остатка синтетазы, а малонильная группа – на SH-группу фосфоантотеина АПБ. Далее ацетильная и малонильная группы конденсируются с образованием ацетоацетильной группы. При этом ацетильная группа вытесняет свободную карбоксильную группу остатка малоната в виде CO_2 . Обратите внимание на то, что четырехуглеродная группа связана с SH-группой фосфоантотеина и остается здесь во время последующих реакций вплоть до образования бутирила. Далее бутирильная группа переносится на SH-группу цистеина, а с SH-группой фосфоантотеина связывается следующая малонильная группа. Бутирильная группа покидает SH-группу цистеина, замещает карбоксильную группу в малониле на HS-АПБ, и цикл повторяется.

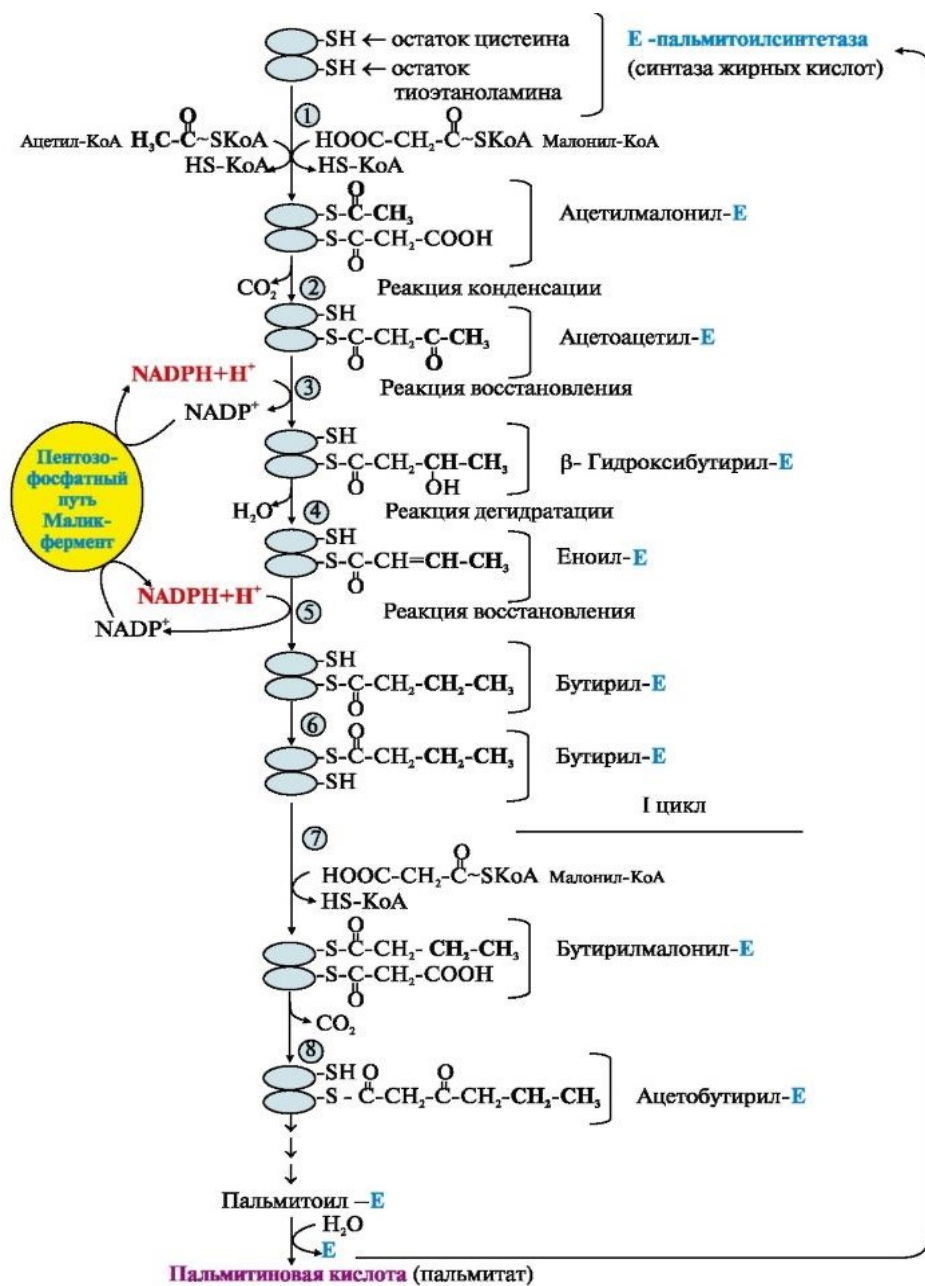


Рис. 19. Схема синтеза жирных кислот

Синтез триацилглицеринов

Свободные жирные кислоты в тканях и крови присутствуют в небольших количествах и в норме не накапливаются, а включаются в процесс синтеза жиров и фосфолипидов.

Синтез триацилглицеринов происходит, главным образом, в печени и жировой ткани из КоА-производных жирных кислот через промежуточное образование фосфатидной кислоты (рис. 20). Необходимо понять роль фосфатидной кислоты и запомнить последовательность реакций образования жиров.

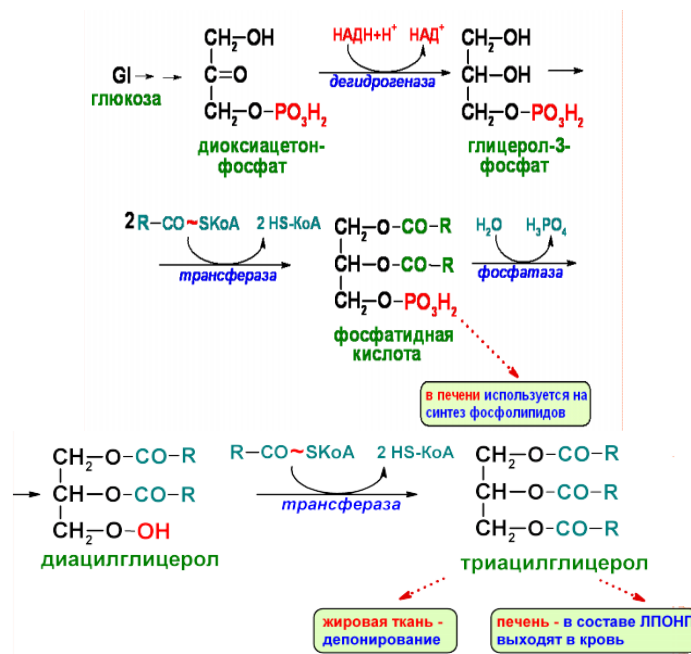


Рис. 20. Схема синтеза триацилглицеринов

Синтез глицерофосфолипидов. Следует помнить, что предшественником синтеза важнейших глицерофосфолипидов, как и жиров, является фосфатидная кислота. Центральная роль ее видна из рис. 21.

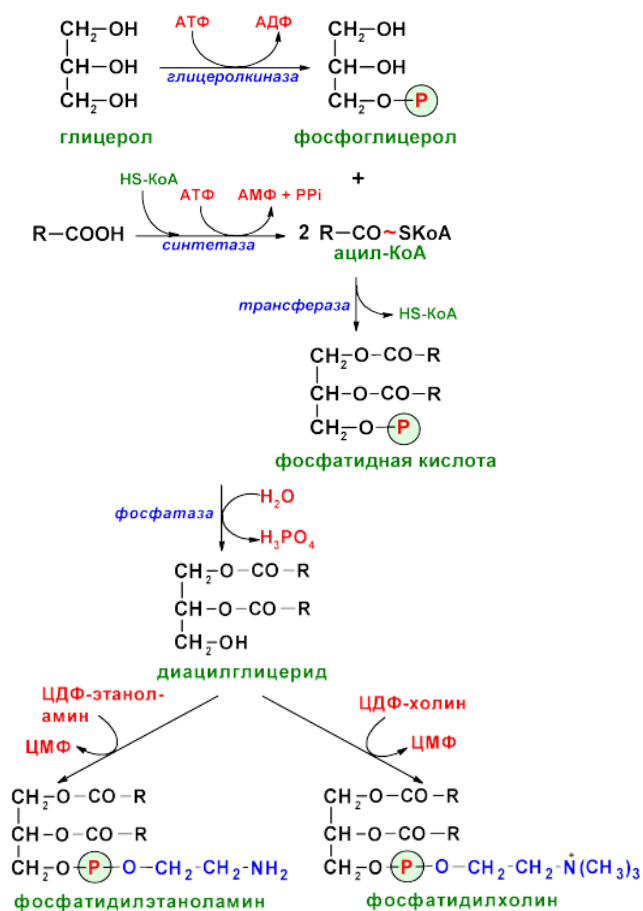


Рис. 21. Синтез глицерофосфолипидов

Биосинтез терпенов и стероидов. Исходным веществом для синтеза терпенов и стероидов служит мевалоновая кислота, которая получается из ацетил-КоА и ацетил-КоА. Из нее затем последовательно образуются сквален, ланостерин, холестерин, который является предшественником многих стероидов (рис. 22).

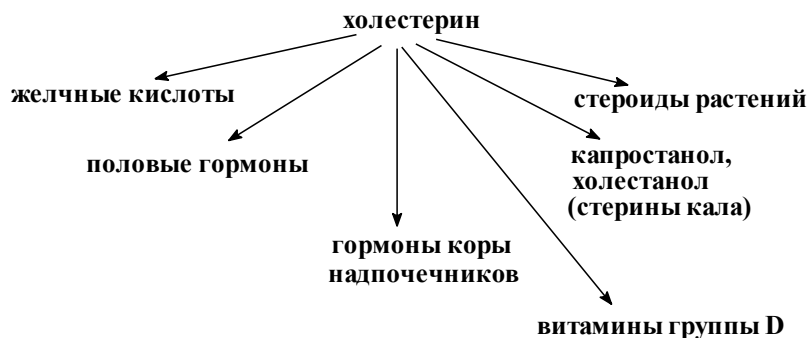


Рис. 22. Превращения холестерина

Лабораторная работа № 1. Свойства и химия липидов

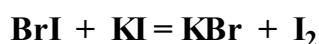
Опыт 1. Йодное число (по Ганусу)

Йодное число показывает количество граммов йода, которое присоединяется к 100 г жира. Это число позволяет оценить степень непредельности жира, обусловленную наличием в нем глицеридов, кислоты которых содержат двойные связи. Чем больше в жире ненасыщенных жирных кислот, тем выше его йодное число. Оно составляет: в говяжьем жире 27–47, свином 46–66, подсолнечном масле 129–136, льняном масле 175–201.

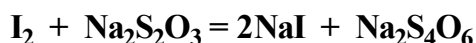
Определение йодного числа основано на реакции присоединения йода по месту разрыва двойных связей у ненасыщенных высших жирных кислот. Йод присоединяется, главным образом, к двойным связям.

Опыт 1. Определение йодного числа с бромистым йодом (по Ганусу)

Бромистый йод образуется при взаимодействии йода с бромом в уксуснокислой среде. Бромистый йод количественно присоединяется к непредельным жирным кислотам по месту двойных связей. Избыток бромистого йода, не вошедший в реакцию, реагирует с йодистым калием по уравнению:



Выделившийся йод оттитровывают тиосульфатом



Цель работы. Определить йодное число растительного жира.

Порядок выполнения опыта. В сухую коническую колбу с притертой пробкой емкостью 250–300 мл отвешивают на аналитических весах 0,2–0,3 г масла (навеску масла взять у лаборанта) и растворяют его в 10 мл хлороформа. В другую такую же колбу или склянку вносят 10 мл хлороформа без масла («слепой опыт» выполняется один на группу). В обе колбы из цилиндра добавляют по 25 мл реактива Гануса. Колбу плотно закрывают пробками. Содержимое колб осторожно взбалтывают, после чего колбы ставят в темное место на 1–1,5 ч. По истечении указанного времени в обе колбы добавляют по 10 мл 20%-ного раствора йодистого калия и 50 мл воды, и выделившийся йод оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата натрия до слабо-желтой окраски, после чего добавляют 10–12 капель раствора крахмала и продолжают титрование до полного обесцвечивания раствора. При расчетах принимают во внимание, что 1 мл 0,1 н раствора тиосульфата натрия соответствует 1 мл 0,1 н раствора иода. Йодное число (й. ч.) вычисляют по формуле

$$\text{и. ч.} = \frac{(с - о) \cdot k \cdot 0,01269 \cdot 100}{n},$$

где

с – количество 0,1 н раствора тиосульфата (мл), израсходованное на титрование контрольной пробы «слепой опыт»;

о – количество 0,1 н раствора тиосульфата (мл), израсходованное при титровании опытного образца;

к – поправочный коэффициент к титру приблизительно 0,1 н раствора тиосульфата;

0,01269 – титр раствора тиосульфата по иоду;

n – навеска масла (г).

Опыт 2. Определение кислотного числа жира

Кислотное число характеризует наличие в жире свободных жирных кислот. Измеряется оно количеством миллиграммов гидроксида натрия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г жира.

Кислотное число характеризует качество жира. В процессе хранения происходит гидролиз глицеридов и накопление свободных жирных кислот.

Повышенная кислотность жира указывает на снижение его качества. Кислотное число свежего жира обычно не превышает 1,2–3,5.

Цель работы. Определить кислотное число растительного жира.

Порядок выполнения опыта. В колбу внести 1 г подсолнечного масла. Затем отмерить мерным цилиндром 10 мл спиртово-эфирной смеси (1:1), влить

в колбу, хорошо перемешать (работы вести в вытяжном шкафу). Внести 2 капли раствора фенолфталеина, затем оттитровать 0,1 н раствором гидроксида натрия до розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин., отметить объем раствора гидроксида натрия, пошедший на титрование. Кислотное число вычислить по формуле:

$$\text{К.ч.} = \frac{V \times 4,0 \times K}{m}$$

где V – объем 0,1н гидроксида натрия, пошедший на титрование, мл;
4,0 – количество мг гидроксида натрия, содержащееся в 1 мл 0,1н раствора;

K – поправочный коэффициент к титру 0,1 н раствора гидроксида натрия;
m – навеска жира, г.

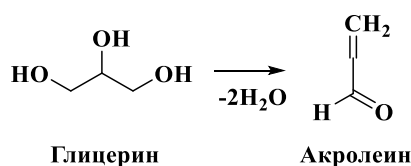
Опыт 3. Эмульгирование жирных масел

Образование стойкой эмульсии обусловлено тем, что в поверхностный водный слой, окружающий жировые капельки, устремляются поверхностно-активные частицы желчных кислот, которые обволакивают капельки жира и препятствуют их слиянию. Эмульгирование жира содой обусловлено тем, что углекислый натрий взаимодействует со свободными жирными кислотами.

Порядок выполнения опыта. В 4 пробирки вносят по 5 капель масла. В первую пробирку добавляют 20 капель дистиллированной воды, во вторую – 20 капель 2%-ного раствора углекислого натрия (сода), в третью – столько же 2%-ного раствора мыла, в четвертую – 20 капель воды и несколько капель желчи. Все пробирки взбалтывают и наблюдают образование в первой пробирке неустойчивой эмульсии масла в воде, быстро расслаивающейся при стоянии, а в остальных – устойчивой эмульсии (благодаря действию добавленных эмульгаторов).

Опыт 4. Акролеиновая реакция

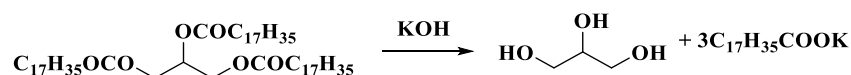
С помощью пробы на акролеин определяют наличие глицерина в жирах. При нагревании жира с кислым сернокислым калием (KHSO₄), натрием (NaHSO₄) или борной кислотой (H₃BO₃) происходит отщепление от молекулы глицерина двух молекул воды и образование акрилового альдегида, или акролеина, обладающего резким раздражающим запахом (пригоревшего сала).



Порядок выполнения опыта. В сухую пробирку вносят несколько капель растительного масла, добавляют немного порошка борной кислоты и осторожно подогревают. Появляются белые пары акролеина, обладающие резким запахом.

Опыт 5. Омыление жира

При взаимодействии жиров со щелочами происходит их гидролиз с образованием солей высших жирных кислот (мыла) и глицерина. Натриевые соли представляют собой твердые мыла, калийные – жидкие. Реакция идет по уравнению:



Порядок выполнения опыта. В широкую пробирку вносят примерно 0,5 мл растительного масла и добавляют 10 мл спиртового раствора гидроксида натрия. Пробирку закрывают пробкой с воздушным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, после чего в пробирку наливают горячую воду и растворяют в ней мыло.

Опыт 6. Определение числа омыления жиров

«Числом омыления» называется число миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации как свободных, так и связанных (в форме глицеридов) жирных кислот, содержащихся в 1 г масла.

Порядок выполнения опыта. В одну колбу на 50 мл вносят 0,5 г жира, отвешенного на аналитических весах, а в другую – 0,5 мл воды. В обе колбы из бюретки добавляют по 15 мл 0,5 н. спиртового раствора гидроксида калия, вставляют обратные холодильники и нагревают на кипящей водяной бане 30–40 мин. По окончании омыления в каждую колбу добавляют 15–20 мл воды, 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 н. раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания (определяют количество несвязавшейся щелочи). Исходя из того, что 1 мл 0,5 н. раствора гидроксида калия соответствует 28 мг его, расчет числа омыления ведут по формуле:

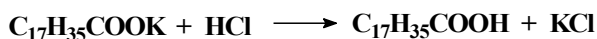
$$\text{Ч.О.} = [(V_1 - V_2) \times 28] : a$$

где V_1 = контроль; V_2 = опыт; a = масса жира (г).

Опыт 7. Выделение свободных жирных кислот

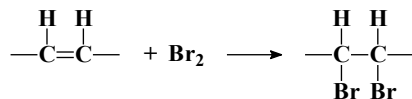
Порядок выполнения опыта. К 10 каплям раствора мыла добавляют 10 капель раствора соляной кислоты (1:1). При взаимодействии сильной кислоты с

мылом выделяются свободные жирные кислоты, которые всплывают на поверхность жидкости. Реакция идет по следующему уравнению:



Опыт 7. Проба на непредельные жирные кислоты

Непредельные жирные кислоты способны присоединять галоиды по месту двойных связей:



Порядок выполнения опыта. В пробирку наливают 10 капель хлороформного раствора масла, прибавляют 3–4 капли бромной воды и взбалтывают. Буровато-желтая окраска бромной воды исчезает, что указывает на присутствие непредельных кислот.

Опыт 8. Реакция Сальковского на холестерин

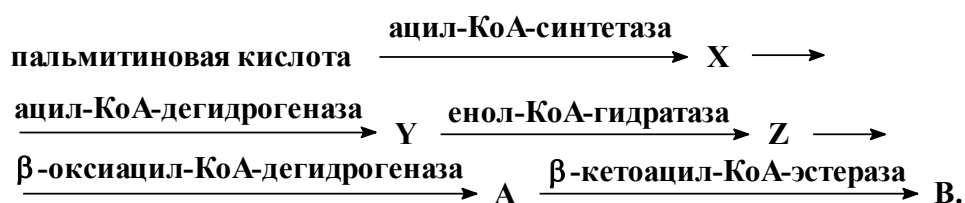
Под действием концентрированной серной кислоты происходит дегидратация молекулы холестерина с образованием холестерилена – соединения окрашенного в красный цвет:

Порядок выполнения опыта. К 10 каплям хлороформного раствора растительного масла (или холестерина) в пробирке осторожно, наслаивая **по стенке**, добавляют 5 капель концентрированной серной кислоты. Пробирку легко встряхивают. Вначале верхний слой, а затем и вся жидкость в пробирке принимает **красную**, **оранжевую** или **красно-фиолетовую** окраску.

При отчете по теме студент должен ответить на следующие вопросы:

1. Что такое «липиды»?
2. По какому признаку классифицируются липиды?
3. Напишите формулы важнейших представителей всех классов липидов и назовите их.
4. Какими константами характеризуются свойства жиров?
5. Что такое «кислотное число жира»?
6. Что такое «иодное число жира»?
7. Что такое «число омыления»?
8. Какие ферменты производят гидролитическое расщепление жиров в органах и тканях?
9. Какова роль желчи в переваривании и всасывании жиров?
10. Напишите реакции гидролиза жира и фосфатидилхолина.

11. Как глицерин окисляется в тканях?
12. Какова роль карнитина в окислении жирных кислот?
13. Напишите реакции β -окисления капроновой кислоты.
14. Где происходит окисление жирных кислот?
15. Как окисляются ненасыщенные жирные кислоты?
16. Каков баланс энергии окисления жирных кислот?
17. Какие ткани являются жировыми депо?
18. Что такое «кетонные тела»? Как они образуются?
19. Как происходит биосинтез жирных кислот? Укажите роль АПБ.
20. Где происходит биосинтез жирных кислот?
21. Как идет синтез триацилглицеринов?
22. Запишите реакции образования глицерофосфолипидов.
23. Напишите уравнения реакций, протекающих по следующей схеме:



Напишите промежуточные и конечные продукты реакций.

Занятие № 9. Обмен липидов

Суточная потребность человека в жирах составляет 70–80 г, хотя в пищевом рационе их содержание может колебаться от 80 до 130 г. У взрослых людей расщепление пищевых жиров начинается в двенадцатиперстной кишке. Обязательным условием переваривания является эмульгирование – снижение поверхностного натяжения на границе раздела вода–жир, так как жиры гидрофобны и содержатся в клетках в виде безводных капель. Основную роль в этом процессе играют желчные кислоты, входящие в состав желчи. Будучи амфифильными молекулами, они окружают каплю жира и способствуют ее дроблению на множество мелких капелек. Таким образом, молекулы жира становятся доступными для действия липаз, содержащихся в соке поджелудочной железы. В просвете кишечника происходит активация панкреатической липазы за счет присоединения к ферменту белка-активатора колипазы, который тоже синтезируется в поджелудочной железе и поступает в кишечник в составе панкреатического сока. Образование комплекса липазы и колипазы изменяет конформацию фермента, активирует его и смещает рН действия с 9,0 до 6,0.

Лабораторная работа № 1. Кинетика действия липазы

Скорость действия липазы определяется по количеству жирных кислот, образующихся при гидролизе жира молока за определенный промежуток времени. Количество жирных кислот определяют титрованием щелочью.

