

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
МИРЭА – РОССИЙСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

---

**Д.И. ПРОХОРОВ**

## **БИОХИМИЯ**

Методические указания по выполнению лабораторных работ  
для студентов, обучающихся по направлению 12.03.04 Биотехнические  
системы и технологии

Москва – 2019

УДК 577.12

ББК 28.072

Г86

**Прохоров Д.И. Биохимия** [Электронный ресурс]: методические указания / Прохоров Д.И. — М.: МИРЭА – Российский технологический университет, 2019. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

Разработаны в помощь студентам, выполняющим лабораторные работы по курсу «Биохимия» по тематикам буферные растворы, получение раствора растительного белка и изучение его свойств, качественные реакции на белок, разделение веществ методом тонкослойной хроматографии, действие ферментов, выделение и гидролиз нуклеопротеидов, электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле, определение аминного азота медным способом. В состав методических указаний входит описание лабораторных работ по курсу «Биохимия».

Предназначено для студентов по направлению 12.03.04 - компьютерные системы и технологии.

Методические указания издаются в авторской редакции.

Рецензент:

Каплун Александр Петрович, д.х.н., проф. кафедры БТиПФ, ИТХТ имени М.В. Ломоносова

Минимальные системные требования:

Наличие операционной системы Windows, поддерживаемой производителем.

Наличие свободного места в оперативной памяти не менее 128 Мб.

Наличие свободного места в памяти хранения (на жестком диске) не менее 30 Мб.

Наличие интерфейса ввода информации.

Дополнительные программные средства: программа для чтения pdf-файлов (Adobe Reader).

Подписано к использованию по решению Редакционно-издательского совета

МИРЭА – Российского технологического университета от \_\_\_\_\_ 2019 г.

Объем \_\_\_ Мб

Тираж 10

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1.Лабораторная работа № 1 .....	3
2.Лабораторная работа №2 .....	7
3.Лабораторная работа №3 .....	10
4.Лабораторная работа №4 .....	13
5.Лабораторная работа №5. ....	16
6.Лабораторная работа №6 .....	19
7.Лабораторная работа №7 .....	21
8.Лабораторная работа №8 .....	23

# 1. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

## БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

Кисотно-основное равновесие относительно постоянство соотношения кислота-основание внутренней среды живого организма количественно характеризуется или концентрацией водородных ионов (протонов), выраженной в молях на 1 литр, или водородным показателем – отрицательным десятичным логарифмом этой концентрации. рН – показатель кислотности или основности раствора, определяющийся концентрацией ионов  $H^+$  и  $OH^-$  ( $0 \leq pH \leq 14$ )

- $pH < 7$  – кислый раствор
- $pH = 7$  – нейтральный раствор
- $pH > 7$  – щелочной раствор

Все органы и ткани человека имеют строго определенные границы кислотности и могут работать только в этих пределах. Особенно строго обозначены границы рН для крови: для артериальной 7.37-7.45, для венозной 7.32-7.42. Венозная кровь более кислая, то есть насыщена углекислым газом. Человек может жить только при таких показателях рН. Пищеварительные ферменты поджелудочной железы нормально функционируют при  $pH=8.3$ , секреция печени и желчного пузыря  $pH=7.1$ , рН слюны 6.0-7.9, желудочный сок  $1.6 \leq pH \leq 1.8$ . Изменение уровня рН вызывает различные болезни в организме человека. Буферные системы крови препятствуют изменениям рН внутренней среды. Она представляет собой сопряженную кислотно-основную пару, состоящую из акцептора и донора. Поведение буферных растворов описывается уравнением Гендерсона-Хассельбаха, которое связывает значения рН с константой кислотности:  $pH = pK_a - \lg C \text{ кислоты} / C \text{ соли}$ .

Способности буферного раствора сохранить свой рН определяется буферной емкостью. Буферная емкость тем выше, чем больше концентрация его компонентов. Она определяется по формуле  $\pi = dx/dpH$ , где  $x$  – концентрация введенных ионов  $H^+$  или  $OH^-$ . Область буферирования – интервал рН, в котором буферная система способна поддерживать постоянное значение рН, обычно он равен  $pK_a+1$ . Потенциометрия – электрохимический метод исследования и анализа веществ, основанный на зависимости равновесного электродного потенциала  $E$  от термодинамической активности  $a$  компонентов электрохимической реакции.

Эта зависимость описывается уравнением Нернста:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_2}{a_1}$$

**Цель работы:** изучение свойств буферных растворов.

**Оборудование:** рН-метр со стеклянным и хлоридсеребряным электродами; химические стаканы ёмкостью 50-100 мл; пипетки.

**Реактивы:** 0.1н HCl; 0.1н NaOH; 0.1н CH<sub>3</sub>COOH; 0.1н CH<sub>3</sub>COONa; дистиллированная вода.

### Порядок выполнения работы

1. Получить у преподавателя номер варианта и приготовить по таблице заданный буферный раствор, отмерив при помощи бюретки заданные количества кислоты и соли.

Таблица

Варианты заданий

Состав буферного раствора	Номер варианта							
	1	2	3	4	5	6	7	8
V кислоты (V <sub>к</sub> ), мл	12	16	10	14	18	20	17	13
V соли (V <sub>с</sub> ), мл	18	14	20	16	12	10	13	17

2. Рассчитать теоретическое значение рН заданного буферного раствора:

$$\text{pH} = -\lg [\text{H}^+], \quad (1)$$

$$[\text{H}^+] = K (C_{\text{к}} / C_{\text{с}}), \quad (2)$$

где K – константа диссоциации кислоты ( $K = 1.8 \times 10^{-5}$ );

C<sub>к</sub>, C<sub>с</sub> – конечные концентрация кислоты и соли, соответственно.

Так как при сливании растворов происходит их разбавление, то исходные концентрации кислоты и соли (C<sub>к</sub>' и C<sub>с</sub>') существенно отличаются от конечных концентраций. Конечные концентрации рассчитывают по следующим формулам:

$$C_{\text{к}} = \acute{C}_{\text{к}} \frac{V_{\text{к}}}{V_{\text{к}} + V_{\text{с}}}; \quad C_{\text{с}} = \acute{C}_{\text{с}} \frac{V_{\text{с}}}{V_{\text{к}} + V_{\text{с}}} \quad (3)$$

где  $V_k$  – объем кислоты, мл;  $V_c$  – объем соли, мл.

3. Произвести практическое измерение pH буферного раствора на pH-метре.

4. Добавить к исследуемому буферному раствору 2 капли 0.1н HCl, перемешать, измерить pH на pH-метре. Сделать вывод, как влияет подкисление на pH буферного раствора.

5. К новой порции исследуемого буферного раствора добавить 2 капли 0.1н NaOH, перемешать, измерить pH на pH-метре. Сделать вывод, как влияет подщелачивание на pH буферного раствора.

6. Произвести разбавление новой порции буферного раствора в 2 раза дистиллированной водой. Сделать вывод.

7. В два стаканчика налить по 30 мл дистиллированной воды, измерить pH воды на pH-метре. Затем в один внести 2 капли 0.1н HCl; в другой 2 капли 0.1н NaOH, перемешать, измерить pH на pH-метре. Проследить, какие изменения происходят с pH.

#### Обработка экспериментальных данных

1. Объяснить механизм буферного действия на примере ацетатного буферного раствора.

2. Оформить результаты опытов в виде таблицы.

Таблица

#### Результаты эксперимента

Состав	$C'$ , моль/л	$V$ , мл	pH теор.	pH практ.	pH+HCl	pH+NaOH	pH+ H <sub>2</sub> O
CH <sub>3</sub> COOH CH <sub>3</sub> COONa							
H <sub>2</sub> O							

## 2. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2

### ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРА РАСТИТЕЛЬНОГО БЕЛКА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СВОЙСТВ

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, аспарат);

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

**Цель работы.** Получить раствор растительного белка и изучить его физико-химические свойства.

#### ***Оборудование и реактивы***

1. Колбы на 100 мл.
2. Штативы с пробирками на 10 мл.
3. Воронки и фильтры.
4. Водяная баня.
5. Гороховая мука.
6. Раствор сульфата аммония (10 %).
7. Раствор хлорида натрия (1–2 %).
8. Хлорид натрия кристаллический.
9. Серная кислота конц.

## **Ход работы**

### *Получение растительного белка*

Навеску гороховой муки (3–5 г) высыпают в колбу, добавляют 30 мл 10 % раствора сульфата аммония, перемешивают в течение 3 мин., оставляют отстояться на 30 мин., затем фильтруют через фильтр, смоченный раствором сульфата аммония, в другую колбу.