Порядок выполнения опыта. В две пробирки наливают по 5 мл молока и по 1 мл 5%-ного раствора панкреатина. В одну пробирку приливают 1 мл воды, в другую – 1 мл желчи. Затем жидкость в пробирках перемешивают, из каждой пробирки отбирают по 1 мл смеси в колбы, добавляют 1–2 капли 0,5%-ного раствора фенолфталеина и титруют 0,05 н раствором едкого натра до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд. Обе пробирки с оставшейся смесью помещают на водяную баню и термостатируют при 38⁰С. Через каждые 10 минут из пробирок отбирают по 1 мл смеси и титруют 0,05 н раствором едкого натра до слабо-розовой окраски. Проводят пять определений, после чего строят график, отражающий процесс гидролиза жира под действием фермента липазы во времени и в зависимости от наличия или отсутствия желчи.

Занятие № 10. Витамины

Витамины (от лат. *vita* – жизнь) – это группа органических веществ, обладающих разнообразным строением и физико-химическими свойствами, абсолютно необходимых для нормальной жизнедеятельности любого организма и выполняющих в нем непосредственно или в составе более сложных соединений каталитические и регуляторные функции.

Одним из важнейших значений витаминов в обмене веществ являются их каталитические свойства: они являются биологическими катализаторами химических реакций, протекающих в организме. Вторым важнейшим значением является их коферментная роль, участие в образовании ферментов и в функционировании ферментных систем. Их недостаток служит причиной многих болезней и преждевременного старения.

В связи с разнообразием классификации этих веществ, разработано несколько подходов к их классификации. Наиболее распространенной остается классификация витаминов по их растворимости:

- **водорастворимые витамины** (В₁ – тиамин; В₂ – рибофлавин; В₃ – пантотеновая кислота; В₅ – РР, ниацин, никотинамид, никотиновая кислота; В₉ – фолиевая кислота; В₁₂ – цианкобаламин; Н – биотин; С – аскорбиновая кислота; Р – бифлаваноиды, рутин);

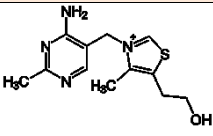
- **жирорастворимые витамины** (А – ретинол; D – кальциферол; Е – токоферол; К – филлохинон).

Жирорастворимым и некоторым водорастворимым витаминам свойственна **витамерия**. Явление витамерии состоит в том, что физиологическим действием, характерным для того или иного витамина, обладает не одно, а несколько сходных по химическому строению соединений, называемых **витамерами**. Например, витамин Е представлен группой витамеров – α-, β- и γ-токоферолами.

Для определения витаминов в биологических объектах, пищевых продуктах используют различные физико-химические методы. Поскольку витамины дают характерные реакции с рядом химических соединений, то о наличии витаминов можно судить по характерным цветным реакциям.

В качестве самостоятельной работы предлагается заполнить табл. 15.

Важнейшие витамины и их номенклатура

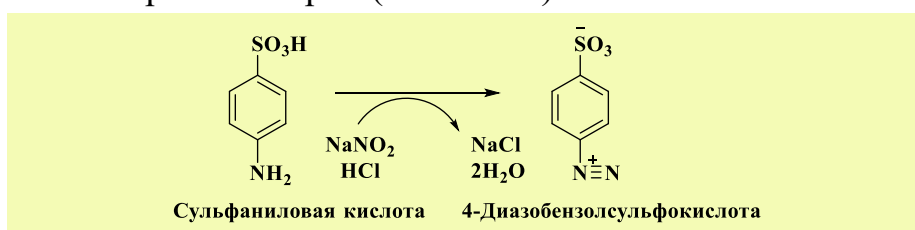
Витамин	Формула	Синтез	Кем получен	Биохимические функции	Продукты питания
А		Макколлум и Дэвис 1913г.	печень, рыба, 800–1000 мкг
.....	Функ 1912г.	катализирует реакции прямого и окислительного декарбоксилирования кетокислот
....

Лабораторная работа № 1.

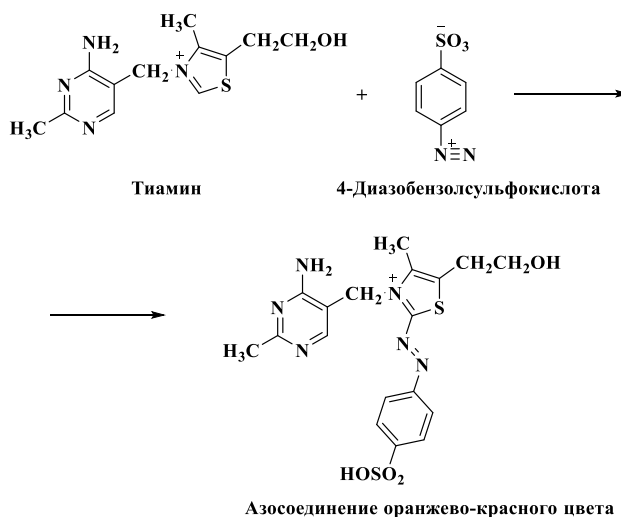
Качественные реакции на витамины

Опыт 1. Качественные реакции на витамин В₁ (тиамин)

При добавлении к раствору тиамин в щелочной среде диазо-реактива образуется сложное соединение этого витамина с диазо-бензолсульфокислотой, окрашенное в **оранжевый** или **красный** цвет. Диазобензолсульфокислота образуется в результате реакции диазотирования при взаимодействии сульфаниловой кислоты с нитритом натрия (или калия):

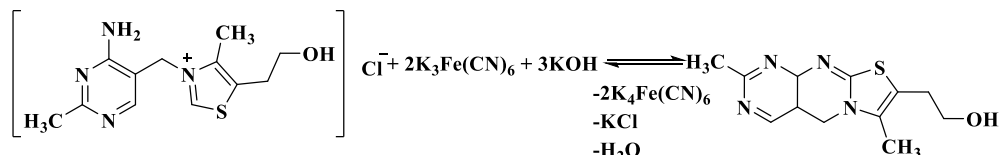


Затем диазобензолсульфокислота реагирует в щелочной среде с тиамином с образованием окрашенного азосоединения:



Порядок выполнения опыта. К диазореактиву, состоящему из 5 капель 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 1%-ного раствора нитрита натрия, прибавляют 1–2 капли 5 %-ного раствора тиамин и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5–7 капель 10%-ного раствора карбоната натрия. На границе двух жидкостей образуется **оранжево-красное** кольцо.

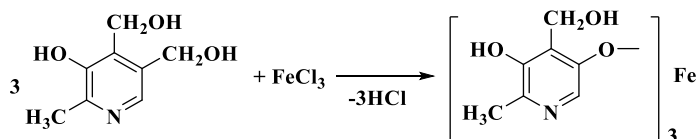
Витамин В₁ в щелочной среде под действием гексоциана(III)феррата калия окисляется в тиохром, который в изобутиловом спирте дает **синюю** флюоресценцию.



Порядок выполнения опыта. К 1 мл раствора витамина В₁ прибавляют 2 мл смеси (1 мл раствора К₃Fe(CN)₆ и 1 мл раствора NaOH), тщательно перемешивают и оставляют на пару минут. Затем прибавляют 5 мл изобутилового спирта, энергично встряхивают пару минут. Изобутиловый экстракт тиохрома в ультрафиолетовых лучах имеет интенсивную **синюю** флюоресценцию.

Опыт 2. Качественная реакция на витамин В₆ (пиридоксин)

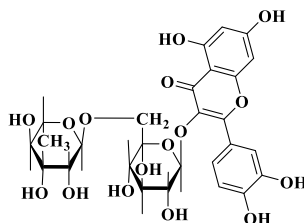
Витамин В₆ при взаимодействии с раствором хлорида железа дает комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.



Порядок выполнения опыта. К 5 каплям раствора пиридоксина прибавляют 1 каплю 0,5%-ного раствора хлорида железа. При встряхивании жидкость приобретает **красную** окраску.

Опыт 3. Качественная реакция на витамины группы Р

Витамины группы Р – производные флавонола: рутин, эриодиктиол, гесперидин, кверцетин, эпикахетин и другие. Одним из наиболее активных биофлавоноидов является рутин – гликозид кверцетина и дисахарида рутинозы:



Рутин с хлоридом железа образует комплексное соединение, окрашенное в **зеленый** цвет; с концентрированной серной кислотой образует соли, растворы которых имеют **ярко-желтую** окраску.

Порядок выполнения опыта. К 1 мл раствора рутина прибавляют несколько капель 1%-ного раствора хлорида железа, в результате наблюдают **зеленое** окрашивание. В другой пробирке к 1 мл раствора рутина по стенке осторожно наслаивают примерно 0,5 мл концентрированной серной кислоты. На границе раздела двух жидкостей образуется окрашенное в **желтый** цвет кольцо.

Опыт 4. Качественные реакции на витамин С (аскорбиновая кислота)

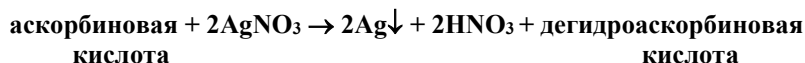
Все качественные реакции на аскорбиновую кислоту основаны на ее способности легко вступать в окислительно-восстановительные реакции. Окисляясь, аскорбиновая кислота превращается в дегидроаскорбиновую, восстанавливая различные соединения:



Раствор Люголя (раствор йода в йодиде калия) при добавлении к нему витамина С обесцвечивается вследствие восстановления молекулярного йода с образованием йодистоводородной кислоты.

Порядок выполнения опыта. В две пробирки (опыт и контроль) наливают по 10 капель дистиллированной воды и 2 капли раствора Люголя. В опытную пробирку добавляют 5–10 капель 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты, в контрольную – столько же дистиллированной воды. В опытной пробирке раствор обесцвечивается.

При добавлении витамина С к нитрату серебра выпадает осадок в виде **металлического серебра**:



Порядок выполнения опыта. В две пробирки (опыт и контроль) вносят по 5 капель 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты; затем в опытную пробирку добавляют 1–2 капли 1%-ного раствора азотнокислого серебра, а в контрольную – 1–2 капли дистиллированной воды. В опытной пробе наблюдается появление темного осадка металлического серебра.

Опыт 5. Качественная реакция на витамин А (ретинол)

В реакции Друммонда хлороформный раствор витамина А с концентрированной серной кислотой образует комплексное соединение, окрашенное в синий цвет.

Порядок выполнения опыта. К 3 каплям 0,5%-ного хлороформного масляного раствора витамина А прибавляют несколько капель концентрированной серной кислоты. Наблюдают, как содержимое пробирки окрашивается в **синий** цвет.

Опыт 6. Качественная реакция на витамин D (реакция с бромом)

Порядок выполнения опыта. В пробирку к 2–4 каплям витамина D в хлороформе или рыбьего жира добавляют 4–5 капель раствора брома в хлороформе. Постепенно смесь в пробирке окрашивается в **зелено-голубой** цвет.

Опыт 7. Качественная реакция на витамин E

Порядок выполнения опыта. 1. В пробирку вносят 5 капель спиртового раствора 0,1%-ного раствора α -токоферола и добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты, встряхивают и наблюдают постепенное появление **красного** окрашивания.

2. В пробирку вносят 5 капель спиртового раствора 0,1%-ного раствора α -токоферола, затем 0,5 мл раствора хлорида железа (III) и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдают появление **красного** окрашивания.

Опыт 8. Количественное определение витамина Р в чае по Левенталю

Данный метод основан на способности рутина окисляться перманганатом калия. В качестве индикатора применяют индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом калия после того, как окисляется весь рутин. Установлено, что 1 мл 0,02 моль/л раствора KMnO_4 окисляется 6,4 мкг рутина.

Порядок выполнения опыта. Навеску чая 100 мг заливают 50 мл горячей дистиллированной воды и кипятят в течение 5 мин. Полученный экстракт охлаждают, отбирают пипеткой 10 мл и переносят в другую колбу, куда переносят еще 10 мл дистиллированной воды и 5 капель индигокармина (появляется **синее** окрашивание). Содержимое колбы титруют при перемешивании раствором 0,01 моль/л KMnO_4 до появления устойчивой **желтой** окраски. Контрольную пробу проводят с тем же объемом (20 мл) и отмечают, сколько миллилитров перманганата калия пошло на титрование.

Для расчета содержания витамин Р (мкг) используют следующую формулу:

$$x = AV_1k/V_2P,$$

где k – стандартный пересчётный коэффициент титрования (3,2);

A – количество 0,01 мол/л раствора $KMnO_4$, использованное на титрование (мл),

V_1 – объём, в котором растворена взятая для анализа навеска (мл),

V_2 – объём раствора, взятого для титрования (мл),

P – количество сухого вещества в г, взятое для анализа.

При отчете по теме студент должен ответить на следующие вопросы:

1. Понятие об авитаминозах, гипо- и гипервитаминозах как заболеваниях, связанных с нарушением функции ферментативных систем. Использование витаминов в качестве лечебных препаратов.

2. Витамин B_1 . Строение и свойства. Коферментная форма. Роль в обмене веществ. Гипо- и авитаминоз. Пищевые источники. Суточная потребность. Применение в клинике.

3. Витамин B_6 . Строение и свойства. Коферментные формы. Гиповитаминоз. Пищевые источники. Суточная потребность.

4. Витамин C . Строение и свойства. Биологическая роль. Гипо- и авитаминоз. Применение в клинике. Суточная потребность.

5. Витамины группы A . Строение и свойства. Биологическая роль. Провитамины A . Пищевые источники. Всасывание в кишечнике. Гипо- и гипервитаминоз. Суточная потребность.

6. Витамины группы D . Строение и свойства. Провитамины: эргостерин, 7-дегидрохолестерин. Пищевые источники.

7. Витамины группы E . Строение и свойства. Гипо- и авитаминоз. Пищевые источники. Применение в клинике.

Занятие № 11 (вариативная часть)

Лабораторная работа № 1.

Определение содержания глюкозы в крови методом Хагендорна–Йенсена

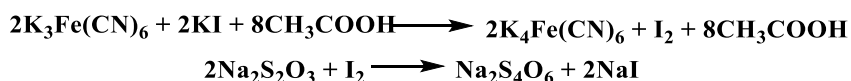
Данный метод основан на способности глюкозы в безбелковом фильтрате крови в щелочной среде при нагревании восстанавливать красную кровяную соль в желтую кровяную соль по следующему уравнению:



Вследствие обратимости этой реакции гексациано(II)феррат калия под действием сульфата цинка переводят в нерастворимый цинкгексациано(II)феррат калия:



Гексациано(III)феррат калия берут в избытке и неиспользованный в реакции его остаток определяют йодометрически в кислой среде, титруя образовавшийся йод тиосульфатом натрия:



В качестве индикатора используют крахмал. Содержание глюкозы рассчитывают по табл. 16.

Порядок выполнения опыта. В две пробирки помещают по 1 мл раствора 0,1 моль/л KOH. В одну из них (проба) добавляют 0,1 мл крови, а в другую (контроль) – 0,1 мл дистиллированной воды. Затем вносят по 5 мл 0,45%-ного раствора ZnSO₄, перемешивают и ставят на 2–3 минуты на кипящую водяную баню. После этого смеси фильтруют через фильтровальную бумагу в конические колбы, фильтр промывают горячей дистиллированной водой 3 раза по 2 мл. К фильтрату в каждой колбе приливают по 2 мл щелочного раствора гексациано(III)феррата калия и смеси кипятят на водяной бане в течение 15 мин. Затем в каждую колбу добавляют по 2,6 мл раствора ZnSO₄ в растворе NaCl, по 0,4 мл раствора йодида калия и после перемешивания по 2 мл 3%-ного раствора уксусной кислоты и по 3 капли 1%-ного раствора крахмала. Смесь титруют 2,5 ммоль/л раствором тиосульфата натрия до обесцвечивания. По затраченному на титрование пробы и контрольного опыта объемам тиосульфата натрия определяют массу глюкозы (мг) и вычисляют разность между массой глюкозы в контроле и опыте.

Массовую концентрацию глюкозы в мг/мл рассчитывают по формуле:

$$C = (B-A)/V$$

где А и В – масса глюкозы, определенная по табл. 16, в пробе и контроле;
V – объем крови в мл, взятый для анализа.

Таблица 16

Масса глюкозы в мг

V	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,131	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,098	0,097	0,095	0,093	0,092
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,021	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,005	0,003	0,002

*по вертикали – целые и десятые доли миллилитра,
по горизонтали – сотые доли

Лабораторная работа № 2.

Обнаружение кетоновых тел в моче

Образующийся в процессе β-окисления жирных кислот ацетил-СоА далее окисляется в цикле Кребса. Однако в митохондриях клеток печени в процессе кетогенеза превращается в ацетоацетат, ацетон и β-гидроксибутират. Эти соединения называются «кетоновые тела».

Кетоновые тела появляются в моче при нарушении углеводного, липидного обменов (сахарный диабет и голодание).

Опыт 1. Реакция на ацетон с йодом

При взаимодействии ацетона с йодом образуется йодоформ, который можно обнаружить по характерному запаху и появлению желтого осадка.

Порядок выполнения опыта. К 5 каплям исследуемой мочи добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия и 2–3 капли раствора йода. При наличии ацетона появляется **желтый** осадок и запах йодоформа.

Опыт 2. Реакция с нитропруссидом натрия на ацетон и ацетоуксусную кислоту

При взаимодействии нитропруссид натрия в щелочной среде с ацетоном или ацетоуксусной кислотой появляется оранжево-красное окрашивание, которое при подкислении концентрированной уксусной кислотой становится вишнево-красным.

Порядок выполнения опыта. К 5 каплям мочи добавляют 1 каплю 10%-ного раствора нитропруссид натрия и 2 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия. Появляется **оранжево-красное** окрашивание. При подкислении концентрированной уксусной кислотой появляется **вишнево-красное** окрашивание.

Опыт 3. Реакция на ацетоуксусную кислоту с хлорным железом

Взаимодействуя с хлоридом железа (III), енольная форма ацетоуксусной кислоты образует комплексное соединение **красного** цвета.

Порядок выполнения опыта. К 5 каплям мочи добавляют по каплям 1%-ный раствор хлорида железа (III), появляется **вишнево-красное** окрашивание.

Опыт 4. Определение кетоновых тел в моче с помощью тест-полосок

Тест-полоски позволяют качественно или полуколичественно определить уровень кетоновых тел в моче. Они могут быть использованы для анализа уровня глюкозурии и/или кетонурии в медицинских учреждениях и домашних условиях.

Диапазон определяемых концентраций кетонов (в виде ацетоуксусной кислоты) в моче составляет 0,5–10 ммоль/л (5–100 мг/100 мл). Цветовая шкала для определения кетонов содержит пять цветовых полей, соответствующих концентрациям ацетоуксусной кислоты 0; 0,5; 1; 4 и 10 ммоль/л (соответственно 0; 5; 10; 40 и 100 мг/100 мл). Время анализа составляет 2 мин.

Для опыта могут использоваться тест-полоски «Биоскан», «Кетоглюк-1», «Урикет-1», «Кетофан», «Диафан».

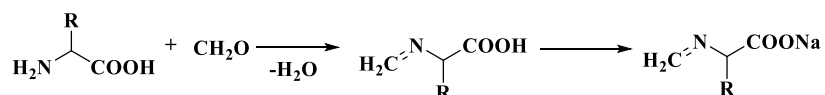
Порядок выполнения опыта. Тест-полоску опускают на пару секунд в исследуемую мочу так, чтобы зоны индикации были смочены. Избыток мочи оставляют на стенке сосуда. Полоску оставляют на то количество времени, которое заявлено в инструкции к тест-системе. Затем сопоставляют окраску зон индикации с соответствующей цветной шкалой.

Лабораторная работа № 3.

Кислотный гидролиз белков и формоловое титрование по Сёренсену

Формоловое титрование служит для определения количества карбоксильных групп, которое увеличивается при разрыве пептидных связей в процессе гидролиза. Без предварительного блокирования аминогрупп формальдегидом непосредственно титровать карбоксильные группы аминокислот щелочью невозможно.

В процессе реакции формальдегид блокирует α -аминогруппу. Образующееся метиленовое соединение затем оттитровывают щелочью:



Порядок выполнения опыта. К 1 мл раствора яичного желтка добавляют 5 капель 20%-ного раствора формалина и 3 капли 0,5%-ного раствора фенолфталеина. Титруют из бюретки 0,05 н раствором NaOH до **бледно-розовой** окраски и точно отмеряют количество затраченного титранта.

В круглодонную колбу отмеривают 20 мл раствора яичного белка и 5 мл концентрированной HCl, колбу кипятят с обратным холодильником в течение 45 мин после начала закипания. По окончании гидролиза в колбу вносят небольшое количество активированного угля, перемешивают и кипятят еще 5 мин. Затем гидролизат охлаждают, выливают в цилиндр, доводят объем жидкости до 25 мл дистиллированной водой и содержимое фильтруют. Отмеряют 1,25 мл гидролизата, добавляют несколько капель раствора фенолфталеина и нейтрализуют 10%-ным раствором гидроксида натрия до слабо-розовой окраски (нейтрализуем соляную кислоту). *Если при нейтрализации окраска становится ярко-красной, то добавляют до обесцвечивания по каплям 1%-ный раствор уксусной кислоты, избыток которой нейтрализуют 1%-ным раствором гидроксида натрия до слабо-розовой окраски.* Затем приливают 5 капель 20%-ного раствора формалина. Затем обесцвеченный раствор титруют 0,05н раствором гидроксида натрия до **бледно-розового** цвета и точно отмеряют количество затраченной щелочи.

На основании двух титрований определяют количество азота аминокислот исходя из нормальности щелочи. Так, 1 мл 0,05н раствора NaOH соответствует 0,07 мг азота. По количеству аминокислот можно судить о количестве карбоксильных групп.

Лабораторная работа № 4.