Если фильтрат мутный, то его сливают обратно на фильтр. В полученном растворе находится белок. Объясните, какой белок перешел в раствор.

### *Изучение растворимости исследуемого белка в разных растворителях*

1. Налить в пробирку 1 мл полученного раствора белка и добавить избыток воды. О чем свидетельствует помутнение раствора?

2. Добавить к осадку раствор 1–2 % NaCl. Объясните, какие произошли изменения? Сделайте вывод о растворимости исследуемого белка.

### *Высаливание белка*

1. К 1 мл раствора белка, взятого в пробирку, добавить несколько кристалликов соли NaCl. Раствор мутнеет вследствие выпадения глобулина в осадок (при концентрации соли 50 %).

2. К полученному осадку добавить избыток воды (уменьшить концентрацию соли). Какие изменения произошли? Объясните полученные результаты.

### *Изучение денатурации белка*

1. Налить в пробирку 1 мл раствора белка и, постепенно нагревая, довести до кипения. Растворится ли образовавшийся осадок после добавления солевого раствора?

2. Налить в пробирку 1 мл раствора белка и добавить по каплям  $H_2SO_4$  конц. Растворится ли образовавшийся осадок после добавления солевого раствора? Объясните полученные результаты.

**Вывод.** Указать все физико-химические свойства белков, с которыми вы познакомились в ходе выполнения работы.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. К какой группе простых белков относится выделенный из гороховой муки белок?

2. О чем свидетельствует помутнение раствора при добавлении избытка воды?

3. Добавление каких веществ к белковому раствору может вызвать осаждение белка?

4. Что такое высаливание и каковы механизмы этого процесса?



5. Почему при величине рН, соответствующей изоэлектрической точке белка, его растворимость минимальна?

6. Какой процесс происходит при нагревании белкового раствора? Может ли он быть обратимым?

7. Как отразилось нагревание белка на его растворимости в солевом растворе? Чем объяснить эти изменения?

8. Почему добавление серной кислоты к исследуемому белку привело к утрате его способности к растворению в солевом растворе?

### 3. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3

#### КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛОК

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 и реакция Фоля.

**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  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  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.

Оборудование и реактивы

1. Штативы с пробирками на 10 мл.
2. Водяная баня.
3. Раствор растительного белка.
4. Раствор NaOH (10 %).
5. Раствор NaOH (30 %).
6. Раствор CuSO<sub>4</sub> (2 %).
7. Азотная кислота конц.
8. Раствор нингидрина (0,25 %) в смеси этиловый спирт : ацетон (1 : 1).
9. Раствор уксуснокислого свинца (5 %).

**Ход работы**

Для проведения биуретовой реакции в пробирку налить 2 мл раствора растительного белка, добавить 1 мл раствора 10 % NaOH и по каплям добавить 2 % раствор CuSO<sub>4</sub>. Сначала образуется бледно-голубой осадок, который в присутствии белка растворяется и окрашивает раствор в фиолетовый цвет.

Для проведения ксантопротеиновой реакции к 2 мл раствора белка добавляют несколько капель конц. HNO<sub>3</sub>, нагревают, при этом происходит выпадение осадка белка и осадок окрашивается в желтый цвет.

Для проведения нингидриновой реакции к раствору белка добавляют несколько капель нингидрина и нагревают. Отмечают, какие изменения произошли с раствором.

Для проведения реакции Фоля в пробирку вносят 5 капель раствора белка, добавляют 5 капель 30 % раствора едкого натра и 1 каплю 5 % раствора уксуснокислого свинца. Смесь нагревают до кипения и оставляют при комнатной температуре на несколько минут. Наблюдают появление осадка бурого (или черного) цвета.

**Вывод.** Указать особенности проведенных реакций и объяснить, почему белки способны вступать в различные качественные реакции.

Вопросы для самоконтроля

1. Чем обусловлена способность белков вступать в разнообразные качественные реакции?
2. Для решения каких задач на практике используют качественные реакции на белки и аминокислоты?

3. Какие качественные реакции из изученных могут проходить как при участии белков, так и отдельных аминокислот?

4. Какие органические вещества, помимо белков, могут вступать в биуретовую реакцию?