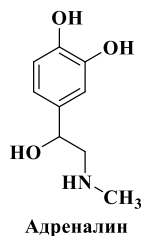
Качественные реакции на некоторые гормоны

Гормоны – биологически активные органические вещества, вырабатываемые в эндокринных железах (щитовидной, паращитовидных, надпочечниках, поджелудочной железе, половых железах, гипофизе, эпифизе и зубной железе). Деятельность эндокринных желез находится под контролем центральной нервной системы. По химической природе гормоны делят на гормоны полипептидной и белковой природы, гормоны – производные аминокислот и гормоны стероидной природы. К первой группе относятся гормоны паращитовидных желез, передней, задней и средней долей гипофиза, поджелудочной железы. Производными аминокислот являются гормоны мозгового слоя надпочечников, щитовидной железы, эпифиза. К третьей группе относятся гормоны коркового слоя надпочечников и половых желез.

Введение в организм адреналина вызывает гипергликемию и гликозурию вследствие распада гликогена. При окислении адреналина образуется адренехром.

Опыт 1. Реакция с хлоридом железа (III)

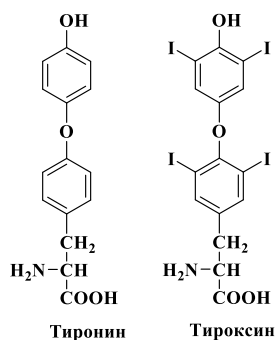
Метод основан на способности пирокатехиновой группировки адреналина образовывать с FeCl_3 комплексное соединение **изумрудно-зеленого** цвета.



Порядок выполнения опыта. В пробирку приливают 10 капель 0,1%-ного раствора адреналина и добавляют 1 каплю 1%-ного раствора FeCl_3 . Наблюдают за появлением характерного окрашивания. При добавлении 1 капли концентрированного аммиака окраска переходит в **красную**, а затем в **коричневую**.

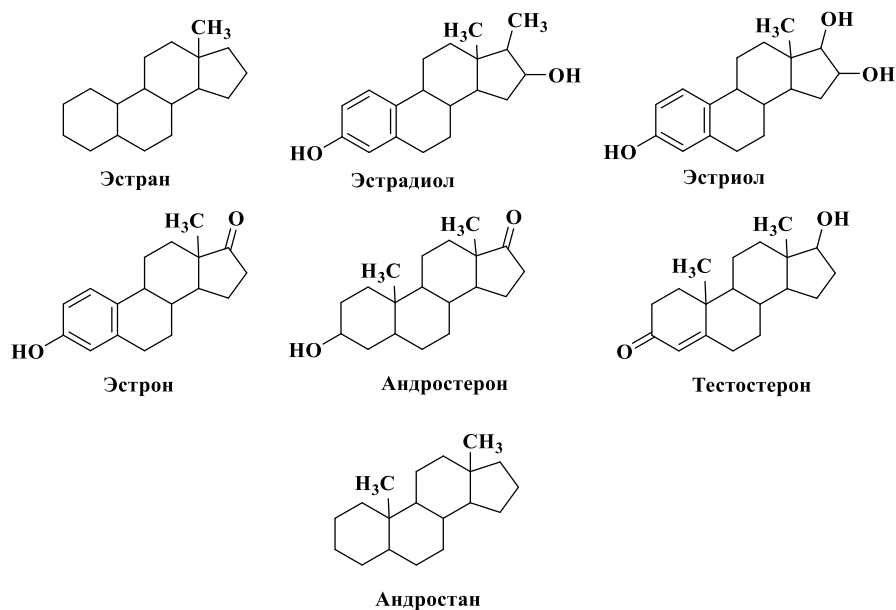
Опыт 2. Обнаружение йодтиронинов с йодатом калия

Основным гормоном щитовидной железы является тироксин. Метод обнаружения йодтиронинов основан на отщеплении при кислотном гидролизе от гормона йодистоводородной кислоты, при взаимодействии которой с йодатом калия выделяется свободный йод, который в хлороформе имеет **фиолетовую** окраску.



Порядок выполнения опыта. В пробирку помещают несколько кристаллов любого тиреоидина, добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты и нагревают 5 мин на кипящей водяной бане. Затем приливают 20 капель 1%-ного раствора KIO_3 . Содержимое пробирки перемешивают и охлаждают, добавляют 1 мл хлороформа, встряхивают и отмечают цвет осадка.

Стероидные гормоны способствуют возникновению вторичных половых признаков, также они отвечают за обмен веществ. К женским половым гормонам относят эстрон, эстриол, эстрадиол. К мужским – тестостерон, андростан, андростерон.



Опыт 3. Реакция с концентрированной серной кислотой на эстрон

Известно, что при взаимодействии эстрона и серной кислоты образуется соединение **бледно-желтого** цвета, которое при нагревании становится **оранжевым**.

Порядок выполнения опыта. Для приготовления спиртового раствора эстрона (фолликулина) содержимое 5 ампул 0,1%-ного масляного раствора фолликулина выливают в делительную воронку, содержащую 50 мл этанола. Воронку встряхивают и ждут, пока не произойдет расслоение двух фаз. После

этого нижнюю масляную фазу отбрасывают, для опыта используют верхний слой.

В пробирку вносят 5 капель верхнего слоя и помещают ее на 5 мин на кипящую водяную баню. Добавляют в пробирку 1 мл концентрированной серной кислоты и снова ставят на 10 мин в кипящую водяную баню. Отмечают цвет осадка.

Лабораторная работа № 5.

Определение концентрации общего холестерина в сыворотке и плазме крови энзиматическим колориметрическим методом на биохимическом анализаторе Stat Fax® 4500

Биохимический анализатор – это лабораторный прибор, предназначенный для диагностики в пробирке. Это компактный прибор, управляемый микропроцессором с бихроматической фотометрической системой с шестью фильтрами и инкубацией при 37°C. Стандартный диаметр используемых пробирок составляет 12 мм. Прибор может быть использован для измерения абсорбции или концентраций, основанных на стандартных значениях или скорости изменения.

Биохимический анализатор Stat Fax® 4500 предназначен для исследований уровня биохимических субстратов, ферментов, лекарств и иммунологических тестов в сыворотке, плазме или моче человека.

Основная функция биохимического анализатора заключается в считывании и подсчете результатов конечных и динамических колориметрических анализов. Любой тест, требующий измерения абсорбции на одной или нескольких доступных длин волн, может быть выполнен на данном приборе. Вдобавок, наиболее часто используемые формулы приведения данных заранее запрограммированы для дальнейшего лабораторного тестирования. Эти программы включают расчет скорости и одиночную и многозадачную стандартизацию. Посредством сенсорного LCD дисплея, прибор позволяет оператору следить за пробирками в предназначенной последовательности. Прибор затем производит необходимые измерения и печатает результаты (рис. 23).



Рис. 23. Биохимический анализатор Stat Fax® 4500

Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством пользователя.

Порядок выполнения опыта. При гидролизе эфиров холестерина холестеролэстеразой образуется свободный холестерин. Образовавшийся и имеющийся в пробе холестерин окисляется кислородом воздуха под действием холестеролоксидазы с образованием эквимольного количества перекиси водорода. Под действием пероксидазы (POD) перекись водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации холестерина в пробе.

Для определения холестерина используется набор реагентов «Холестерин-Витал», в который входят: реагент № 1 (буфер), реагент № 2 (лиофилизат), калибратор.

Для приготовления рабочего раствора содержимое флакона с реагентом № 2, аккуратно перемешивая, растворить в реагенте № 1. Для получения оптимальных результатов рекомендуется выдержать рабочий реагент после полного растворения лиофилизата в течение 20–30 мин при комнатной температуре.

Исследуемым материалом является свежая сыворотка и плазма крови. В качестве антикоагулянта рекомендуется использовать гепарин, допустимо применение ЭДТА, фторида, оксалата.

Длина волны на приборе Stat Fax® 4500 устанавливается на 500 нм (при использовании ФЭК длину волны ставят на 490 нм), длина оптического пути 1 см (0,5 см), температура инкубации 18–25°C или 37°C, фотометрирование осуществляется против холостой пробы.

Пробы перемешать и инкубировать 5 мин при 18–25°C или 37°C, фотометрировать опытную $E_{оп}$ и калибровочную $E_{к}$ пробы против холостой пробы (табл. 17).

Расчеты концентрации холестерина проводят по формуле $C = E_{оп}/E_{к} * 5,17$ ммоль/л (200 мг/дл), где:

$E_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы;

$E_{к}$ – оптическая плотность калибровочной пробы;

5,17 ммоль/л (200 мг/дл) – концентрация холестерина в калибраторе.

Если концентрация холестерина в образце превышает 25,85 ммоль/л (1000 мг/дл), следует разбавить его физраствором, повторить анализ, результат умножить на фактор разведения.

Нормальное содержание: < 5,17 ммоль/л (200 мг/дл);

Пограничное содержание: 5,2–6,5 ммоль/л (201–250 мг/дл);

Патологическое содержание: >6,5 ммоль/л (251 мг/дл).

Таблица 17

Внести в пробирки:	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Образец	0,02 мл	---	---
Калибратор	---	0,02 мл	---
Дистиллированная вода	---	---	0,02 мл
Рабочий реагент	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл

Воспроизведение и экспрессия генетической информации

ДНК – молекула наследственности у всех прокариотических и эукариотических организмов (у вирусов роль генетического материала выполняют либо ДНК, либо РНК). Функция ДНК состоит в том, что она хранит запас генетической информации, необходимой для кодирования структуры всех белков и всех РНК каждого вида организмов, регулирует во времени и пространстве биосинтез компонентов клеток и тканей, определяет деятельность организма в течение его жизненного цикла и обеспечивает индивидуальность данного организма.

Гены – это участки ДНК, которые кодируют полипептидные цепи и РНК. Часть генов кодирует, например, разные виды тРНК, другие гены отвечают за синтез различных рРНК. Гены, кодирующие полипептиды и РНК, называются «структурными генами», так как они определяют структуру определенного продукта гена – фермента или стабильной РНК. В ДНК содержатся и другие участки или последовательности, которые выполняют исключительно регуляторную функцию. Некоторые из этих регуляторных участков представляют собой сигналы, обозначающие начало и конец структурных генов; другие принимают участие в запуске или прекращении транскрипции структурных генов. Таким образом, наряду со структурными генами, хромосома содержит также регуляторные последовательности. В одной хромосоме сосредоточено большое количество генов. В единственной хромосоме бактерии кишечной палочки (*E.coli*) содержится более 3000 генов (возможно 5000).

С помощью различных генетических подходов была установлена последовательность расположения многих генов в хромосомах вирусов и бактерий.

Пути переноса генетической информации в клетке обобщает предложенная Ф. Криком так называемая центральная догма молекулярной биологии (рис. 1). Основной путь переноса: от генов – дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), способной к самовоспроизведению, – к рибонуклеиновой кислоте (РНК), иногда способной к самовоспроизведению, и, наконец, – к белкам. На этом этапе заканчивается путь переноса информации. Она не возвращается к нуклеиновым кислотам, а белки не способны к самовоспроизведению.

Таким образом, центральная догма молекулярной биологии, показывающая перемещение генетической информации в ходе трех фундаментальных процессов: репликации, транскрипции и трансляции – может быть выражена следующей схемой (рис. 24):

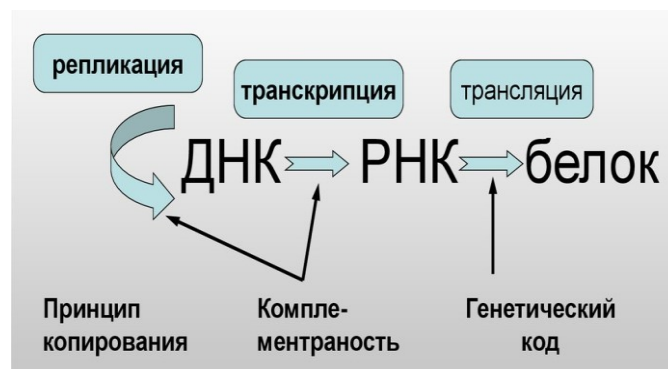


Рис. 24. Пути переноса генетической информации (центральная догма молекулярной биологии)

Репликация

Репликацией называют процесс удвоения ДНК. Принципиальный механизм его определяется строением двухспиральной молекулы ДНК. В результате репликации образуются две молекулы ДНК, представляющие собой точные копии исходной молекулы. Каждая из вновь образующихся молекул содержит одну цепь исходной ДНК и одну вновь синтезируемую цепь. Иными словами, репликация полуконсервативна – половина родительской молекулы сохраняется в дочерней. Этот процесс даже в простейших случаях реализуется путем сочетания многих сложных механизмов, в которые вовлечены многочисленные ферменты и регуляторные белки. Лучше всего процессы репликации изучены для наиболее простейших систем – бактерий, бактериофагов и плазмид.

Расплетание родительской ДНК и синтез новой ДНК происходит в *репликационной вилке*. Репликационная вилка – участок ДНК, где происходит одновременное расплетание и синтез новых цепей ДНК. Репликация начинается в строго определенном месте и продолжается последовательно в двух направлениях с примерно одинаковой скоростью.

Основные этапы репликации:

1. Инициация.
2. Элонгация.
3. Терминация.

Как теперь известно, репликация эукариотических ДНК начинается одновременно во многих точках (около 1000). Из каждой точки одновременно в противоположные стороны движутся две репликативные вилки (рис. 7). Благодаря этому репликация целой эукариотической хромосомы может завершаться даже быстрее, чем репликация бактериальной хромосомы.

Основные ферменты репликации:

- **ДНК-полимераза** – фермент, катализирующий полимеризацию дезоксирибонуклеотидов на матрице ДНК по принципу комплементарности;

- **ДНК-лигаза** – фермент, катализирующий образование фосфодиэфирных связей между 5'-фосфорильной и 3'- гидроксильной группами соседних дезокси-нуклеотидов в местах разрыва двуцепочечной ДНК;
- **ДНК-хеликаза** – фермент, разделяющий цепи двухцепочечной ДНК на одинарные;
- **ДНК-топоизомераза** – фермент, изменяющий степень сверхспиральности ДНК путем внесения одноцепочечных разрывов в ДНК;
- **ДНК-праймаза** – это фермент РНК-полимераза, синтезирующий короткий фрагмент РНК, называемый «праймером», комплементарный одноцепочечной матрице ДНК.

Ключевую роль в процессе репликации играют реплицирующие ДНК-полимеразы, которые осуществляют матричный синтез ДНК из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов. Фермент синтезирует нить ДНК, комплементарную родительской нити (называемой матрицей), последовательно присоединяя к 3'-концу (растущей цепи) мононуклеотидные звенья, комплементарные звеньям матрицы.

Репликация состоит из большого количества последовательных этапов, в которые включают узнавание точки начала репликации, расщепление родительского дуплекса, удержание его цепей на достаточном расстоянии друг от друга, инициацию синтеза новых дочерних цепей, их элонгацию, закручивание цепей в спирали и, наконец, терминацию репликации (рис. 25). Все эти процессы протекают с очень высокой скоростью и исключительной точностью. Весь этот комплекс называют «ДНК-репликационной системой», или «реплисомой».

Полимеразы кроме полимеразной активности имеют 5'-3' и 3'-5' экзонуклеазную активность, т. е. они могут отщеплять концевые нуклеотиды с любого конца цепи ДНК.

Для того чтобы ДНК-полимеразы могли начать синтез, необходимо существование уже готового фрагмента ДНК или РНК, комплементарного матрице и содержащего свободную 3'-ОН-группу. Этот фрагмент называют «затравкой». Инициация репликации начинается с расплетания нитей родительской ДНК и синтеза короткого РНК-транскрипта, который служит праймером («затравкой») для синтеза ДНК. Праймер синтезируется специальными ферментами – праймазами.

Участок начала репликации представляет собой нуклеотидную последовательность длиной 100–200 пар оснований. Эта последовательность узнается специфическими клеточными белками, которые начинают в этом месте цикл репликации. Именно этот процесс **инициации** репликации находится под контролем клеточной регуляции.

Репликация начинается с расплетения двойной спирали при помощи ферментов **хеликаз**, которые перемещаются вдоль цепей ДНК и раскручивают их.

Процесс расплетения спиралей ДНК является энергозависимым и требует затрат АТФ. Интенсивное раскручивание ДНК может привести к образованию дополнительных витков. Это явление носит название «положительная сверхспирализация» или «сверхскрученность» и устраняется с помощью ферментов *топоизомераз*. В частности, топоизомераза II осуществляет релаксацию положительной сверхспирализации за счет образования отрицательных сверхвитков. Топоизомераза также носит название «гираза». После расплетения двух нитей ДНК необходимо их стабилизировать в этом состоянии. Существует специальный белок, специфично связывающийся с одной из нитей ДНК и препятствующий обратной рекомбинации в двойную спираль. Его называют «*белок SSB*» (single strand binding) или «*ДНК-связывающий белок*» (ДСБ). Таким образом, расплетение ДНК и образование репликативных вилок является достаточным основанием (при наличии ферментов и субстратов репликации) для удвоения ДНК.

После инициации начинается продвижение репликативных вилок – *элонгация*.

От 3'-конца праймера начинается синтез новой цепи ДНК при помощи *ДНК-полимеразы III*. Синтез идет в направлении 5'–3' одновременно на обеих цепях матрицы. Учитывая тот факт, что цепи антипараллельны, новосинтезированные цепи должны были бы расти в противоположных направлениях при помощи двух различных ферментов. На самом же деле обнаружена одна ДНК-полимераза, катализирующая рост цепи в направлении 5'–3'. Поэтому одна из цепей вновь синтезируемой ДНК удлиняется в том же направлении, в котором движется репликативная вилка, причем синтез осуществляется непрерывно. Эту цепь ДНК называют «иницирующая» (ведущая). Другая цепь – «запаздывающая» (отстающая) – синтезируется короткими фрагментами Оказаки. Синтез каждого фрагмента иницируется вблизи начала репликационной вилки и продолжается в противоположную от нее сторону до тех пор, пока 3'-конец вновь синтезируемой ДНК не достигает 5'-конца предыдущего фрагмента Оказаки. Синтез этих фрагментов осуществляется *праймазой*, которая в качестве «затравки» синтезирует короткие фрагменты РНК, далее они удлиняются ДНК-полимеразой III. Длина фрагмента Оказаки равна примерно 300 нуклеотидов (у эукариотов). Фермент ДНК-полимераза I удаляет РНК-затравку и достраивает фрагменты, а ДНК-лигаза соединяет между собой соседние фрагменты Оказаки.

Для завершения репликации (*терминации*) используются ферменты *лигаза* и *теломераза*. В результате действия предыдущих ферментов новосинтезированная запаздывающая цепь оказывается состоящей из фрагментов, вплотную примыкающих друг к другу (кроме кольцевой ДНК). «Сшивание» сосед-

них фрагментов осуществляется ДНК-лигазой (фермент образует фосфодиэфирную связь). Для осуществления реакции требуется гидролиз АТФ. ДНК-полимеразная система оставляет недореплицированными 3'-концы материнских цепей ДНК, т.е. новые цепи оказываются укороченными с 5'-концов. В каждой новой цепи фрагмент Оказаки, находящейся у 5'-конца, как и обычно, начинается с короткой РНК-затравки (у 5'-конца лидирующей цепи тоже находится РНК-затравка). РНК-затравки удаляются специальной нуклеазой. Но застроиться дезоксинуклеотидами образующаяся «брешь» не может, поскольку ДНК-полимеразы не способны действовать «с нуля», а лишь удлиняют 3'-конец уже имеющегося полинуклеотида. Поэтому получается, что новая цепь должна быть короче старой. Эта проблема решается при помощи фермента теломеразы. Теломераза удлиняет не новую (укороченную) цепь, а старую, более длинную. К 3'-концу старой (родительской) цепи теломераза последовательно пристраивает несколько сотен повторяющихся последовательностей. После чего значительно удлиненная старая цепь становится способной выступать в качестве матрицы для образования еще одного фрагмента Оказаки новой (укороченной) цепи. Таким образом восстанавливается длина теломерного участка. Существуют и другие, альтернативные, механизмы удлинения теломер. Кроме того, наличие теломер предохраняет от недорепликации генетически значимые отделы ДНК. Наконец, теломерные отделы ДНК выступают в качестве «часового» устройства, которое отсчитывает количество делений клетки после исчезновения теломеразной активности. Каждое деление приводит к укорочению теломеры на 50–65 нуклеотидных остатков (кроме половых клеток, где активность теломеразы высокая).

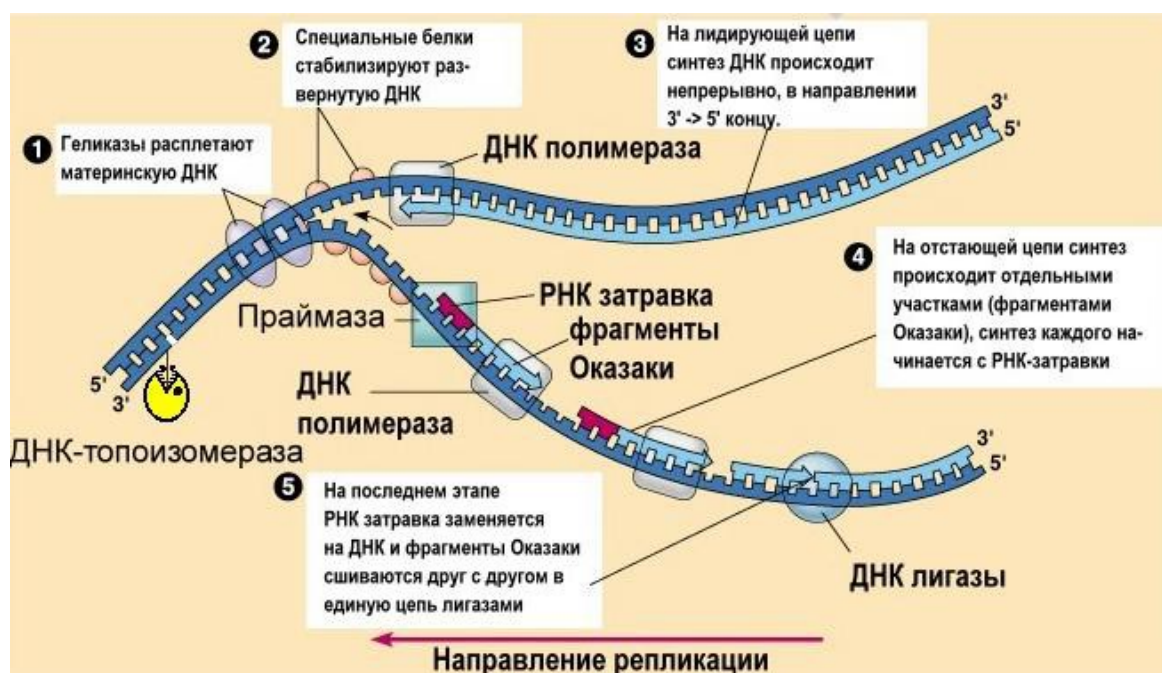


Рис. 25. Схематическое изображение основных этапов репликации

Точность репликации ДНК очень велика, но примерно один раз на 10^5 – 10^6 нуклеотидных остатков происходят ошибки спаривания, и тогда вместо пары нуклеотидов А-Т, G-C в дочернюю цепь ДНК оказываются включенными нуклеотиды, некомплементарные нуклеотидам матричной цепи. Однако ДНК-полимеразы способны после присоединения очередного нуклеотида в растущую цепь ДНК делать шаг назад (в направлении от 3'- к 5'-концу) и вырезать последний нуклеотид, если он некомплементарен нуклеотиду в матричной цепи ДНК. Этот процесс исправления ошибок спаривания (или коррекция) иногда не срабатывает, и тогда в ДНК по окончании репликации остаются некомплементарные пары, тем более, что ДНК-полимераза лишена корректирующего механизма и «ошибается» чаще, чем другие полимеразы.