5. Какие органические вещества, помимо белков и аминокислот, могут вступать в ксантопротеиновую реакцию?

6. Все ли аминокислоты способны взаимодействовать с нингидрином с образованием окрашенного соединения?

7. Какие аминокислоты при взаимодействии с нингидрином образуют соединение, окрашенное не в сине-фиолетовый, а в желтый цвет?

8. Почему серосодержащая аминокислота метионин не вступает в реакцию Фоля?

## 4.ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4

### РАЗДЕЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

**Тонкослойная хроматография (ТСХ)** — один из наиболее часто используемых методов хроматографического анализа. В этом методе разделение веществ происходит в тонком слое сорбента, нанесенного на твердую подложку.

Хроматографическая пластинка представляет собой основу из стекла, алюминия или полимера. В связи с тем, что стеклянная основа становится менее популярной (часто бьется, нельзя разделить пластинку на несколько частей, не повредив слой сорбента), наибольшее распространение получили пластины, в качестве основы которых используют алюминиевую фольгу или полимеры.

Для закрепления сорбента применяют гипс, крахмал и другие вещества, которые удерживают зерна сорбента на подложке. Толщина слоя может быть различна (100 мкм и более), но самый важный критерий — слой должен быть равномерный по толщине в любом месте хроматографической пластинки. Наиболее распространенным сорбентом является *силикагель*. Кроме того, используют окись алюминия, кремнекислый магний, целлюлозу и другие сорбенты.

Преимущество ТСХ перед бумажной хроматографией заключается в скорости разделения веществ, значительно большей чувствительности и устойчивости слоя по отношению к агрессивным проявителям и нагреванию. В некоторых случаях количества обнаруживаемых веществ находятся в пределах от 0,1 до 0,005 мкг.

**Цель работы.** Ознакомиться с методом разделения веществ с использованием тонкослойной хроматографии и сравнить его с методом распределительной хроматографии на бумаге.

#### ***Оборудование и реактивы***

1. Пластинки марки Silufol размером 37,5 × 75,0 мм.
2. Капилляры.
3. Хроматографическая камера.
4. Красители: красный крезоловый, судан IV, судан Ж, азобензол.
5. Раствор гексана и бензола (1 : 1).

## Ход работы

Для хроматографии используют пластинку марки Silufol размером  $37,5 \times 75,0$  мм. Отступив 5 мм от края узкой стороны, проводят мягким карандашом линию старта. Соприкосновение карандаша с поверхностью пластинки должно быть очень легким, без нажима.

Слой сорбента ни в коем случае не должен повреждаться. Затем линию старта размечают короткими штрихами через 7,5 мм, начиная от края. Таких штрихов будет четыре. На пересечении штрихов с линией старта наносят смесь из четырех красителей (красный крезоловый, судан IV, судан Ж, азобензол) и три красителя по отдельности (1 — судан IV, 2 — судан Ж, 3 — азобензол). Для нанесения используют капилляр. Все образцы наносят в виде точки. Диаметр образующихся пятен должен находиться в пределах 4–6 мм. Необходимо очень аккуратно касаться поверхности пластинки капилляром.

Повреждение сорбента ухудшает качество разделения.

В хроматографическую камеру наливают 6 мл растворителя бензол : гексан (1 : 1). Помещают в камеру пластинку, закрывают крышку и наблюдают за процессом. Замечают время прохождения растворителя до верхнего края пластинки, после чего ее вынимают, подсушивают и определяют  $R_f$  соединений. Заносят полученные результаты в таблицу и сопоставляют их с табличными значениями  $R_f$ .

**Вывод.** Отмечают основные преимущества тонкослойной хроматографии перед хроматографией на бумаге.

## Вопросы для самоконтроля

1. Для чего предназначен метод тонкослойной хроматографии и на чем он основан?
2. Какие вещества применяют в качестве сорбентов и какими свойствами они должны обладать?
3. Какие вещества используют для закрепления сорбента?
4. В чем сходство между двумя методами (бумажной и тонкослойной хроматографией)?
5. Укажите основные различия между бумажной и тонкослойной хроматографией.
6. Какими преимуществами обладает метод тонкослойной хроматографии перед бумажной хроматографией?

7. В чем проявляется более значительная чувствительность метода тонкослойной хроматографии по сравнению с бумажной и чем она объясняется?