Транскрипция

Транскрипция – процесс биосинтеза РНК в клетке. Его результатом является образование РНК, комплементарных отдельным участкам ДНК. При этом в каждом участке РНК комплементарна только одной определенной нити ДНК.

Процесс биосинтеза РНК осуществляется ферментами – РНК-полимеразами, которые используют ДНК в качестве матрицы. Как и при репликации, процесс образования фосфодиэфирных связей включает в себя катализируемую ферментом нуклеофильную атаку 3'-гидроксильной группы растущей цепи на α -фосфатную группу присоединяемого субстрата (рибонуклеозидтрифосфата), т. е. цепи РНК синтезируются в направлении 5'-3', как и репликация (рис. 26).

Как и репликация, транскрипция состоит из трех основных этапов: **инициация**, **элонгация**, **терминация**. В отличие от ДНК-полимераз, РНК-полимеразы способны к самостоятельной инициации синтеза РНК, которая осуществляется в определенных точках ДНК. Место инициации синтеза РНК определяется специальными регуляторными участками: ДНК-промоторами. Терминация синтеза также происходит на специфических участках: ДНК-терминаторах. Процесс транскрипции регулируется разнообразными способами, что позволяет клетке приспосабливаться к изменениям условий существования. Наиболее хорошо изучены транскрипция и способы ее регуляции бактерий и бактериофагов.

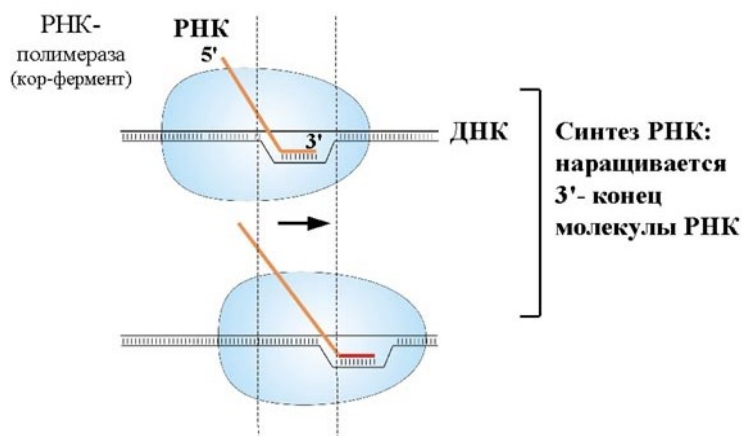


Рис. 26. Элонгация транскрипции

Транскрипция генов

Рассмотрим процесс передачи генетической информации, а именно, транскрипцию генов. В ходе данного процесса с помощью ферментативной системы происходит синтез цепи РНК, нуклеотидная последовательность которой комплементарна последовательности одной из цепей ДНК (рис. 9).

В результате транскрипции образуется три класса РНК. Во-первых, это *матричная РНК (мРНК)*, которая поступает в рибосомы и там направляет синтез одного или нескольких полипептидов, аминокислотная последовательность которых была закодирована геном или группой генов в хромосоме. Около 90–95% хромосомы *E.coli* кодирует матричные РНК. Остальная часть хромосомы кодирует транспортные и рибосомные РНК, а также включает регуляторные последовательности, лидеры, спейсеры, хвостовые последовательности.

Между процессами репликации и транскрипции существует важное различие. В процессе репликации копируется вся хромосома и образуются дочерние ДНК, идентичные родительской ДНК. При транскрипции необязательно должна транскрибироваться вся клеточная ДНК. Напротив, обычно транскрибируются лишь отдельные гены или группы генов. Таким образом, процесс транскрипции ДНК протекает избирательно, он направляется особыми регуляторными последовательностями, указывающими начало и конец участков ДНК, подлежащих транскрипции.

Матричные РНК – это одноцепочечные молекулы самой разной длины. У прокариот одна молекула мРНК может кодировать одну, две и даже большее количество полипептидных цепей. Если она несет информацию только об одном полипептиде, то такая мРНК называется *моногенной*, или *моноцистронной*; если же она кодирует два разных полипептида или большее их количество, то такую мРНК называют *полигенной*, или *полицистронной*.

Минимальная длина мРНК определяется длиной полипептидной цепи, которую она кодирует. Кроме того, мРНК содержит на 5'-конце некодирующий

полинуклеотидный «лидер». Длина этих «лидеров» может составлять от 25 до 150 оснований. Полигенные мРНК могут также содержать нетранслируемые межгенные области, или спейсеры, которые разделяют участки, кодирующие отдельные полипептидные цепи, и, видимо, помогают регулировать скорость трансляции.

Полигенные мРНК кодируют обычно две или больше разных полипептидных цепей, функционирующих вместе (в одной метаболической цепи).

Транскрипция в бактериальных клетках

Общий план строения генов у прокариот и эукариот не отличается – и те, и другие содержат регуляторную область с промотором и оператором, единицу транскрипции с кодирующей и нетранслируемыми последовательностями и терминатор (рис. 27). Однако организация генов у прокариот и эукариот отличается. В начале и в конце оперона есть единые регуляторные области для нескольких структурных генов. С транскрибируемого участка оперона считывается одна молекула и-РНК, которая содержит несколько кодирующих последовательностей, в каждой из которых есть свой **старт-** и **стоп-кодон**. С каждого из таких участков синтезируется один белок. Таким образом, *с одной молекулы и-РНК синтезируется несколько молекул белка*. Для прокариот характерно объединение нескольких генов в единую функциональную единицу – **оперон**. Работу оперона могут регулировать другие гены, которые могут быть заметно удалены от самого оперона – **регуляторы**. Белок, транслируемый с этого гена называется **репрессор**. Он связывается с оператором оперона, регулируя экспрессию сразу всех генов, в нем содержащихся. Для прокариот также характерно явление **сопряжения транскрипции и трансляции**.

Бактериальная хромосома содержит приблизительно 4000 генов, которые могут транскрибироваться как независимо друг от друга, так и координированно. Независимая транскрипция гена возможна, если он обладает собственным промотором и терминатором транскрипции. При координированной транскрипции группа генов имеет общий промотор и общий терминатор и составляет один непрерывный участок ДНК; мРНК, иницируемая на общем промоторе, содержит информацию для синтеза нескольких полипептидов.

РНК-полимеразы бактерий – олигомерные белки ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) с молекулярной массой 500000. Первичная структура α, β, β^1 – субъединиц установлена Е.Д. Свердловым с сотрудниками. Полный фермент способен «узнавать» промотор и связываться с ним, образуя при этом прочный комплекс. Доказано, что при создании такого комплекса в промоторной последовательности (~40 п.о.) расплетается небольшой (10–15 п.о.) участок ДНК. Сразу же происходит инициация синтеза РНК, в результате которой образуется первая фосфородиэфирная связь. Первый нуклеотид на 5'-конце синтезируемой ДНК называется **ини-**

цирующим. Чаще всего это пуриновый нуклеотид рр-рА либо р-р-р-G. Доказано, что новообразованная цепь РНК имеет трифосфатную группу на 5'-конце и свободную ОН группу на 3'-конце. После того как синтезируется сравнительно короткий олигорибонуклеотид, σ -субъединица отделяется от фермента, и дальнейшую полимеризацию (*элонгацию*) осуществляет комплекс $\alpha_2\beta\beta'$, который называется **минимальным ферментом** (*выделите цветом и курсивом название*) (*кор-ферментом*). σ -Субъединицу можно рассматривать как фактор позитивной регуляции транскрипции; σ -субъединица участвует в выборе участка инициации. Установлено, что β' -субъединица участвует в связывании с ДНК-матрицей, а β -субъединица – в связывании субстратов – рибонуклеозидтрифосфатов.

Для терминации транскрипции на ДНК имеются особые сигналы – **терминаторные последовательности**. В этом случае терминация осуществляется минимальным ферментом, но иногда необходим дополнительный белковый фактор, называемый (ρ) «ро».

В матричной ДНК имеются стоп-сигналы, которые были расшифрованы. Все они имеют одну общую особенность: вслед за GC-богатой областью перед участком терминации располагается AT-богатая последовательность. Кроме этого, терминирующие последовательности в молекуле ДНК обладают симметрией второго порядка GC-богатой области (полииндромы).

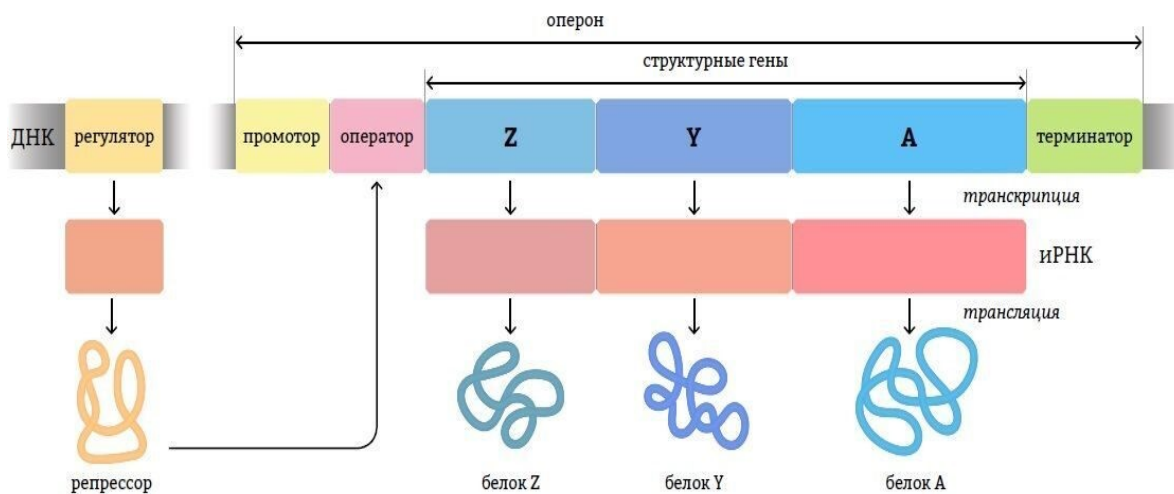


Рис. 27. Схема строения гена у прокариот (бактерий)

Транскрипция в эукариотических клетках

Структурная и функциональная организация генов эукариот гораздо сложнее. Исследование хромосом эукариот, а позднее секвенирование полных последовательностей геномов эукариот принесло много сюрпризов. Многие, если не большинство, генов эукариот обладают интересной особенностью: их нуклеотидные последовательности содержат один или несколько участков ДНК, в которых не кодируется аминокислотная последовательность полипеп-

тидного продукта. Такие нетранслируемые вставки нарушают прямое соответствие между нуклеотидной последовательностью гена и аминокислотной последовательностью кодируемого полипептида. Эти нетранслируемые сегменты в составе генов называют **интронами**, или **встроенными последовательностями**, а кодирующие сегменты – **экзонами**. У прокариот лишь немногие гены содержат интроны.

Итак, у эукариот практически не встречается объединение генов в опероны, и кодирующая последовательность гена эукариот чаще всего разделена на транслируемые участки – экзоны, и нетранслируемые участки – интроны. В большинстве случаев функция интронов не установлена. В целом, лишь около 1,5% ДНК человека являются «кодирующими», т. е. несут информацию о белках или РНК. Однако с учетом крупных интронов получается, что ДНК человека на 30% состоит из генов. Поскольку гены составляют относительно небольшую долю в геноме человека, значительная часть ДНК остается неучтенной.

С каждого гена сначала синтезируется незрелая, или пре-РНК, которая содержит в себе как интроны, так и экзоны. После этого проходит процесс сплайсинга, в результате которого интронные участки вырезаются, и образуется зрелая иРНК, с которой может быть синтезирован белок (рис. 28).

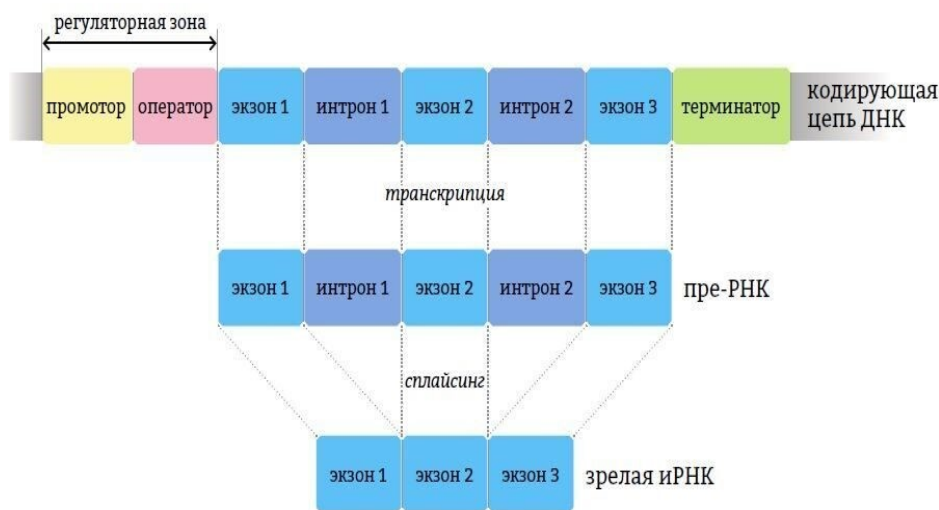


Рис. 28. Схема строения гена у эукариот

Такая организация генов позволяет, например, осуществить **процесс альтернативного сплайсинга**, когда с одного гена могут быть синтезированы разные формы белка, за счет того, что в процессе сплайсинга экзоны могут сшиваться в разных последовательностях (рис. 29).

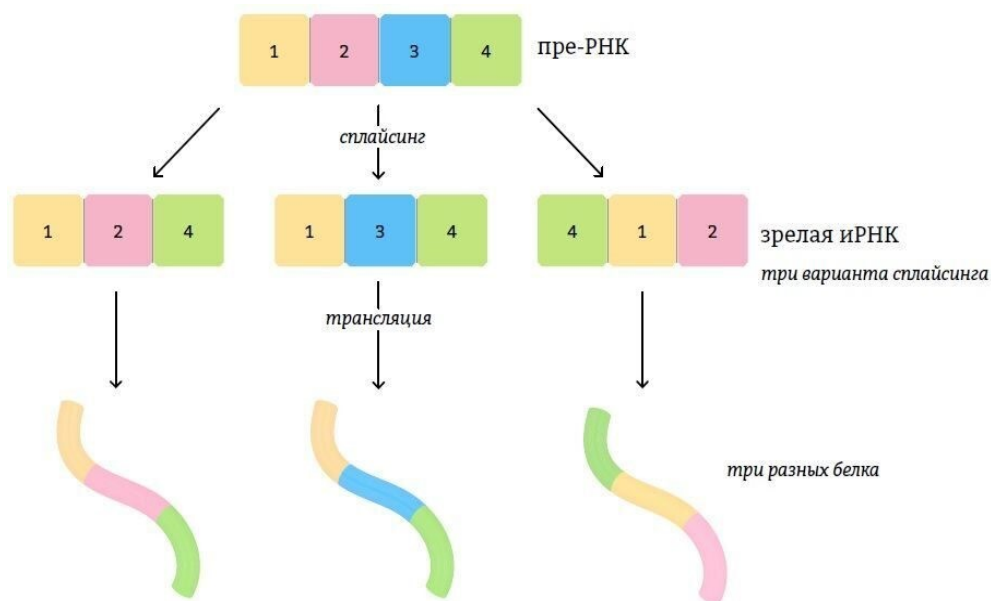


Рис. 29. Процесс альтернативного сплайсинга

В эукариотических клетках содержатся три РНК-полимеразы (I, II, III). РНК-полимераза I находится в ядрышке и участвует главным образом в биосинтезе р-РНК, в то время как РНК-полимеразы II и III обнаруживаются в хроматине и нуклеоплазме. РНК-полимераза II осуществляет синтез мРНК, а РНК-полимераза III отвечает за синтез тРНК и 5s-рРНК. Удлинение цепи РНК с помощью эукариотических ДНК-зависимых РНК-полимераз происходит таким же образом, как и при участии фермента из *E.coli*, хотя эти ферменты отличаются друг от друга по субъединичной структуре и регуляторным элементам.

Транскрипты РНК, синтезированные при помощи РНК-полимеразы, обычно претерпевают дальнейшие ферментативные изменения, называемые **посттранскрипционным процессингом**, и только после этого они становятся функционально активными.

Так, рРНК и тРНК синтезируются в виде более длинных предшественников, которые затем модифицируются и расщепляются под действием нуклеаз с образованием конечных продуктов.

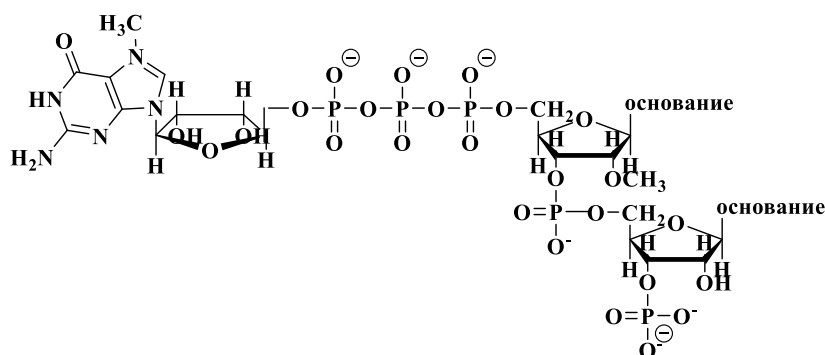
В некоторых случаях из одной длинной молекулы-предшественника в результате ферментативного расщепления образуется две и даже большее количество разных тРНК. В ходе посттранскрипционного процессинга в предшественниках т-РНК, наряду с удалением концевых последовательностей, происходят изменения двоякого типа. Во-первых, к некоторым тРНК присоединяется 3'-концевая тринуклеотидная последовательность – Ц-Ц-А(3') (в других тРНК этот 3'-концевой фрагмент уже содержится в транскрипте). Во-вторых, ряд оснований в тРНК специфическим образом модифицируется: одни метилируются, другие дезаминируются, третьи восстанавливаются.

Эукариотические мРНК, обнаруживаемые в цитоплазме, обладают тремя отличительными особенностями. Первая особенность состоит в том, что эукариотические мРНК – обычно моногенные молекулы, в то время как многие прокариотические мРНК – полигенные. Вторая особенность заключается в том, что эукариотические мРНК содержат на своем 3'-конце «хвост» из 100–200 последовательно присоединенных остатков аденозидов (А) – так называемый «поли(А)-хвост». Этот «хвост» синтезируется отдельно из молекул АТФ с помощью полиаденилатполимеразы, которая работает в основном так же, как РНК-полимераза, и катализирует реакцию



Полиаденилатполимеразе не нужна матрица, однако необходима затравка – мРНК.

Третья особенность большинства мРНК эукариот – это наличие в них 5'-концевого «кэпа» (шапки), представляющего собой остаток 7-метилгуанозина, присоединенного к 5'-концевому остатку мРНК посредством трифосфатной связи:



Функции «кэпа» и «(А)-хвоста» точно не известны. Возможно, «кэп» связывается с рибосомой, инициируя процесс трансляции. Возможно, это защита мРНК от разрушения ферментами.

Биосинтез белка (трансляция)

Понимание механизма биосинтеза белков со всем многообразием их биологической активности и видовой специфичности было одной из крупнейших проблем в истории биохимии.

Синтез белка протекает в пять основных этапов:

- 1) активация аминокислот;
- 2) инициация полипептидной цепи;
- 3) элонгация;
- 4) терминация и высвобождение;
- 5) сворачивание полипептидной цепи и процессинг.

Три главных открытия середины XX столетия, заложившие основу наших сегодняшних представлений о биосинтезе белка:

I. Местом синтеза белка из аминокислот являются рибосомы (Пол Замечник и его коллеги использовали радиоактивные метки в аминокислотах).

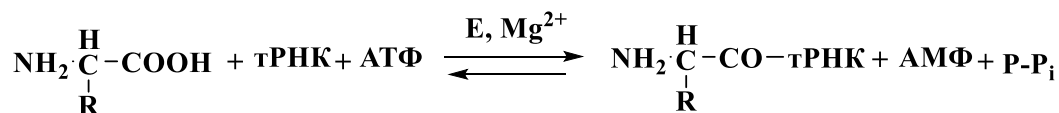
II. Активация аминокислот осуществляется в ходе ферментативного присоединения аминокислот к термостабильной растворимой РНК (тРНК) в цитоплазме (Пол Замечник и Мэлон Хогланд).

III. Посредником (адаптером) между генетической информацией, заключенной на мРНК, и аминокислотой, присоединенной к тРНК, выступает тРНК, которая содержит участки – антикодоны, способные узнавать на мРНК триплеты, кодирующие аминокислоты (Френсис Крик).