8. Чем объясняется более высокая скорость тонкослойной хроматографии по сравнению с бумажной и как это отражается на точности метода? \_\_\_

## 5. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5. ДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ

**Оборудование и реактивы:** мерный цилиндр на 25 мл, химические стаканы, воронки для фильтрования, вата, пробирки, водяная баня, термометры до 100°С, сосуд со льдом, пластинки стеклянные, стеклянные палочки, ступка с пестиком, раствор крахмального клейстера, 1 % раствор йода в йодистом калии, дрожжи, 1 % раствор сахарозы.

### Опыт 1. Приготовление разбавленной слюны.

Ополаскивают рот 2–3 раза дистиллированной водой, чтобы удалить остатки пищи.

Затем отмеряют цилиндром 20 мл дистиллированной воды, сливают в стакан и ополаскивают этой водой рот в течение 1–2 мин., выливают жидкость в другой стакан.

Эту операцию повторяют 2–3 раза. Собранную жидкость (примерно 50–60 мл) фильтруют через вату, и прозрачный фильтрат употребляют для проведения следующих опытов.

### Опыт 2. Гидролиз крахмала под действием амилазы слюны.

В две пробирки наливают по 5 мл крахмального клейстера и в одну из них 5 мл воды, а в другую 5 мл раствора слюны. Обе пробирки одновременно помещают в водяную баню, в которой поддерживают температуру 40°С. В каждую пробирку помещают стеклянную палочку. Наблюдение за ходом гидролиза осуществляют с помощью йодной реакции.

Для этого наносят на стеклянную пластинку, положенную на лист белой бумаги, несколько капель раствора йода в йодистом калии и смешивают их с каплями гидролизуемой смеси из пробирок, где идет гидролиз. Через 1 мин. с момента нагревания пробирок в водяной бане от каждой смеси отбирают, с помощью стеклянной палочки по капле жидкости и смешивают ее с каплей раствора йода на стекле. Повторяют подобное исследование через 2, 4, 6, и 8 минут. После 10 минут выдержки смеси в водяной бане к оставшейся в каждой пробирке жидкости добавьте 1–2 мл Фелинговой жидкости и нагрейте. *Что происходит при этом в пробирках? Объясните результаты наблюдений.*

### Опыт 3. Влияние температуры на активность амилазы слюны.

В три пробирки А, В, и С наливают по 5 мл разбавленной слюны.

Пробирку А помещают в сосуд со льдом, пробирку В оставляют при комнатной температуре, которую отмечают по термометру, а пробирку С помещают на водяную баню при температуре 40°С. Через 5 мин. во все три



пробирки добавляют по 5 мл раствора крахмала. С помощью стеклянных палочек одновременно берут пробы из пробирок А, В и С и смешивают их с каплями йода в йодистом калии, нанесенными на стеклянной пластинке. Отмечают окраску проб жидкостей из каждой пробирки.

Пробы берут через каждые 2 минуты до тех пор, пока жидкость из какой – либо пробирки уже не будет изменять желтой окраске йода, что свидетельствует об окончании процесса гидролиза в данной пробирке.

Ход гидролиза крахмала отмечают в таблице по окраске с йодом различных проб:

Состав пробы	Время в минутах						
	0	2	4	6	8	10	12
А (крахмал + слюна при 0°С)							
В (крахмал + слюна)							
С (крахмал + слюна при 40°С)							

*В заключении следует сделать выводы об оптимальной температуре для действия фермента и относительной скорости гидролиза при различных температурах.*

#### Опыт 4. Действие сахарозы.

5 г дрожжей растереть в фарфоровой ступке с 2 –3 мл воды и небольшим количеством речного песка. К тщательно растертой массе добавить около 40 мл дистиллированной воды, хорошо перемешать и полученный раствор профильтровывать через вату.

В две пробирки налить по 2 мл приготовленной вытяжки и добавить в каждую по 5 мл воды. Содержимое одной из пробирок нагреть до кипения и охладить. Затем в обе пробирки внести по 5 мл 1% раствора сахарозы и оставить на 10 минут. По истечении времени исследовать содержимое каждой пробирки на способность восстанавливать реактив Фелинга. Для этого к 4 мл реактива Фелинга в пробирке добавить 2 мл исследуемого раствора и смесь довести до кипения.

Опишите, результаты опыта и объясните их

#### Расчетно-графические задания.

1. Приведите возможные уравнения реакций, которые иллюстрируют каталитическое влияние липазы, фосфатазы, гидролазы, синтетазы, карбон-нитроген-лигазы, карбон-кислород-лигазы.

2. Напишите уравнения реакций (с использованием структурных формул субстратов) и определите класс ферментов, которые участвуют в следующих превращениях:

- 1) аденозин +  $\text{H}_2\text{O}$  → аденин + рибоза
- 2) АМФ +  $\text{H}_2\text{O}$  → аденозин +  $\text{H}_3\text{PO}_4$
- 3) аденозин +  $\text{H}_3\text{PO}_4$  → аденин +  $\beta$ -D-рибофуранозо-1-фосфат
- 4) глутаминовая кислота +  $\text{NH}_3$  + АТФ → глутамин + АДФ +  $\text{H}_3\text{PO}_4$
- 5) фумаровая кислота +  $\text{NH}_3$  → аспарагиновая кислота
- 6) аденозин +  $\text{H}_2\text{O}$  → инозит +  $\text{NH}_3$
- 7) глутаминовая кислота →  $\gamma$ -аминомасляная кислота
- 8)  $\text{NH}_3$  +  $\text{CO}_2$  + АТФ → АДФ + карбамоилфосфат
- 9) ПВК →  $\text{CO}_2$  ацетальдегид
- 10) ПВК +  $\text{CO}_2$  + АТФ → ЩОК + АДФ +  $\text{H}_3\text{PO}_4$
- 11) ацетил-КоА + глиоксиловая кислота → малатоил-КоА
- 12) стеариновая кислота + HS-КоА + АТФ → стеарил-КоА + АМФ + пиррофосфат

## 6. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6 ВЫДЕЛЕНИЕ И ГИДРОЛИЗ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ

Нуклеопротеиды относятся к группе сложных белков, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты.

Оборудование:

центрифуга для микропробирок, 14800 об/мин, 21100g, MicroCL 21R, с охлаждением

баня водяная до 100°C, TW-2.02, Elmi

pH-метр, портативный, pH-420, Аквилон

автоматическая пипетка механическая с переменным объемом Thermo (Ленпипет) с наконечниками

Реактивы и материалы:

ступка с пестиком, стакан, воронка, пробирки, колба для фильтрования, 0,4%, 4%, 10% растворы гидроксида натрия, 10% растворы уксусной и серной кислот, 5% раствор сернокислой меди, Фелингова жидкость, растворы орцина или флороглюцина, аммиачный раствор окиси серебра, 25% раствор аммиака, раствор молибденовокислого аммония.

Ход работы:

### Опыт 1. Выделение нуклеопротеида из дрожжей.

5 г дрожжей смешивают в ступке с 2 мл воды, добавляют немного песка и тщательно растирают, примешивая небольшими порциями 25–13 мл 0,4% раствора гидроксида натрия в течение 15–20 мин. После этого смесь подвергают центрифугированию. Центрифугат сливают в стакан и по каплям прибавляют 10% уксусную кислоту, до прекращения выделения осадка (5–6 мл), полученный осадок нуклеопротеида отделяют от раствора на центрифуге.

### Опыт 2. Гидролиз нуклеопротеида.

В колбу или пробирку помещают осадок нуклеопротеида и 20 мл 10% раствора серной кислоты, нагревают до 35–40°C. Гидролизат охлаждают, отфильтровывают и в прозрачном растворе определяют наличие белка, пентозы, пуриновых оснований и фосфорной кислоты из которых состоит нуклеопротеид. Белок обнаруживают с помощью биуретовой или миллоновой реакции. Пентозу обнаруживают по характерному окрашиванию при взаимодействии с орцином или флороглюцином, или путем восстановления

меди в щелочном растворе гидрата оксида меди. К 1 мл реактива (с орцина или флороглюцина) добавляют половину объема гидролизата и нагревают до кипения. В случае использования орцина появляется зеленое окрашивание, а в случае использования флороглюцина – розово-красное.