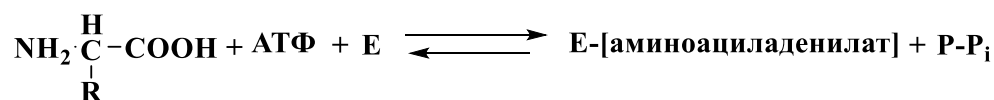
Инициация

На первом этапе биосинтеза белка, протекающего в цитозоле клетки, двадцать различных аминокислот присоединяются эфирной связью к соответствующим тРНК. Эти процессы катализируются двадцатью различными активирующими ферментами, называемыми **аминоацил-тРНК-синтетазами**, каждый из которых специфичен по отношению к какой-то одной аминокислоте и к соответствующей тРНК. Почти все аминоацил-тРНК-синтетазы *E.coli* были выделены в чистом виде, и многие из них были получены в кристаллическом виде.

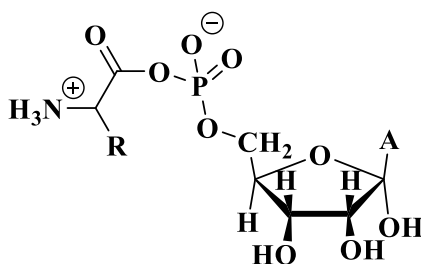
Общий вид катализируемой ими реакции может быть выражен уравнением:



Процесс активации состоит из двух отдельных стадий, осуществляемых в активном центре фермента. На первой стадии в результате взаимодействия АТФ и аминокислоты образуется связанное с ферментом промежуточное соединение – аминоациладенилат:



Аминоациладенилат образуется в активном центре фермента:



На второй стадии аминокислотный остаток переносится с аминокислотаденилата, связанного с ферментом, на соответствующую специфическую тРНК:



На этой последней стадии аминокислотный остаток связывается со свободной 2'- или 3'-гидроксильной группой концевой остатка А в молекуле тРНК (рис. 30).

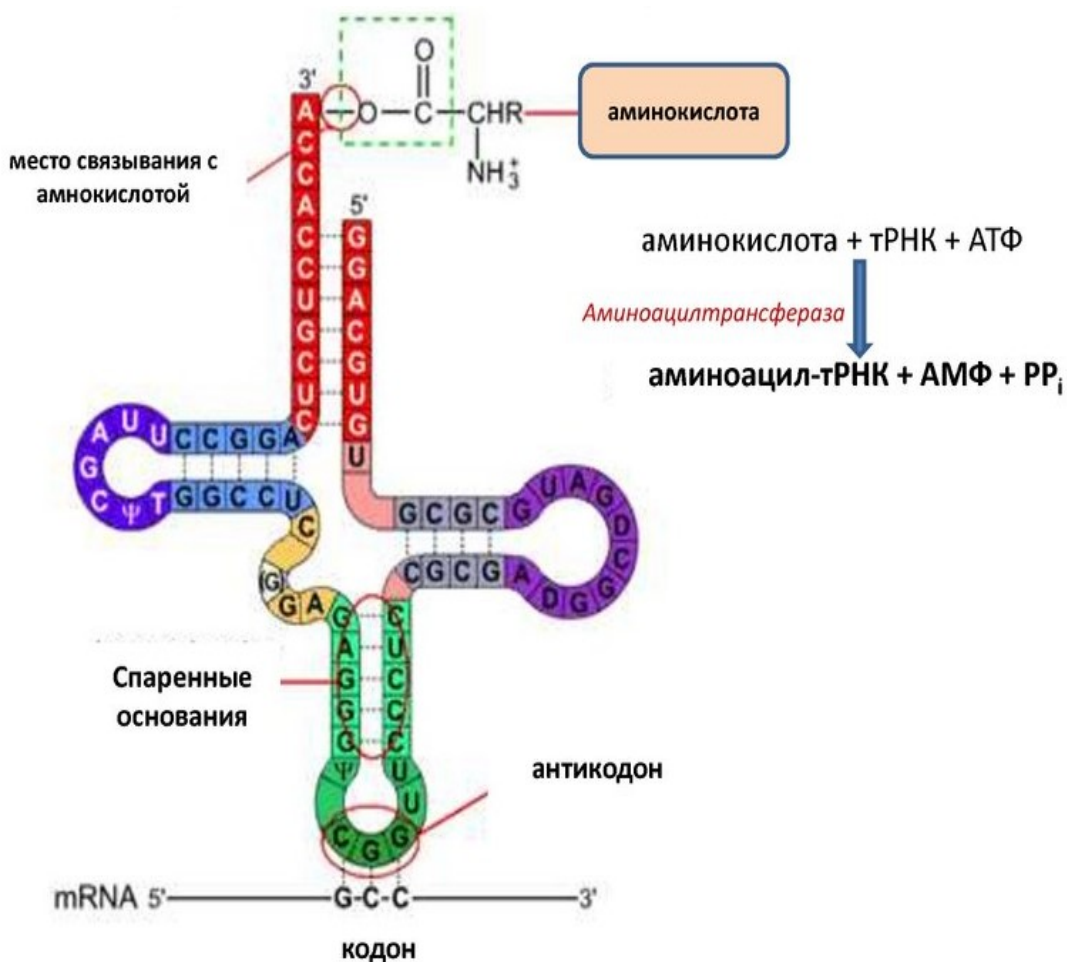
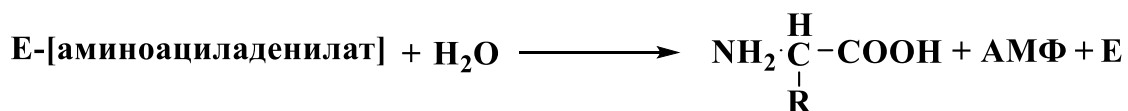


Рис. 30. Обобщенная структура аминокислот-тРНК

Аминоацил-тРНК-синтетазы очень специфичны в отношении как тРНК, так и соответствующей ей аминокислоты. Если к тРНК присоединяется неправильная аминокислота и образуется ошибочная аминокислот-тРНК, то неправильный аминокислотный остаток включается в полипептидную цепь; но этого не происходит: фермент исправляет ошибки еще на первой стадии, гидролизуя аминокислотаденилат:

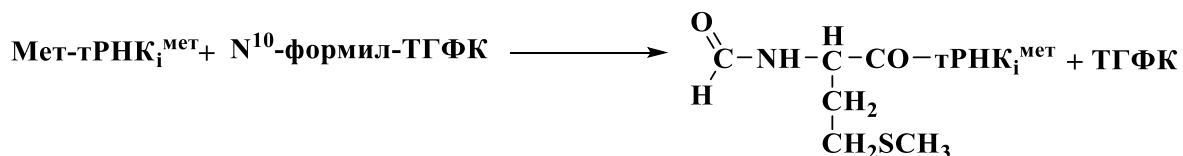


По-видимому, у аминоацил-тРНК-синтетаз есть четыре специфических участка, которые участвуют в узнавании, катализе и исправлении ошибок: один для аминокислоты, второй для тРНК, третий для АТФ и четвертый для воды, необходимой для гидролиза неправильных аминоациладенилатов.

После присоединения к соответствующей тРНК аминокислота уже не участвует в определении специфичности аминоацил-тРНК, так как сама по себе аминоацильная группа не узнается ни рибосомой, ни мРНК. Специфичность аминоацил-тРНК обеспечивается исключительно структурой тРНК.

Синтез полипептидов начинается с N-конца. Иницирующей аминокислотой у прокариот служит N-формилметионин, а у эукариот – метионин. В тех преобладающих случаях, когда N-концевая аминокислота зрелого белка отличается от метионина, последний удаляется в ходе процессинга.

В стадии инициации участвует специальная метиониновая тРНК, которая называется *инициаторной* и обозначается тРНК_i^{мет}. Наряду с ней, у всех организмов существует другая специфичная к метионину тРНК, *элонгаторная тРНК₃^{мет}*. У прокариот метионин, связанный с инициаторной тРНК, формулируется по α-аминогруппе по реакции,



катализируемой ферментом метионил-тРНК-формилтрансферазой, небелковой частью ее является формилтетрагидрофолевая кислота. *Биосинтез белка происходит в рибосомах.* В каждой клетке *E.coli* имеется больше 15000 рибосом, которые составляют почти четверть сухого веса клетки.

Рибосомы прокариот состоят из двух субчастиц неравного размера – большой с коэффициентом седиментации 50S и малой с коэффициентом седиментации 30S (70S -рибосома) (рис. 31). В состав 50S-субчастицы входит одна молекула 23S-р-РНК (~3200 нуклеотидов), одна молекула 5S-р-РНК (~120 нуклеотидов) и 34 белка. Субчастица 30S содержит одну молекулу 16S-р-РНК (1600 нуклеотидов) и 21 белок. Все белки рибосом *E.coli* выделены, многие из них секвенированы. Рибосомы эукариот имеют более крупные размеры и сложнее устроены (80S рибосомы). Они так же, как и прокариотические рибосомы, состоят из двух субчастиц, размер которых варьируется у разных видов, но в среднем равен 60S и 40S. Всего эукариотические рибосомы содержат свыше 70

белков; рРНК и большинство белков эукариотических рибосом также выделены и охарактеризованы. Две субчастицы рибосомы соединены друг с другом не все время. Каждый раз, когда начинается синтез новой полипептидной цепи, рибосомы должны диссоциировать на субчастицы.

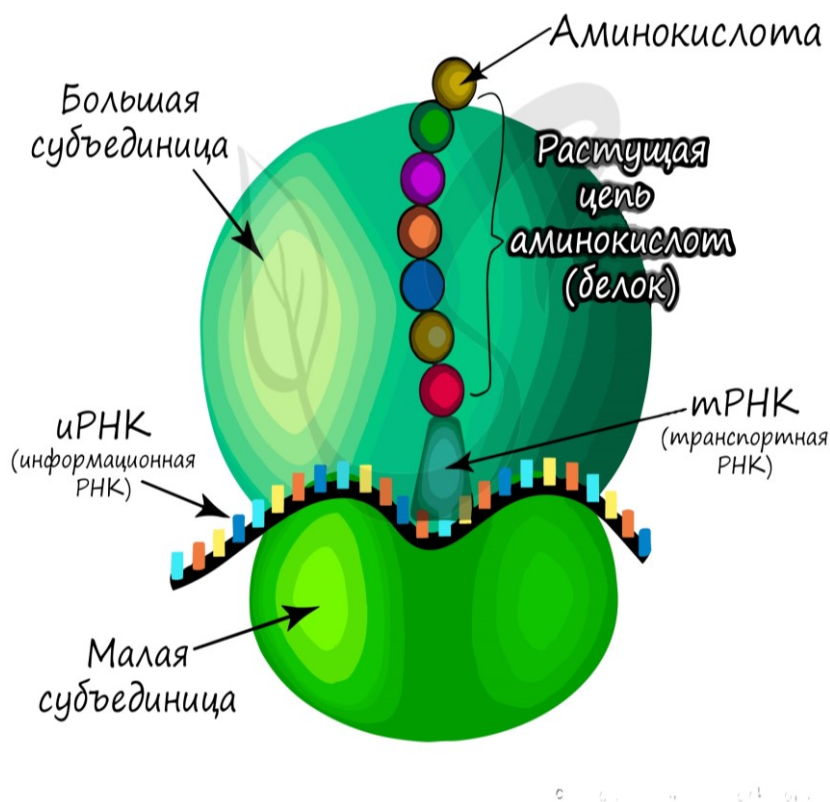


Рис. 31. Рибосома

Для инициации полипептидной цепи в клетках прокариот необходимы:

- 1) 30S-субчастица, содержащая 16S-рРНК;
- 2) мРНК, кодирующая синтезируемый полипептид;
- 3) иницирующая N-формилметионин-тРНК^{f-мет};
- 4) три белка, называемые **факторами инициации** (IF-1; IF-2; IF-3); 5) ГТФ.

Процесс **инициации биосинтеза** протекает в три стадии (рис. 32).

На первой стадии 30S-субчастица связывается с фактором IF-3, который препятствует объединению субчастиц. Затем к 30S-субчастице, связанной с фактором 3, присоединяется мРНК таким образом, что иницирующий кодон мРНК 5'AUG3' связывается с определенным участком 30S-рибосомы. Правильное расположение иницирующего кодона AUG на 30S-субчастице обеспечивается с помощью особого иницирующего сигнала, представляющего собой участок мРНК, расположенной с 5'-стороны от кодона AUG. Этот сигнал состоит из остатков А и G и включает обычно от 6 до 8 нуклеотидов. Он узнается комплементарной последовательностью 16S-рРНК 30S-субчастицы. Это

указывает на место, с которым должна связаться формилметионил-тРНК^{f-мет}. Внутренние кодоны AUG специфичны по отношению к метионил-тРНК^{мет} и не способны связывать метионил-тРНК^{f-мет}.

На второй стадии комплекс, состоящий из 30S-IF₃ и мРНК, увеличивается в результате связывания с IF-1 и IF-2, уже связанными с GTP и с иницирующей N-формилметионил-тРНК^{мет}, которая попадает на иницирующий кодон AUG.

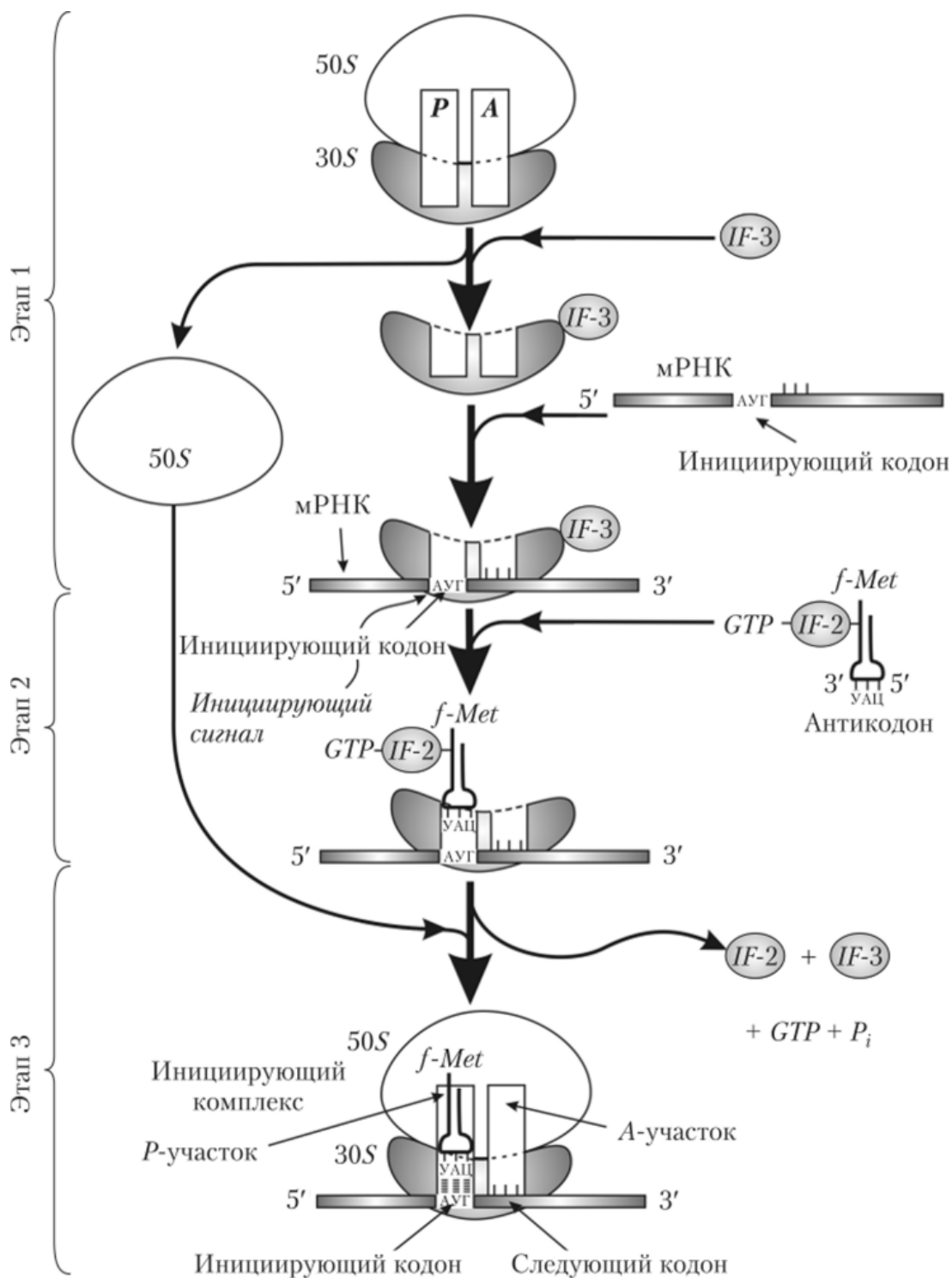


Рис. 32. Три стадии процесса образования иницирующего комплекса, протекающего за счёт гидролиза GTP до GDP и Pi IF-1, IF-2 и IF-3 – факторы инициации. Буквами P и A обозначены соответственно пептидный и аминокислотный участки рибосомы

На третьей стадии инициации этот комплекс взаимодействует с 50S-субчастицей, одновременно GTP, связанная с JF-2, гидролизует до GDP и фосфата и высвобождается из рибосомы. Факторы инициации тоже покидают рибосому. Теперь имеется функционально активная 70S рибосома, которая называется **иницирующим комплексом**. Она содержит м-РНК и иницирующую N-формилметионил-тРНК^{f-met}. В рибосоме имеется два участка связывания аминоксил-тРНК: аминоксил-, или А-участок, и пептидил-, или Р-участок. Иницирующая формилметионил-тРНК может связываться только с Р-участком. Все остальные вновь поступающие аминоксил-тРНК присоединяются к А-участку, тогда как Р-участок – это такое место рибосомы, с которого уходят «пустые» тРНК и к которому прикрепляется растущая пептидил-тРНК (рис. 14).

Молекулы тРНК располагаются на рибосоме таким образом, что взаимодействуют с обеими субъединицами, причем на большой субъединице в районе пептидилтрансферазного центра сближены их 3'-концевые СРСРА фрагменты, а на малой субъединице – вблизи их антикодоновой петли.

Элонгация

Присоединение каждого аминокислотного остатка к растущей цепи происходит в три стадии. Этот цикл повторяется столько раз, сколько остатков следует присоединить. Для элонгации необходимы:

- полученный выше на стадии иницирования иницирующий комплекс;
- следующая аминоксил-тРНК, соответствующая следующему триплету РНК;
- три растворимых белка цитоплазмы, называемые **факторами элонгации** – EF-Tu, EF-Ts и EF-G;
- GTP.

На первой стадии цикла элонгации происходит связывание следующей аминоксил-тРНК с комплексом, состоящим из EF-Tu и GTP. Образуется тройной комплекс. Аминоксил-тРНК-Tu-GTP соединяется с иницирующим комплексом. При этом происходит гидролиз GTP, и комплекс Tu-GDP покидает рибосому, после чего с помощью GTP и фактора Ts комплекс Tu-GDP восстанавливается до Tu-GTP. Аминоксил-тРНК связывается с А-участком рибосомы в результате антипараллельного комплементарного взаимодействия антикодона новой аминоксил-тРНК и соответствующего кодона матричной РНК. Точное соответствие проверяется с помощью еще одного контакта внутри А-участка между другой частью молекулы тРНК и рРНК. Следующая стадия элонгации наступает только в том случае, если оба контакта оказываются правильными (рис. 15).

На второй стадии элонгации происходит перенос иницирующего N-формилметионинового остатка от несущей его т-РНК к аминокгруппе новой аминокислоты, которая только что попала на А-участок. Этот перенос катализируется пептидилтрансферазой, особым ферментом, входящим в состав 50S-субчастицы (рис. 33).

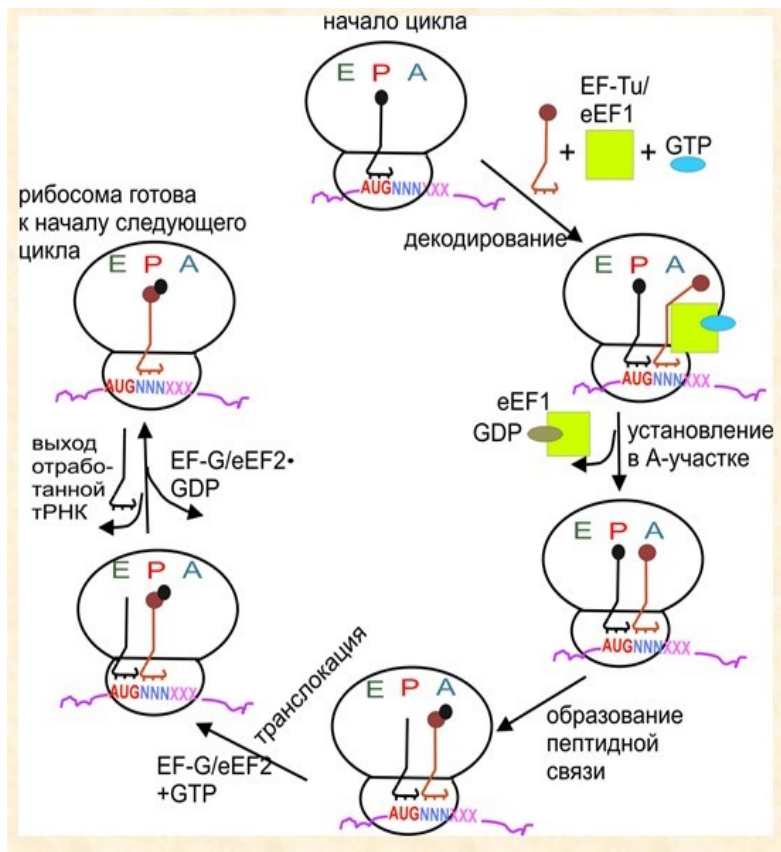


Рис. 33. Цикл элонгации полипептидной цепи

В результате такого переноса образуется пептидная связь. На Р-участке остается «пустая», ненагруженная иницирующая тРНК^{t-met}.

На третьей стадии цикла элонгации рибосома перемещается вдоль мРНК по направлению к ее 3'-концу на расстояние в один кодон (на триплет). При этом происходит перемещение дипептида на Р-участок, в результате чего свободная тРНК отделяется от Р-участка и уходит в цитозоль, а А-участок рибосомы становится свободным и содержит третий кодон мРНК. Движение рибосомы в 3'-сторону мРНК называется «транслокацией». На этой стадии необходим фактор элонгации G (транслоказа) и гидролиз еще одной молекулы GTP (рис. 33).

Рибосомы являются точками приложения действия ряда антибиотиков, в том числе таких широко используемых в медицинской практике, как стрептомицин, хлорамфеникол, тетрациклин. Бактерицидное действие первых двух связано с их способностью специфично взаимодействовать только с прокарио-

тическими рибосомами. Стрептомицин связывается с малой субъединицей, хлорамфеникол – с большой субъединицей вблизи пептидилтрансферазного центра рибосомы, подавляя тем самым биосинтез белков у бактерий и не затрагивая биосинтеза человека или животных. Тетрациклин обладает способностью взаимодействовать с малыми субъединицами в А-участках как прокариотических, так и эукариотических рибосом. Этим он препятствует отбору аминокил-тРНК в А-участке и блокирует белковый синтез. Однако клеточные мембраны животных для тетрациклина непроницаемы, и при введении его в живой организм избирательно подавляется именно биосинтез бактерий.

Генетический код

Информация о последовательности аминокислот в полипептидной цепи белка записана в молекуле мРНК, а следовательно, и в соответствующем участке одной из цепей ДНК в виде последовательностей, кодирующих эти аминокислоты тринуклеотидных фрагментов – кодонов. Необходимость как минимум трех нуклеотидов для кодирования каждой из 20 аминокислот вытекает из очевидных математических расчетов: число сочетаний из четырех по три. Соответствие между 64 кодонами и 20 аминокислотами, участвующими в биосинтезе полипептидов на рибосомах, получило название *генетического кода*. Первое доказательство самого факта существования генетического кода и первые шаги к его расшифровке были получены в эксперименте Ниренберга и Маттеи (1961 г). Они на основе экспериментальных данных сделали вывод, что триплет UUU кодирует фенилаланин, триплет CCC – пролин, триплет AAA – лизин. Полная расшифровка генетического кода стала возможной в результате успехов, достигнутых в работах Корана по синтезу олигорибонуклеотидов, что позволило получить весь набор кодонов. Было найдено, что в присутствии каждого из кодонов, за исключением кодонов UAA, UAG, UGA, с рибосомами связывается тРНК, несущая определенную аминокислоту. Этим все кодоны были приведены в соответствие с одной из 20 аминокислот. Полная структура генетического кода приведена в таблице 34.

Коды считываются в направлении 5'–3'. Третье основание в кодоне менее специфично, чем первые два. Всем аминокислотам, кроме метионина и триптофана, соответствует больше одного кодона (код вырожденный). Как видно из таблицы 34, распределение аминокислот по кодонам весьма неравномерно. «Слова» аминокислотного кода в том виде, в каком они записаны в ДНК, комплементарны кодовым словам мРНК, но антипараллельны им и содержат остатки Т в положениях, комплементарных А, и остатки А в положениях, комплементарных U (рис. 34).

		В Т О Р О Й Н У К Л Е О Т И Д											
		U		C		A		G					
ПЕРВЫЙ НУКЛЕОТИД	U	UUU	Phe	F	UCU		UAU	Tyr	UGU	Cys	C	ТРЕТИЙ НУКЛЕОТИД	
		UUC	Phe		UCC	Ser	S	UAC	Tyr	O	C		
		UUA	Leu		UCA			UAA	Term	UGA	Term		A
		UUG	Leu		UCG			UAG	Term	UGG	Trp		W
	C	CUU	Leu		CCU			CAU	His	H	CGU		U
		CUC	Leu	L	CCC	Pro	P	CAC	His		CGC	Arg	C
		CUA	Leu		CCA			CAA	Gln	Q	CGA		A
		CUG	Leu		CCG			CAG	Gln		CGG		G
	A	AUU	Ile		ACU			AAU	Asn	N	AGU	Ser	U
		AUC	Ile	I	ACC	Thr	T	AAC	Asn		AGC	Ser	C
		AUA	Ile		ACA			AAA	Lys	K	AGA	Arg	R
		AUG	Met	M	ACG			AAG	Lys		AGG	Arg	G
	G	GUU	Val		GCU			GAU	Asp	D	GGU		U
		GUC	Val	V	GCC	Ala	A	GAC	Asp		GGC	Gly	G
		GUA	Val		GCA			GAA	Glu	E	GGA		A
		GUG	Val		GCG			GAG	Glu		GGG		G

Рис. 34. Генетический код

Например:

5' – СТТАСГТАССАТАААСГСААСС – 3' ДНК
 3' – GAAUGCAUGGUAUUUGCGUUGG – 5' РНК
 м-РНК 5' – GGUUGCGUUUAUGGUACGUAAG -3'.

Свойства генетического кода

- В коде отсутствуют знаки препинания, поэтому рамка считывания должна быть правильно установленной в начале прочтения молекулы мРНК, а затем должна двигаться последовательно от одного триплета к следующему. Если исходная рамка считывания «сбита» на один или два нуклеотида или же рибосома случайно пропустила один нуклеотид в мРНК, все последующие кодоны выйдут из правильной рамки и это приведет к образованию полипептида с искаженной аминокислотной последовательностью;
- Из 64 возможных триплетов три (UAG, UAA, UGA) не кодируют ни одну из аминокислот – это нонсенс-кодоны, которые сигнализируют об окончании синтеза полипептида. Кодон AUG представляет собой иницирующий кодон и у прокариот, и у эукариот; кроме того, во внутренних положениях полипептидной цепи он кодирует метионин.
- Кодовые «слова» аминокислот одинаковы у всех изученных организмов, включая человека, бактерии, растения, земноводных и вирусы. Создается впечатление, что все виды растений и животных имели общего эволюционного предшественника с одним генетическим кодом, полностью сохранившимся на протяжении всей биологической эволюции. Таким образом, код практически универсален. Однако появились факты, которые говорят о том,

что в некоторых случаях при синтезе белка митохондриями в присутствии рибосом, тРНК и мРНК митохондриального происхождения ряд аминокислотных кодонов используется не в соответствии с их значением по стандартному кодовому «словарю».

Терминация

Терминация – окончание биосинтеза полипептида – наступает после присоединения рибосомой последней аминокислоты. О терминации сигнализирует один из трех терминирующих кодонов мРНК (UAA, UAG, UGA). Их называют **бессмысленными триплетами** (нонсенс-триплетами). При этом начинают действовать три терминирующих фактора (факторы освобождения, рилизинг-факторы) – белки R_1 , R_2 , S.

Они вызывают:

- 1) гидролитическое отщепление полипептида от конечной тРНК и его освобождение;
- 2) отделение от Р-участка последней, теперь уже пустой тРНК;
- 3) диссоциацию 70S-рибосомы на 30S- и 50S-субчастицы, готовые к синтезу новой полипептидной цепи. Фактор R_1 узнает кодоны UAA или UAG. Вторым фактором освобождения (R_2) узнает UAA или UGA. Связывание одного из факторов освобождения с терминирующим кодоном в А-участке активирует пептидилтрансферазу, и она гидролизует связь между полипептидом и тРНК в Р-участке. Происходит изменение специфичности пептидилтрансферазы таким образом, что акцептором активированного пептидильного остатка становится H_2O , а не аминогруппа.

Часто рибосомы собраны в группы, состоящие из нескольких десятков рибосом. Это **полирибосомы**, или **полисомы**. Они были изучены с помощью электронного микроскопа, а также химическим путем.

Под действием рибонуклеазы полисомы разобщаются на отдельные рибосомы. Это указывает на то, что они удерживаются с помощью цепи РНК. Итак, мРНК одновременно транслируется многими рибосомами, расположенными довольно близко друг к другу. Такая одновременная трансляция одной мРНК многими рибосомами значительно увеличивает эффективность использования матрицы (рис. 35).

Процессы транскрипции и трансляции в бактериях очень тесно сопряжены. Рибосомы могут начать транслировать мРНК, когда та еще продолжает синтезироваться ДНК-зависимой РНК-полимеразой (рис. 36). Другая особенность белкового синтеза в бактериях заключается в том, что время жизни молекул мРНК очень мало, всего несколько минут: они быстро разрушаются нуклеазами. Чтобы синтез белка поддерживался на одном уровне, мРНК для данного

белка или для группы белков должна синтезироваться постоянно и использоваться с максимальной эффективностью. Короткое время жизни мРНК у прокариот позволяет быстро выключать синтез белка, который больше не нужен.

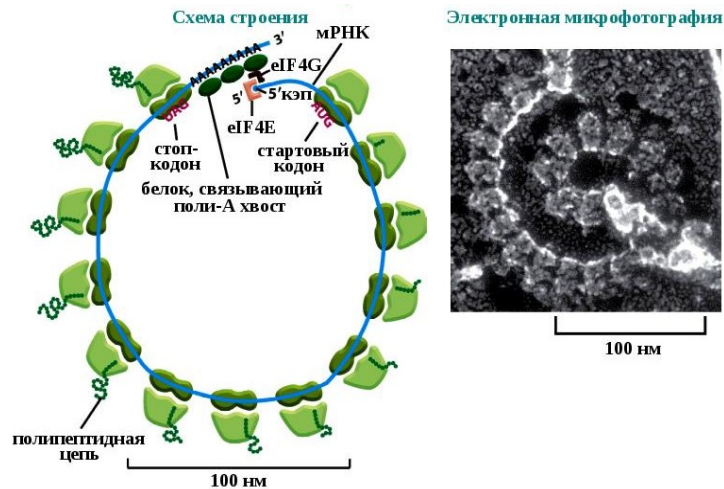


Рис. 35. Полирибосома. Рибосомы одновременно считывают информацию, содержащуюся в молекуле мРНК, передвигаясь по ней от 5'к 3'-концу

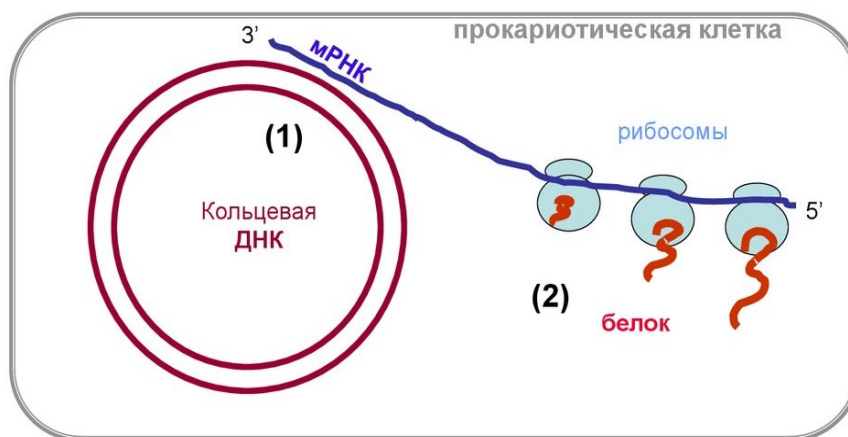


Рис. 36. Сопряжение процессов транскрипции и трансляции у бактерий

У прокариот транскрипция (1) и трансляция (2) не разделены в пространстве и во времени. Еще до окончания транскрипции ДНК РНК-полимеразой образующая мРНК начинает транслироваться рибосомами. Это оказывается возможным благодаря тому, что в бактериях мРНК не надо транспортировать из ядра в клетку.

Процессинг полипептидных цепей

Полученная таким образом полипептидная цепь остается биологически неактивной до тех пор, пока она не свернется с образованием присущей ей нативной конформации, которая определяется аминокислотной последовательностью. В какой-то момент – во время синтеза полипептидной цепи или после его

завершения – белок самопроизвольно по законам термодинамики принимает свою нативную конформацию. Однако часто новообразованная полипептидная цепь не может принять окончательную биологически активную конформацию, пока она не подвергнется процессингу или ковалентной модификации. Изменения в ходе этих процессов получили названия **посттрансляционной модификации**. У разных белков процессинг протекает по-разному.

Процессы, которые могут протекать в результате ковалентной модификации:

- **Модификация N-конца и C-конца.** С помощью специфических ферментов с N-конца удаляются N-формилметионин у прокариот, метионин у эукариот и часто несколько следующих аминокислот;

- **Удаление сигнальных последовательностей.** Некоторые белки содержат на N-конце дополнительную полипептидную последовательность из 15–30 остатков, которая направляет этот белок к месту его назначения в клетке. Одни белки поступают в цитоплазму, другие направляются к различным клеточным органеллам, третьи секретируются из клетки (инсулин, глюкагон), четвертые встраиваются в ту или иную клеточную мембрану, где работают в качестве транспортных белков или ферментов мембраны. Важно, чтобы вновь синтезированный белок нашел путь к предназначенному для него месту в клетке. Белки, синтезируемые рибосомами шероховатого эндоплазматического ретикула в клетках поджелудочной железы и экспортируемые из этих клеток (трипсиноген, прокарибксопептидаза), имеют на N-конце лидирующие последовательности, содержащие в аминокислотных остатках гидрофобные R-группы. Такие лидеры узнаются особыми рецепторными участками на внешней поверхности эндоплазматического ретикула, причем это происходит даже раньше, чем рибосома полностью завершит синтез белка. Гидрофобная растворимая часть этой последовательности проникает сквозь мембрану внутрь цистерн эндоплазматического ретикула, протаскивая за собой растущую полипептидную цепь. Внутри цистерн под действием особой пептидазы отщепляется сигнальная последовательность. После этого зрелый белок направляется в аппарат Гольджи, инкапсулируется и в виде секреторного пузырька покидает клетку;

- **Фосфорилирование гидроксикаминокислот.** В ряде белков гидроксильные группы некоторых сериновых, треониновых, пирозиновых остатков подвергаются ферментативному фосфорилированию с участием АТФ (например, казеин молока);

- **Карбоксилирование.** К остаткам аспарагиновой и глутаминовой кислот в ряде белков могут присоединяться дополнительные карбоксильные группы. Например, белок системы свертывания крови протомбин содержит в своей N-концевой области несколько остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты, кото-

рые включаются в белок при помощи фермента, зависящего от витамина К. Карбоксильные группы связывают ионы Ca^{2+} , необходимые для запуска механизма свертывания крови;

- **Метилирование групп.** В ряде белков определенные остатки лизина подвергаются ферментативному метилированию. Остатки монометил- и диметиллизина обнаруживаются в некоторых мышечных белках и цитохроме С. В других белках метилированию подвергаются карбоксильные группы ряда остатков глутаминовой кислоты, что приводит к нейтрализации их отрицательных зарядов;

- **Присоединение боковых углеводных цепей.** Боковые углеводные цепи гликопротеинов ковалентно присоединяются к полипептиду во время или после синтеза последнего. В одних гликопротеинах боковая углеводная цепь прикрепляется с помощью ферментов к остаткам аспарагиновой кислоты, а других – серина или треонина. Многие белки, которые работают вне клетки, а также «смазочные» протеогликианы, покрывающие слизистые оболочки, содержат боковые олигосахаридные цепи;

- **Добавление простетических групп.** В состав многих ферментов входят обязательные для их активности ковалентно связанные с белком простетические группы. Примеров таких простетических групп много (биотин, ковалентно связанный с ацетил-КоА-карбоксилазой; гемовая группа цитохрома С);

- **Образование дисульфидных мостиков.** Во многих белках, предназначенных для выхода из клетки в процессе формирования их нативной конформации, появляются поперечные шивки в результате ферментативного образования дисульфидных мостиков между остатками цистеина. Дисульфидные мостики могут быть между различными полипептидами или в одной полипептидной цепи (инсулин, химотрипсин и др.).

Регуляция биосинтеза белка

Живые клетки имеют точно запрограммированные механизмы, регулирующие синтез различных белков таким образом, что в любой клетке присутствует определенное количество молекул каждого белка. ДНК бактерии *E. coli* содержит гены для более чем 3000 различных белков. Однако 3000 белков бактерии присутствуют в клетке не в одинаковых количествах. Некоторые белки существуют в незначительном количестве копий, тогда как количество других постоянно и достаточно велико. Благодаря регуляции синтеза ферментов в клетках любого типа создается «правильный» набор ферментов, обеспечивающих нормальное протекание основных клеточных процессов. Регуляция позволяет бактериям экономно использовать аминокислоты для синтеза тех белков, которые нужны им лишь в очень малых количествах или только изредка.

У высших организмов процессы регуляции белкового синтеза значительно сложнее. Хотя каждая клетка эукариот содержит полный геном данного организма, в клетках данного типа экспрессируется только часть структурных генов. Почти во всех клетках высших животных присутствуют наборы основных ферментов, необходимые для реализации главных путей метаболизма. Однако клетки разных типов, например, клетки мышц, мозга, печени, содержат свойственные только им структуры и выполняют только им присущие биологические функции, реализация которых обеспечивается наборами специализированных белков. Биосинтез разных наборов специализированных белков должен быть точно запрограммирован в последовательности и времени их появления в ходе строго упорядоченной дифференцировки и роста высших организмов. Пока не все известно о регуляции экспрессии генов в эукариотических организмах с их многочисленными хромосомами. Однако сегодня наука располагает значительной информацией о регуляции синтеза белка у прокариот.

Бактерии содержат конститутивные и индуцируемые ферменты. Конститутивные ферменты присутствуют в бактериальных клетках в постоянных количествах независимо от метаболического состояния организма (ферменты гликолиза). Концентрация индуцируемых ферментов меняется, они синтезируются только по мере надобности, когда в среду добавляют его субстрат, особенно если этот субстрат является единственным источником углерода. Таким ферментом может быть β -галактозидаза, которая способствует расщеплению лактозы на глюкозу и галактозу. В обычных условиях, когда в среде есть глюкоза, бактерия *E.coli* лактозу не усваивает, так как фермента β -галактозидазы очень мало (~ 5 молекул). Однако если поместить *E.Coli* в среду с лактозой в качестве единственного источника углерода и энергии, то через 1–2 мин клетки начинают синтезировать фермент β -галактозидазу в больших количествах (~1000 молекул на одну клетку). Если в среду добавить глюкозу, синтез фермента β -галактозидазы прекращается. Таким образом, индуцируемые ферменты синтезируются только тогда, когда в них есть необходимость. Индукция – очень экономичный процесс. Вещество, способное индуцировать синтез ферментов или группы ферментов, называют индуктором (лактоза в данном случае). При добавлении лактозы в среду, не содержащую глюкозы, бактерия кроме β -галактозидазы начинает синтезировать два родственных белка: β -галактозидпермиазу, необходимую для прохождения лактозы через клеточную мембрану, и β -галактозидтрансацилазу, катализирующую перенос ацетильного остатка от ацетилКоА на галактозу. Значение этого фермента при использовании клетками лактозы неизвестно. Если один индуктор (лактоза) вызывает синтез группы связанных между собой ферментов, то такой процесс называется **координированной индукцией**.

Другой важный тип изменения концентрации ферментов в бактериальной клетке, противоположной по своему проявлению индукции ферментов, – репрессия ферментов. Когда клетки бактерии *E. coli* растут в среде, содержащей в качестве единственного источника азота соль аммония, им приходится синтезировать все азотсодержащие соединения из иона NH_4^+ и углерода. Такие клетки должны иметь все ферменты для синтеза 20 аминокислот. Если же в среду добавить одну какую-нибудь аминокислоту (гистидин), то клетка перестает вырабатывать весь набор ферментов, необходимых для синтеза гистидина из NH_4^+ , а для остальных 19 аминокислот синтез ферментов продолжается. Выключение синтеза ферментов, ответственных за образование гистидина, вызванное добавлением гистидина, называется **репрессией** ферментов.

Молекулярные и генетические связи между индукцией и репрессией ферментов прояснились в результате генетических исследований Франсуа Жакоба и Жака Моно. Их классическая работа по индукции β -галактозидазной активности привела к формулировке гипотезы оперона для объяснения генной регуляции. Гипотеза получила полное подтверждение. Регуляция биосинтеза у бактерий происходит на уровне транскрипции, т. е. на стадии синтеза мРНК.

Жакоб и Моно предположили, что три структурных гена – *z*, *y*, *a* – на ДНК, кодирующие синтез индуцируемых лактозой ферментов, расположены рядом в хромосоме *E. coli*. В ДНК около этих генов находится ингибиторный участок (регуляторный ген – *i*-ген), который способен ингибировать транскрипцию трех структурных генов – *z*, *y*, *a*. Регуляторный ген кодирует аминокислотную последовательность белка-репрессора. Когда *i*-ген транскрибируется с образованием мРНК, на последней рибосоме синтезируется белок-репрессор. Белок-репрессор способен связываться с участком ДНК, называемым оператором, который расположен рядом со структурными генами. Было высказано предположение, что связывание репрессора с операторным участком ДНК подавляет катализируемый РНК-полимеразой процесс транскрипции трех структурных генов. Вследствие отсутствия матрицы синтеза белков-ферментов не происходит. Далее Жакоб и Моно предположили, что индуктор (лактоза) связывается со вторым специфическим участком белка-репрессора, при этом образуется индуктор-репрессорный комплекс, что приводит к снижению сродства репрессора к операторному участку ДНК и освобождению последнего. Структурные гены оказываются доступными для транскрипции, и РНК-полимераза синтезирует с них мРНК. мРНК используется для синтеза белков-ферментов в рибосомах, в результате чего клетка получает возможность утилизировать лактозу в качестве источника углерода и энергии. Как только лактоза исчезает, индукторно-репрессорный центр распадается, белок-репрессор возвращается в свое активное состояние и присоединяется к оператору. Структур-

ные гены перестают транскрибироваться, синтез белков прекращается. Три структурных гена с их оператором были названы *опероном*. В данном случае *lac-опероном*.

В настоящее время гипотеза Жакоба и Моно полностью подтверждена. Известно большое число регулируемых оперонов. Lac-оперон изучен лучше всего. Lac-репрессор – тетрамерный белок. Это четыре идентичных субъединицы с массой 37 кДа, каждая из которых имеет один участок связывания с индуктором, имеется участок связывания с оператором. Связывание репрессора с оператором очень прочное. Одним из наиболее сложных оперонов является гистидиновый оперон. Он состоит из девяти структурных генов, кодирующих набор ферментов, необходимых для биосинтеза гистидина в бактериальной клетке. Регуляторный ген his-оперона кодирует белок-репрессор, который присоединяется к his-оператору и тем самым препятствует транскрипции всех девяти белков оперона в условиях, когда в среде присутствует достаточное количество гистидина.

Итак, если в среде присутствует лактоза и нет глюкозы, то индуктор, соединяясь с репрессором, «снимает» его с оператора и тем самым дает возможность транскрибироваться lac-генам и соответственно синтезироваться lac-белкам.

Предположим теперь, что в среде есть лактоза и есть глюкоза. В этих условиях *E. Coli* использует только глюкозу, пренебрегая лактозой. Клетки перестают синтезировать lac-белки. Репрессия синтеза lac-белков глюкозой называется *катаболитной репрессией*. В дополнение к *i*-гену и оператору (*o*-участок) в ДНК существует еще один регуляторный участок – промотор (*p*-участок, между геном *i* и оператором). Промотор состоит из двух функционально различных частей. Рядом с оператором находится «вход для РНК-полимеразы», т. е. участок, в котором происходит первоначальное связывание РНК-полимеразы. Второй участок промотора – специфический участок связывания другого регуляторного белка – белка, активирующего катаболитный ген (БАК, CAP-анг). Эта часть держит под контролем «вход для РНК-полимеразы». Если в среде нет глюкозы, то в клетке формируется комплекс между БАК и цАМФ. Этот комплекс соединяется с БАК-участком (CAP-участок) ДНК и дает возможность РНК-полимеразе попасть на участок первоначального связывания. Если в среде есть лактоза, то *o*-участок свободен, РНК-полимераза перемещается от своего первоначального места через область оператора и начинает транскрибировать три lac-гена. Короче говоря, БАК-участок обеспечивает доступность участка первоначального связывания РНК-полимеразы, только будучи соединенным с комплексом БАК-цАМФ.

Если же в среде присутствует глюкоза, то концентрация ц-АМФ [ц-АМФ] сильно снижается и комплекс БАК с цАМФ не образуется и БАК участок ДНК не может обеспечить доступность участка первоначального связывания РНК-полимеразе: она не присоединяется на промоторный участок и *lac*-гены не транскрибируются.

У бактерии *E. Coli* цАМФ служит посредником: он сигнализирует о том, есть ли в ростовой среде глюкоза. Клетки *E. Coli* содержат фермент аденилатциклазу, который катализирует образование ц-АМФ из АТФ; в этих клетках имеется также фосфодиэстераза, которая гидролизует ц-АМФ и тем самым инактивирует его. Увеличение или уменьшение активности этих ферментов связано каким-то образом с концентрацией глюкозы в среде. Таким образом, повышение [ц-АМФ] – это «сигнал голода». Последующие биохимические и генетические исследования показали, что циклический АМФ стимулирует иницирование транскрипции многих индуцибельных оперонов. В БАК-белке имеется как в репрессоре два центра: первый – для связывания с БАК-участком промотора и второй для связывания ц-АМФ. БАК-белок представляет собой димер из субъединиц массой 22кДа.

Большая часть *lac*-оперона *E. Coli* уже определена. Известна полная нуклеотидная последовательность оператора и промотора. Весь промотор состоит из 85 нуклеотидных пар, причем на долю БАК-участка приходится 38, а на долю участка первоначального связывания РНК-полимеразы – около 40 пар оснований.

Кроме оперонов с их регуляторными генами бактерии обладают и другими механизмами регуляции биосинтеза. В некоторых случаях регуляция осуществляется за счет постепенного снижения скорости синтеза белка (аттенуация). Например, транскрипция триптофан-оперона регулируется участком контролируемой терминации, называемым **аттенюатором**. Он локализован между оператором и геном первого фермента пути биосинтеза триптофана. Из всего сказанного ясно, что бактерии обладают тончайшими механизмами регуляции синтеза своих ферментов, позволяющими им оптимизировать свой метаболизм в соответствии с принципом максимальной экономии.

Примерные тестовые задания по теме «Аминокислоты и белки»

1. Напишите структурную формулу пентапептида следующего строения:
Гис–Три–Лиз–Про–Ала.
2. При идентификации N-концевого аминокислотного остатка используется:
 - а) метод Эдмана;
 - б) метод Сэнгера.
3. Напишите формулы нейтральных протеиногенных аминокислот.
4. Нативная структура белка определяется:
 - а) первичной структурой;
 - б) вторичной структурой;
 - в) третичной структурой.
5. Разные уровни структурной организации белков стабилизированы определенными типами связей. Подберите к каждому пронумерованному типу связи буквенный ответ:
 1. Ковалентные связи между карбоксильными и аминогруппами радикалов аминокислот
 2. Связь между α -амино- и α -карбоксигруппировками аминокислот
 3. Связь между радикалами цистеина
 4. Водородные связи между пептидными группировками
 5. Водородные связи между радикалами аминокислот
 6. Гидрофобные взаимодействия радикалов аминокислот

А-Первичная структура
Б-Вторичная структура
В-Третичная структура
6. Расположите элементы структуры белковой молекулы в той последовательности, в которой они возникают при синтезе белка и формировании его нативной конформации:
 - а) объединение протомеров в олигомерный белок;
 - б) формирование α -спиралей и β -складчатых участков;
 - в) образование пептидных связей;
 - г) образование гидрофобных, водородных и ионных связей между радикалами аминокислот.

7. Перечислите аминокислоты, вступающие в реакцию с реактивом Фоля.
8. Какова особенность основных белков?
- а) преобладание дикарбоновых аминокислот;
 - б) равное соотношение диаминомонокрбоновых и моноаминодикарбоновых аминокислот;
 - в) преобладание диаминомонокрбоновых кислот;
 - г) белок состоит из моноамино- и монокрбоновых кислот.
9. Подберите к каждой из аминокислот соответствующее свойство радикала (подберите к буквам соответствующие цифры):
- | | |
|--------------------------|-------------------------------|
| 1. Триптофан | А-Гидрофильный, |
| 2. Аспарагиновая кислота | положительно заряженный. |
| 3. Цистеин | Б-Гидрофильный, |
| 4. Лейцин | отрицательно заряженный. |
| 5. Аргинин | В-Гидрофильный, незаряженный. |
| 6. Серин | Г-Гидрофобный. |
10. Связи, стабилизирующие α -спираль:
- а) водородные;
 - б) гидрофобные;
 - в) пептидные;
 - г) ионные.
11. Определите изоэлектрическую точку пептида при $pH < 7$
Про-Глу-Лиз-Илей
12. Напишите уравнения реакции синтеза следующих дипептидов:
глицилтриптофан;
фенилаланилцистеинилвалин.
13. Как будет мигрировать белок при проведении электрофореза в условиях, когда pH раствора имеет более щелочное значение, чем ИЭТ?
- а) к аноду;
 - б) к катоду;
 - в) остается на месте старта;
 - г) образует биполярный ион.
14. Вторичная структура – это:
- а) α -спираль, β -складчатость и аморфные участки;
 - б) конфигурация полипептидной цепи;
 - в) образование протомера;
 - г) способ взаимодействия нескольких протомеров в пространстве.
15. Домен – это:
- а) часть протомера, участвующая в функции связывания;

- б) мономер четвертичного белка;
- в) часть протомера, выполняющая сходные функции в разных белках;
- г) небелковая часть сложного белка.

16. Как тип четвертичной структуры влияет на характер выполняемой белком функции?

- а) определяет конформацию молекулы;
- б) формирует активный центр;
- в) обеспечивает кооперативный эффект.

17. Какие утверждения являются верными?

- а) расположение аминокислот в полипептидных цепях носит закономерный характер;
- б) для белков характерна высочайшая специфичность первичной структуры;
- в) все аминокислоты, встречающиеся в белках и пептидах, принадлежат к L-ряду;
- г) наличие в белковых молекулах каких-либо ковалентных связей, помимо пептидных, представляет собой редкое явление.

18. Укажите направление движения пептида лиз-гли-ала-лей в процессе электрофореза на бумаге при $pH=7.0$:

- а) к катоду;
- б) к аноду;
- в) останется на старте.

19. Чем определяется растворимость белка в водной среде?

- а) ионизацией белковой молекулы;
- б) гидратацией белковой молекулы при растворении;
- в) формой молекулы белка;
- г) наличием в структуре гидрофильных аминокислот.

20. Напишите реакцию Паули.

Примерные тестовые задания по теме «Ферменты»

1. Сложный фермент состоит из:
 - а) нуклеотидов;
 - б) глюкозы и ионов металлов;
 - в) аминокислот;
 - г) аминокислот и кофактора.
2. Активный центр фермента это:
 - а) участок фермента, отвечающий за связывание субстрата и образование продукта;
 - б) участок фермента, отвечающий за регуляцию активности;
 - в) участок фермента, отвечающий за связывание с клеточными структурами;
 - г) участок фермента, отвечающий за присоединение кофактора.
3. Ферменты ускоряют химические реакции:
 - а) снижением энергии активации;
 - б) повышением энергии активации;
 - в) повышением температуры реакции;
 - г) снижением температуры реакции.
4. Апофермент – это:
 - а) комплекс белка и кофактора;
 - б) белковая часть фермента;
 - в) ионы металла в составе фермента;
 - г) витамины, необходимые для работы фермента.
5. На скорость ферментативной реакции могут влиять следующие факторы:
 - а) концентрация фермента;
 - б) концентрация субстрата;
 - в) pH;
 - г) температура;
 - д) действие ингибиторов (активаторов).
6. Киназы катализируют реакции:
 - а) перенос фосфатной группы от молекулы донора к акцептору;
 - б) присоединения воды к молекулам;
 - в) образование С-О связей в молекулах;
 - г) переноса групп внутри молекулы.
7. В основе энзимодиагностики лежат следующие особенности состава и распределения ферментов в организме человека:
 - а) состав ферментов у взрослого человека в основном постоянен;
 - б) состав ферментов у взрослого человека может меняться при болезнях;

в) более специфичным для тканей является соотношение разных ферментов и изоферментов;

г) метаболические пути в тканях схожи и есть несколько тканеспецифических ферментов.

8. Участок молекулы фермента, отвечающий за присоединение субстрата:

а) каталитический центр;

б) субстратный центр;

в) аллостерический центр;

г) активный центр.

9. Аминокислоты, входящие в активный центр фермента, располагаются:

а) в разных участках полипептидной цепи;

б) в середине полипептидной цепи;

в) на С-конце полипептидной цепи;

г) непрерывно друг за другом в одном участке полипептидной цепи.

10. Какие связи преимущественно образуются между ферментом и субстратом при формировании субстрат-энзимного комплекса?

а) водородные;

б) пептидные;

в) ионные;

г) дисульфидные.

11. Ферменты, участвующие в разрыве -С-С-связей без участия воды, относятся к классу:

а) лиаз;

б) лигаз;

в) трансфераз;

г) гидролаз;

д) изомераз.

12. К специфической регуляции активности ферментов относится:

а) влияние температуры;

б) влияние рН;

в) влияние гормонов;

г) влияние ионной силы.

13. Изоферменты – это:

а) ферменты, отличающиеся по физико-химическим свойствам, катализирующие одну и ту же реакцию;

б) мультимеры, обладающие одинаковыми физико-химическими свойствами;

в) ферменты, катализирующие разные химические реакции;

г) ферменты, способные катализировать несколько химических реакций.

14. Ферменты, отщепляющие молекулу воды от субстрата с образованием двойной связи, относятся к классу:

- а) оксидоредуктазы;
- б) трансферазы;
- в) гидролазы;
- г) лиазы;
- д) изомеразы;
- е) лигазы.

15. Серин, гистидин, глутаминовая кислота и тирозин образуют активный центр фермента:

- а) лизоцима;
- б) ацетилхолинэстеразы;
- в) альдолазы;
- г) аспартат-аминотрансферазы;
- д) цитохромоксидазы.

16. Превращение $2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ осуществляется при участии:

- а) оксигеназы;
- б) каталазы;
- в) пероксидазы;
- г) оксидазы;
- д) НАД-зависимой дегидрогеназы.

17. Выберите из утверждений верные:

- а) трансферазы – ферменты, ускоряющие реакции переноса атомных групп и молекулярных остатков от одного соединения к другому;
- б) киназы – ферменты, ускоряющие реакции переноса ацильных остатков;
- в) изомеразы – ферменты, катализирующие молекулярные превращения (перенос атомов и групп атомов, изменение их пространственного положения в молекуле);
- г) мутазы – ферменты, катализирующие межмолекулярную миграцию атомов и атомных групп.

18. Какой фермент ускоряет реакцию УДФ-глюкоза=УДФ-галактоза?

19. Напишите формулу КоА.

20. Фермент D-аспартатаминотрансфераза переносит аминогруппу

D-аспарагиновая кислота + α -кетоглутаровая кислота = ЦУК + D-аминоглутаровая кислота. Напишите уравнения реакции.

Примерные тестовые задания по теме «Углеводы и липиды»

1. Нарисуйте структурные формулы фруктозы и галактозы.
2. Жиры выполняют следующие функции:
 - а) энергетическую;
 - б) являются резервом эндогенной воды;
 - в) входят в состав клеточных мембран;
 - г) необходимы для растворения и всасывания жирорастворимых витаминов;
 - д) защищают от механических и химических воздействий.
3. Хиломикроны образуются:
 - а) в печени;
 - б) в почках;
 - в) в крови;
 - г) в кишечнике.
3. Процесс расщепления жира называют:
 - а) липолизом;
 - б) липогенезом;
 - в) гликолизом;
 - г) глюконеогенезом.
4. После полного гидролиза глицерофосфолипидов образуются:
 - а) глицерин и жирные кислоты;
 - б) глицерин, жирные кислоты и фосфорная кислота;
 - в) глицерин, жирные кислоты, фосфорная кислота и азотсодержащие молекулы;
 - г) глицерин, жирные кислоты и азотсодержащие молекулы;
 - д) глицерин, жирные кислоты, фосфорная кислота и глюкоза.
5. Синтез гликогена активирует:
 - а) инсулин;
 - б) глюкокортикостероиды;
 - в) катехоламины;
 - г) глюкагон.
6. На первом этапе гликолиза расходуется:
 - а) 2 молекулы АТФ;
 - б) 3 молекулы АТФ;
 - в) 4 молекулы АТФ;

г) 1 молекула АТФ.

7. Из перечисленных ниже метаболитов в гликолизе не участвует:

- а) глюкозо-6-фосфат;
- б) оксалоацетат;
- в) диоксиацетонфосфат;
- г) 3-фосфоглицериновый альдегид.

8. Причиной гипергликемии является:

- а) голодание;
- б) интенсивная мышечная работа;
- в) гиперсекреция инсулина;
- г) сахарный диабет.

9. В какой части клетки протекает процесс β -окисления жирных кислот?

- а) цитоплазме;
- б) лизосомах;
- в) митохондриях
- г) ядре;
- д) рибосомах.

10. Какие конечные продукты анаэробного распада углеводов у человека и животных?

- а) молочная кислота;
- б) этиловый спирт;
- в) вода и углекислый газ;
- г) пировиноградная кислота;
- д) ацетил-КоА.

11. Сравните следующие соединения:

- | | |
|--------------------|---|
| А – Жиры | 1. Служит формой запасания энергии |
| Б – Гликоген | 2. При голодании весь запас расходуется в течении суток |
| В – Оба соединения | 3. Расходуется во время всасывания |
| Г – Ни одно из них | 4. Более длительная форма запасания энергии |

12. В организме не синтезируются и должны поступать с пищей:

- а) насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты;
- б) насыщенные жирные кислоты;
- в) полиненасыщенные жирные кислоты;
- г) производные глицерина;
- д) производные холестерина.

13. Причиной ацетонемии и ацетонурии при углеводном голодании являются:
- а) недостаток оксалоацетата;
 - б) усиленная конденсация ацетилКоА;
 - в) недостаток инсулина и избыток глюкагона.
14. Скорость гликолиза лимитирует фермент:
- а) гексокиназа;
 - б) пируваткиназа;
 - в) фосфофруктокиназа;
 - г) фосфоглицераткиназа.
15. Глюконеогенез – это _____
16. При синтезе ненасыщенных жирных кислот из пальмитиновой или стеариновой используются два белка. Какие?
17. При полном гидролизе целлюлозы образуется:
- а) β -D-глюкоза;
 - б) α -D-глюкоза;
 - в) α -D-фруктоза;
 - г) α -D-фруктозо-6-фосфат.
18. Какие из перечисленных ниже веществ являются кетоновыми телами?
- а) ацетоуксусная кислота;
 - б) ацетон;
 - в) β -оксимасляная кислота;
 - г) лецитин.
19. Мононенасыщенной жирной кислотой является:
- а) линолевая;
 - б) линоленовая;
 - в) олеиновая;
 - г) стеариновая;
 - д) миристиновая.
20. В состав липидного слоя клеточных биомембран входят:
- а) фосфолипиды;
 - б) триацилглицерины;
 - в) эфиры холестерина;
 - г) свободный глицерин.

Примерные экзаменационные вопросы по дисциплине «Биохимия»

1. Предмет биохимии. Задачи. Биохимическое единство. Важные этапы развития биохимии. Уровни организации живой материи.
2. Аминокислоты (структура и классификация). Физико-химические свойства аминокислот. Общность строения, оптическая изомерия, амфотерность, сродство радикалов к воде, изоэлектрическая точка. Заменяемые и незаменимые аминокислоты. Химические реакции, характерные для аминокислот.
3. Пептидная связь, строение и биологические свойства пептидов. Олигопептиды, полипептиды, белки. Биологическая роль пептидов. Аминокислоты и пептиды в промышленности и медицине.
4. Белки: структура и функции. Уровни структурной организации белковых молекул. Типы связей, участвующие в формировании первичной, вторичной, третичной и четвертичной структур. Физико-химические свойства белков. Денатурация белка. Использование процесса денатурации в медицине.
5. Белки как амфотерные электролиты. Поведение белков в электрическом поле. Электрофорез. Применение его во врачебной практике. Изоэлектрическая точка белков. Определение суммарного заряда белка.
6. Классификация белков. Важнейшие представители протеинов и протеидов. Биологические функции белков.
7. Нуклеопротеиды. Химический состав белковой и простетической группы. Структурные компоненты нуклеиновых кислот. Номенклатура нуклеотидов, нуклеозидов, азотистых оснований. Их химическое строение.
8. Ферменты. История открытия и изучения ферментов. Ферменты как биологические катализаторы (специфичность действия, активный центр). Классификация и номенклатура ферментов. Роль и значение ферментов в процессе жизнедеятельности.
9. Химическая природа ферментов. Ферменты простые и сложные. Апофермент и кофермент (витамины как предшественники коферментов). Кофакторы ферментов и их роль в катализе.
10. Мультисубстратные реакции (механизм «пинг-понга», последовательный механизм).
11. Ингибиторы ферментов. Типы ингибирования. Конкурентное, неконкурентное, аллостерическое ингибирование. Использование ингибиторов ферментов в качестве лекарств.
12. Особенности ферментативного катализа. Специфичность действия ферментов. Кинетика ферментативных реакций. Факторы, определяющие скорость ферментативных реакций (температура, концентрация фермента, pH).

13. Активный центр и механизм действия ферментов, специфичность. Формирование фермента субстратного комплекса. Этапы ферментативного катализа. Молекулярные механизмы ферментативного катализа.

14. Витамины. Понятие о гипо- и гипervитаминозах. Классификация витаминов. Важнейшие представители витаминов. Их биологическое значение.

15. Жирорастворимые витамины. Витамин А. Химическая природа, свойства, распространение, потребность, роль в обмене веществ. Авитаминозы.

16. Водорастворимые витамины. Витамин группы В. Распространение, потребность.

17. Витамины группы Р.

18. Нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК). Химический состав нуклеиновых кислот. Строение нуклеотидов.

19. Современные представления о химическом строении ДНК. Уровни структурной организации ДНК. Комплементарность оснований. Правила Чаргаффа. Функции и биологическая роль ДНК.

20. Виды РНК. Уровни организации молекул РНК. Отличие в строении РНК и ДНК.

21. Репликация ДНК. Этапы репликации (инициация, элонгация, терминация). Биологический генетический код.

22. Транскрипция. Стадии транскрипции (инициация, элонгация, терминация). РНК-полимеразы. Типы РНК, их биологическая роль. Сплайсинг.

23. Современные представления о синтезе белка. Трансляция. Свойства генетического кода. Строение рибосомы эукариот.

24. Основные этапы биосинтеза белка (активация аминокислот, инициация; элонгация, терминация и диссоциация рибосом, фолдинг и посттрансляционный процессинг).

25. Углеводы, строение и функции. Моносахариды, олигосахариды, полисахариды. Резервные полисахариды. Структура гликогена.

26. Метаболизм. Катаболизм и анаболизм. Схема обмена веществ.

27. Катаболизм углеводов. Переваривание углеводов. Внутриклеточный обмен углеводов. Распад и синтез гликогена. Биологическое значение обмена гликогена в печени и мышцах.

28. Катаболизм глюкозы. Гликолиз – центральный путь катаболизма глюкозы. Последовательность реакций гликолиза при анаэробном окислении (подготовительная, генерация АТФ). Значение гликолиза.

29. Аэробное окисление углеводов. Окислительное декарбоксилирование пирувата. Ферменты. Регуляция окислительного декарбоксилирования пирувата.

30. Цикл трикарбоновых кислот. Роль ЦТК в жизнедеятельности организма. Интегративная и амфиболическая функция ЦТК.
31. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы. Метаболические функции пентозофосфатного пути. Биологическое значение пентозофосфатного цикла.
32. Липиды. Биологические функции. Классификация. Простые липиды (жирные кислоты, ацилглицеролы, воска).
33. Сложные липиды (фосфолипиды, гликолипиды, стероиды). Амфифильные свойства сложных липидов. Двойной липидный слой биологических мембран.
34. Биологические мембраны. Функции. Строение. Химический состав. Свойства биологических мембран.
35. Переваривание и всасывание липидов (триацилглицеролов, глицерофосфолипидов, холестерина).
36. Внутриклеточный обмен липидов (катаболизм триацетилглицеролов, окисление жирных кислот).
37. Кетоновые тела: биосинтез биологическая роль.
38. Биосинтез липидов в организме.

Термины и определения

Авитаминоз – полное отсутствие какого-либо витамина в организме.

Аденозинтрифосфат (АТФ) – рибонуклеозид-5-трифосфат, участвующий в энергетическом обмене клетки в качестве донора фосфатной группы.

Азотистое основание – азотсодержащая молекула со свойствами основания; пуриновые и пиримидиновые азотистые основания входят в состав нуклеотидов.

Азотфиксация – перевод атмосферного азота в биологически доступную форму с помощью азотфиксирующих микроорганизмов.

Активный транспорт – энергозависимый транспорт растворенного вещества через биологическую мембрану против градиента электрохимического потенциала.

Активный центр – в энзимологии – часть молекулы фермента, ответственная за присоединение и превращение субстрата, образуется функциональными группами аминокислотных остатков, расположенных строго определенным образом в пространстве.

Акцептор электронов/протонов – соединение, принимающее электроны/протоны в процессе окислительно-восстановительных реакций.

Алкалоиды – азотсодержащие циклические соединения, синтезируемые растениями и являющиеся вторичными метаболитами.

Аллостерическое взаимодействие – изменение пространственной конфигурации белковой молекулы (чаще белковой молекулы фермента) в результате присоединения к ней другой молекулы (активатора или ингибитора).

Аллостерические ферменты – ферменты, каталитическая активность которых изменяется при нековалентном связывании специфического вещества не в каталитическом (активном) центре, а в другом участке молекулы фермента (аллостерическом центре).

Альбумины – простые глобулярные белки, хорошо растворимые в воде.

Аминокислоты – алифатические, ароматические или гетероциклические карбоновые кислоты с аминогруппой.

Аммонификация – разложение микроорганизмами азотсодержащих органических соединений (белков, мочевины, нуклеиновых кислот и др.) с образованием свободного аммиака.

Амфиболиты – соединения, которые могут рассматриваться как интермедиаты и катаболизма, и анаболизма.

Анаболизм – совокупность реакций, обеспечивающих биосинтез клеткой более сложных соединений из более простых.

Анаэробное дыхание – тип энергетического метаболизма, при котором фосфорилирование осуществляется в дыхательной цепи, но в качестве терминального акцептора электронов микроорганизмы используют нитрат, сульфат и другие соединения.

Аномеры – два стереоизомера одного сахара, отличающиеся только по расположению разных атомов и групп относительно карбонильного (аномерного) атома углерода.

Антивитамины – вещества, подавляющие функции витаминов (конкурируя с ними либо разрушая).

Антикодон – специфическая последовательность из трех нуклеотидов в тРНК, комплементарная кодону для аминокислоты в мРНК.

Антипараллельность – свойство двойной спирали ДНК, выражающееся в том, что фосфодиэфирные связи в одной цепи имеют направление $3' \rightarrow 5'$, а в другой $5' \rightarrow 3'$.

Антипорт – сопряженный перенос через мембрану двух веществ в разных направлениях.

Апофермент – белковая часть сложного фермента.

Асимметрический атом – атом многовалентного элемента, к которому присоединены неодинаковые атомные группы или атомы других элементов.

Ассимиляция (анаболизм) – образование в организме сложных веществ из более простых, поступающих из внешней среды.

Ацилглицеролы – сложные эфиры трехатомного спирта глицерола и одной, двух или трех жирных кислот.

Аэробное дыхание – тип энергетического метаболизма, при котором осуществляется фосфорилирование в дыхательной цепи и в качестве терминального акцептора электронов (протонов) организмы используют молекулярный кислород.

Белки (синоним – протеины) – высокомолекулярные природные полимеры, состоящие из остатков α -аминокислот, соединенных пептидными связями.

Биолюминесценция – видимое свечение живых организмов (бактерии, грибы, беспозвоночные и др.).

Брожение – анаэробный метаболический процесс разложения органических соединений на более простые, при котором АТФ образуется за счет субстратного фосфорилирования, а продукты расщепления субстрата могут выступать как донорами, так и акцепторами атомов водорода.

Витамины – низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, необходимые в небольших количествах для нормального обмена веществ и жизнедеятельности живых организмов.

Витамеры – группа витаминов с общей биологической функцией.

Витаминоподобные вещества – вещества, обладающие витаминными свойствами, но, в отличие от витаминов, выполняющие пластическую функцию и требующиеся организму в гораздо больших количествах, чем витамины.

Водородная связь – относительно слабая связь между атомом водорода, ковалентно связанным с атомом кислорода или азота, и другим электроотрицательным атомом.

Воски – сложные эфиры высших жирных кислот и одноатомных спиртов с длинной углеводородной цепью.

Гель-хроматография (гель-фильтрация) – способ разделения веществ, различающихся молекулярной массой, с использованием так называемых молекулярных сит, например, сефадекса.

Гель-электрофорез – метод анализа или разделения веществ под действием электрического поля, когда в качестве носителя используется гель.

Ген – участок молекулы ДНК, который кодирует одну или несколько полипептидных цепей или молекулу РНК.

Геном – совокупность генов, характерных для гаплоидного набора хромосом данного вида организмов.

Генотип – совокупность всех генов организма, включая внеядерные (хлоропластов, митохондрий, плазмид).

Гидролиз – расщепление молекул сложных веществ на более простые при участии воды.

Гипервитаминоз – избыток какого-либо витамина в организме.

Гиповитаминоз – недостаток какого-либо витамина в организме.

Гистоны – группа основных белков, участвующих в формировании нуклеосом эукариот.

Гликолиз – анаэробная фаза дыхания, в процессе которой происходит преобразование молекулы гексозы до двух молекул пировиноградной кислоты.

Глюконеогенез – многоступенчатый ферментативный процесс образования глюкозы организмами из неуглеводных предшественников (кетокислоты, оксикислоты, аминокислоты, глицерол и др.), реализуется путем обращения большинства реакций гликолиза.

Дальтон – единица измерения массы атомов, молекул, а также вирусов, клеток и их структур (хромосом, рибосом, митохондрий и др.), равная 1/12 массы атома углерода (^{12}C), или $1,661 \cdot 10^{-24}$ г. Название дано в честь английского физика и химика Дж. Дальтона (1766–1844).

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – носитель генетической информации в клетке, состоит из двух полинуклеотидных цепей, включающих пуриновые и пиримидиновые основания, дезоксирибозу и фосфат, способна самоудваиваться.

Декарбоксилирование – отщепление углекислого газа от карбоксильной группы карбоновых кислот обычно при участии декарбоксилаз.

Декстрины – продукты частичного расщепления полисахаридов (крахмала, гликогена).

Денатурация белка – изменение нативной конформации белковой молекулы под действием различных дестабилизирующих факторов, сопровождающееся потерей характерных свойств, при этом аминокислотная последовательность белка не изменяется.

Денатурация ДНК – переход молекулы ДНК из двухцепочечной формы в одноцепочечную, разделение цепей наиболее часто достигается нагреванием.

Дефосфорилирование – отщепление остатка фосфорной кислоты от молекулы фосфорсодержащего соединения, осуществляется главным образом фосфатазами, при действии которых образуется свободная фосфорная кислота.

Диссимиляция – процесс расщепления сложных органических соединений в организме до низкомолекулярных соединений с высвобождением энергии, что обеспечивает его жизнедеятельность.

Дисульфидный мостик – ковалентная поперечная связь между цистеиновыми остатками двух полипептидных цепей или двух участков одной полипептидной цепи.

Домен – обособленная область молекулы белка, обладающая в определенной степени структурной и функциональной автономией.

Дыхание – процесс биологического окисления органических соединений, сопровождающийся синтезом АТФ.

Дыхательная цепь – система связанных с мембранами переносчиков белковой (флавопротеиды, FeS-белки, цитохромы) и небелковой (хиноны) природы, осуществляющих транспорт электронов (протонов) от восстановленных динуклеотидов на кислород.

Дыхательный коэффициент – отношение количества выделенного углекислого газа к количеству поглощенного кислорода.

Заменяемые аминокислоты – протеиногенные аминокислоты, которые могут синтезироваться организмом человека и животных из более простых предшественников.

Изомеры – химические соединения, одинаковые по составу и молекулярной массе, но различающиеся по строению.

Изоферменты – формы фермента одного подподкласса, отличающиеся друг от друга по степени активности и сродства к субстрату.

Изоэлектрическая точка (ИЭТ) – значение рН среды, при котором количество положительных и отрицательных зарядов уравнивается и амфолит становится электронейтральным.

Ингибирование по типу обратной связи – регулирование процессов в организме, заключающееся в том, что при повышении концентрации вещества сверх определенного уровня подавляется дальнейший синтез.

Ингибиторы – химические вещества, снижающие скорость биохимических реакций или подавляющие их путем воздействия на соответствующие ферменты.

Индукцибельные ферменты (индуцируемые ферменты) – ферменты, синтез которых индуцируется экзогенными или эндогенными факторами.

Интенсивность дыхания – количество поглощенного кислорода или выделенного углекислого газа за единицу времени (1 час) на единицу массы (г).

Интермедиат – вещество, являющееся промежуточным соединением какого-либо метаболического процесса.

Интрон – вставочная последовательность в гене, которая транскрибируется, но не транслируется.

Информационная (матричная) РНК – РНК, которая служит матрицей при синтезе белков на рибосомах.

Каротиноиды – пигменты алифатического или ациклического строения, состоящие из изопреновых остатков, обычно желтого или оранжевого цвета.

Катаболизм – совокупность реакций метаболизма, приводящих к расщеплению (диссимиляции) сложных органических веществ до более простых, в том числе CO_2 и H_2O , сопровождается синтезом АТФ и восстановительных эквивалентов.

Ковалентная связь – химическая связь между атомами молекулы, возникающая за счет образования общей пары электронов.

Кодон – последовательность из трех соседних нуклеотидов в молекуле ДНК или мРНК, кодирующая одну аминокислоту или окончание полипептидной цепи.

Компартментация – разделение клеточного пространства или протопласта органеллами или мембранами на отдельные изолированные ячейки.

Комплементарность – взаимодополняемость.

Константа Михаэлиса – концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине ее максимальной скорости.

Конститутивные ферменты – ферменты, постоянно синтезирующиеся организмом независимо от условий существования или наличия соответствующих субстратов.

Конформация молекулы – пространственное расположение атомов в молекуле определенной конфигурации, обусловленное поворотом вокруг одной или нескольких одинарных сигма-связей.

Кофактор – небелковая часть сложного фермента (органической или неорганической природы), входящая в состав активного центра.

Кофермент – органическое соединение небелковой природы, входящее в состав активного центра некоторых сложных ферментов.

Ксантофилл – желтый пигмент группы каротиноидов.

Лектины – растительные белки, агглютинирующие клетки млекопитающих и микроорганизмов в результате связывания с компонентами клеточной поверхности, выполняют защитные функции, являются гликопротеинами.

Люминесценция – нетепловое свечение вещества, происходящее после поглощения им энергии возбуждения.

Мессенджеры – это медиаторы (посредники), участвующие в передаче сигналов в клетке.

Метаболизм – совокупность процессов катаболизма и анаболизма, обеспечивающих развитие, жизнедеятельность и самовоспроизведение организмов, их связь с внешней средой.

Метаболон – надмолекулярный комплекс ферментов, катализирующих последовательные стадии метаболического пути, и структурных элементов клетки.

Молекулярная масса – сумма относительных масс атомов в составе молекулы, выраженная в единицах, равных $1/12$ массы наиболее распространенного атома углерода, измеряется в дальтонах.

Мультиферментная система – совокупность связанных между собой ферментов, коферментов, витаминов и других соединений, участвующих в данном метаболическом пути.

Нативный – естественный, натуральный, неповрежденный при исследовании.

Нативный белок – белок, обладающий всеми характерными для него природными свойствами.

Незаменимые аминокислоты – аминокислоты, которые не могут синтезироваться в организме человека и животных и, следовательно, поступают с пищей.

Нуклеозид – азотистое основание (пуриновое или пиримидиновое), связанное с молекулой сахара (β -D-рибозы или β -D-дезоксирибозы).

Нуклеосома – структурная единица хроматина, состоящая из восьми молекул белков гистонов, вокруг которых закручена двойная спираль ДНК (около 200 пар нуклеотидов).

Нуклеотид – нуклеозид, связанный с молекулой фосфорной кислоты.

Обратная транскрипция – процесс биосинтеза ДНК на матрице РНК.

Окислительное фосфорилирование – синтез молекул АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет энергии окисления молекул органических и неорганических веществ, сопряженный с переносом электронов по дыхательной цепи.

Олигомерный белок (мультимер) – белок, состоящий из двух или нескольких полипептидных цепей.

Оптическая активность – способность вещества вращать плоскость поляризованного луча света.

Пассивный транспорт – транспорт веществ через мембрану без затраты энергии, по градиенту электрохимического потенциала.

Пептидная связь – ковалентная связь, образующаяся между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой соседней с выделением воды.

Пиридиновые дегидрогеназы – группа ферментов, катализирующих отщепление от субстратов двух атомов водорода, у которых кофакторами являются никотинамидмононуклеотид (НМН), никотинамидадениндинуклеотид (НАД) или никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ).

Плазмиды – кольцевые внехромосомные ДНК, способные к автономной репликации в клетке.

Праймер (затравка) – короткая последовательность нуклеотидов, комплементарно взаимодействующая с одной из цепей ДНК, имеет свободный 3'-конец, используя который, ДНК-полимераза начинает синтез дочерней цепи при репликации.

Провитамины – предшественники витаминов.

Промотор – участок гена, область начала транскрипции.

Простетическая группа – кофактор, прочно связанный с белком сложного фермента.

Простой белок – белок, при гидролизе которого образуются только аминокислоты.

Процессинг – процесс посттранскрипционной модификации РНК предшественников и превращения их в зрелые РНК.

Простой липид – соединение, состоящее только из жирных кислот и спирта.

Ренативация (ренатурация) – процесс, обратный денатурации; возможен благодаря сохранению при денатурации первичной структуры белков и нуклеиновых кислот.

Репарация (от лат. reparatio – восстановление) – свойственный клеткам всех организмов процесс восстановления природной (нативной) структуры ДНК.

Репликация – процесс биосинтеза ДНК на матрице материнской молекулы ДНК.

Рестриктазы – ферменты, разрезающие ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям.

Рибозимы – каталитически активные РНК.

Рибонуклеиновая кислота (РНК) – нуклеиновая кислота, представляющая собой полинуклеотидную цепь, состоящую из пуриновых и пиримидиновых оснований, рибозы и фосфатов.

Рибосомальная РНК (рРНК) – РНК, входящая в состав рибосом, необходимая для поддержания их структуры и функционирования.

Сателлитная ДНК – высокоповторяющиеся (многократно повторяющиеся) нетранслируемые участки ДНК в геноме эукариот.

Светособирающий комплекс (ССК) – молекулы фотосинтетических ферментов, поглощающие свет и переносящие энергию возбуждения в реакционный центр фотосистемы.

Симпорт – сопряженный перенос через мембрану двух веществ в одном направлении.

Сложный белок – белок, при гидролизе которого образуются не только аминокислоты, но и группы другой химической природы (липид, углевод, металл, фосфорная кислота и т. д.).

Сплайсинг – процесс удаления интронов и соединения экзонов.

Стероидные гормоны – гидрофобные соединения, способные диффундировать через плазматическую мембрану в клетку, где они связываются с рецепторными белками в цитоплазме.

Сфингозин – неразветвленный С18 спирт с двойной связью в трансконфигурации между С-4 и С-5, аминогруппой при С-2 и гидроксильными группами при С-1 и С-3.

Субстрат – вещество, превращение которого катализирует фермент.

Субстраты дыхания – вещества, используемые в процессе дыхания (белки, липиды, углеводы и др.).

Субъединица (протомер) – одна из нескольких полипептидных цепей олигомерного белка.

Супернатант – вещество, располагающееся над твердым слоем (осадком, седиментом) после центрифугирования или седиментации.

Терминатор – зона остановки транскрипции.

Терминирующие кодоны – три кодона (УАА, УАГ и УГА), которые служат сигналами окончания синтеза полипептидной цепи.

Трансдукторы – внутриклеточные передатчики, обеспечивающие передачу сигнала.

Транскрипция – процесс биосинтеза РНК на матрице ДНК.

Трансляция – процесс биосинтеза белка на рибосомах.

Транспозон – фрагмент ДНК, который может менять свое положение в геноме.

Транспортная РНК (тРНК) – РНК, содержащая участок, к которому присоединяется специфическая аминокислота, и антикодон, комплементарный кодону в мРНК.

Фенотип – совокупность всех признаков и свойств организма.

Ферментация – биохимическая переработка сырья под воздействием ферментов, содержащихся в нем самом, а также вызываемая микроорганизмами или грибами.

Ферменты (синоним – энзимы) – биологические катализаторы белковой природы, способные во много раз ускорять химические реакции, протекающие в живом организме.

Фитогормоны – вещества, действующие в ничтожных количествах, образующиеся в одних органах растения и оказывающие регуляторное действие на какие-либо физиологические процессы в других органах.

Флавиновые дегидрогеназы – группа ферментов, катализирующих отщепление от субстрата двух атомов водорода, у которых кофакторами являются флавинмононуклеотид (ФМН) или флавинадениндинуклеотид (ФАД).

Флавоноиды – водорастворимые фенольные соединения, в основе структуры которых лежит флаван, состоящий из двух ароматических колец А и В, соединенных через кислородсодержащую С3-единицу.

Флуоресценция – вид фотолюминесценции, быстро затухающей после прекращения освещения молекул квантами света.

Фолдинг белка – процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру.

Фотодыхание – светозависимый процесс поглощения кислорода и высвобождения углекислого газа у растений, сопряженный с фотосинтезом.

Фотосинтез – у растений и некоторых микроорганизмов процесс образования органического вещества из неорганических веществ – углекислого газа и воды, осуществляющийся на свету, при участии фотосинтетических пигментов.

Фотосинтетическое фосфорилирование – синтез АТФ за счет энергии света при участии фотосинтетической электронтранспортной цепи.

Фотосистема – совокупность молекул фотосинтетических пигментов совместно с определенными белками-переносчиками электронов.

Хелаты – внутрикомплексные органические соединения, в состав которых входит ион того или иного металла.

Хемосинтез – образование органических веществ из неорганических с использованием энергии химических связей.

Хлорофиллы – зеленые пигменты растений и ряда фототрофных микроорганизмов, с помощью которых они улавливают энергию солнечного света и осуществляют фотосинтез. Основу составляет магний-порфириновый комплекс и ряд заместителей.

Цикл Кребса – аэробная фаза дыхания, в процессе которой происходит окисление ацетильного радикала ацетилкоэнзима А до углекислого газа и атомов водорода.

Цитохромы – сложные белки (гемопротеины), осуществляющие в клетках ступенчатый перенос электронов посредством обратимого изменения валентности атома железа в геме от окисляемых органических веществ к молекулярному кислороду.

Четвертичная структура белка – пространственное расположение субъединиц олигомерного белка.

Шапероны – класс белков, главная функция которых состоит в восстановлении правильной нативной третичной или четвертичной структуры белков, а также образовании и диссоциации белковых комплексов.

Экзон – участок прерывистого гена эукариот, кодирующий структуру белка.

Экзонуклеазы – ферменты, гидролизующие нуклеиновые кислоты, начиная с концов полинуклеотидной цепи.

Электронтранспортная цепь дыхательная – система связанных с мембранами переносчиков белковой или небелковой природы, осуществляющих транспорт электронов/протонов от восстановленных динуклеотидов на кислород.

Энзимология – наука о ферментах.

Эффектор (модулятор) – соединение, которое, связываясь с аллостерическим центром регуляторного фермента, меняет его кинетические характеристики.

Рекомендуемая литература

Основная

1. *Биохимия* / под ред. Е.С. Северина. 5-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 768 с.
2. *Комов В.П., Шведова В.Н.* Биохимия. 4-е изд., М.: Дрофа, 2015. 638с.

Дополнительная

1. *Ленинджер А.* Основы биохимии. М.: Мир, 1985.
2. *Овчинников Ю.А.* Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987.
3. *Страйер Л.* Биохимия. М.: Мир, 1985.
4. *Органическая химия* / под ред. Н.А. Тюкавкиной. 2-е изд. М.: Медицина, 2002. 512 с.
5. *Воюцкий С.С., Панич Р.М.* Практикум по коллоидной химии и электронной микроскопии. М.: Химия, 1974. 224 с.
6. *Чернов Н.Н., Березов Т.Т., Буробина С.С.* и др. Руководство к практическим занятиям по биохимии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 240 с.
7. *Биохимия: сборник лабораторных работ* / В.В. Шапкарин, А.П. Королев, С.Б. Гридина, Е.П. Зинкевич; Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. Кемерово, 2005. 84 с.
8. *Петров О.А., Глуховская С.Г.* Практикум по биохимии: метод. указания. Иваново, ГОУ ВПО Иван. гос. хим.-технол. ун-т, 2006. 60 с.
9. *Токарева М.И., Селезнёва И.С.* Биохимия: в 3 ч. Ч. 2. Учебное электронное текстовое издание, 2005. 32 с.
10. *Таганович А.Д.* и др. Руководство к практическим занятиям по биологической химии для фармацевтического факультета. Минск: БГМУ, 2012. 160 с.
11. *Морозкина Т.С., Мойсеёнок А.Г.* Витамины: краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармацевтических и биологических специальностей. Минск: Асар, 2002. 112 с.
12. *Шapiro Д.К.* Практикум по биологической химии. Минск: Вышэйш. школа, 1976. 288 с.
13. *Практические и лабораторные работы по биологической химии* / под ред. О.В. Островского. Волгоград, 2003. Ч. 1. 55 с.
14. *Биохимический анализатор Stat Fax 4500.* Руководство пользователя. 2008. 38 с.
15. *Биохимия: практикум: [учеб.-метод. пособие]* / [Г.Г. Борисова, Н.В. Чукина, И.С. Киселева, М.Г. Малева; под общ. ред. Г.Г. Борисовой]; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер.ун-т. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. 116 с.

Учебное издание

Лисовенко Наталья Юрьевна
Толмачева Ирина Анатольевна

Биохимия

Учебно-методическое пособие

Редактор: *Е.В. Шумилова*
Корректор: *В.Е. Пирожкова*
Компьютерная верстка:
Н.Ю. Лисовенко, И.А. Толмачева

Объем данных 7,22 Мб
Подписано к использованию 02.11.2024

Размещено в открытом доступе
на сайте www.psu.ru
в разделе НАУКА / Электронные публикации
и в электронной мультимедийной библиотеке ELiS

Издательский центр
Пермского государственного
национального исследовательского университета
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15