Во втором случае в пробирку наливают 3–4 мл гидролизата и 2 мл 10% раствора гидроксида натрия. К смеси прибавляют при встряхивании по каплям 5% раствор медного купороса, образующийся при этом осадок гидрата окиси меди растворяется. Раствор окрашивается в синий цвет. Медный купорос приливают до появления не исчезающей при встряхивании мути. Пробирку нагревают в верхней части до начинающегося кипения жидкости. При этом появляется сначала желтый осадок гидрата закиси меди, который переходит в красный осадок закиси меди. В этом опыте лучше использовать Фелингову жидкость, которая при смешивании в равных объемах с гидролизатом при нагревании в пробирке, образует красный осадок закиси меди.

Пуриновые основания обнаруживают при реакции с аммиачным раствором окиси серебра. К 2 мл гидролизата в пробирке приливают по каплям крепкий раствор аммиака до щелочной реакции и добавляют около 1 мл аммиачного раствора окиси серебра, при этом образуется хлопьевидный осадок серебряных солей пуриновых оснований.

Фосфорную кислоту обнаруживают с помощью молибденовокислого аммония. К 2 мл раствора молибденовокислого аммония в азотной кислоте прибавляют 2–3 мл раствора гидролизата. Смесь слегка нагревают, образуется желто-зеленый осадок фосфорномолибденовокислого аммония  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot \text{MoO}_3$ .

## 7. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7

### ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

**Цель работы:** Освоить метод разделения нуклеиновых кислот с помощью электрофореза в агарозном геле

**Оборудование:**

электрофорезная горизонтальная камера S-1 (SE-1), 7,6x12,5 см, 10 лунок, 1 мм, заливочный столик

источник питания, 10-800 В, 3-200 мА, 0,5-80 Вт, 2 выхода, Эльф-8

трансиллюминатор, 254 нм/видимый свет, лампы 8 Вт (6x254 нм)+(2x видимый свет), TFP-C/WL, Vilber

баня водяная до 100°C, TW-2.02, Elmi

pH-метр, портативный, pH-420, Аквилон

автоматическая пипетка механическая с переменным объемом Thermo (Ленпипет) с наконечниками

магнитные мешалки с термоконтроллером

**Реактивы:**

Для электрофореза применяются трис-ацетатные, трис-боратные или трис-фосфатные буферы в концентрации 50 мМ с pH от 7,5 до 7,8.

Концентрированный буфер для нанесения проб (содержит 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленцианола, 30% глицерина в H<sub>2</sub>O.)

Агароза.

Пробы ДНК (0,2-0,4 мкг ДНК в объеме 5 – 10 мкл).

**Ход работы:**

1. Добавляют необходимое количество порошка агарозы в рассчитанный объем электрофорезного буфера. Объем буфера вычисляют, умножив площадь формы для агарозы для геля на его толщину. Если площадь формы для агарозы равна 70 см<sup>2</sup>, а толщина 0,5 см, то объем буфера составит 35 см<sup>3</sup>. Для приготовления 2 %-го агарозного геля в этом случае надо взять 0,7 г агарозы.

2. Нагревают взвесь в бане с кипящей водой или в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не образует равномерную суспензию. Суспензию довести до начала кипения, затем осторожно удалить из микроволновой печи и охладить до 60<sup>0</sup> С.

3. Заливают полученную суспензию в форму для агарозы.

4. Устанавливают гребенку в форму для агарозы. Необходимо, чтобы между дном лунки от гребенки и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 0,5-1,0 мм, т.е. чтобы дном лунки служил агарозный гель.

5. После того как гель полностью затвердеет (через 30-45 мин.), осторожно удаляют гребенку и помещают гель в электрофорезную кювету.

6. Добавляют достаточное количество электрофорезного буфера, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1 мм.

7. Смешивают пробы ДНК с буфером для нанесения пробы, содержащим глицерин и красители (бромфеноловый синий и ксиленцианол) в соотношении 5 : 1. С помощью автоматической микропипетки вносят смесь в лунки геля под электрофорезный буфер. Обычно буфер для нанесения проб готовят в виде раствора 6-10-кратной концентрации.

8. Подсоединяют электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении разделения в агарозных гелях составляет 1-3 В/см. Красители как и ДНК перемещаются катоду. Бромфеноловый синий передвигается со скоростью равной скорости фрагмента ДНК из 300 пар оснований, а ксиленцианол со скоростью равной скорости фрагмента ДНК из 1500 пар оснований.

9. По окончании разделения вынимают подложку с гелем из кюветы и помещают гель вместе с подложкой в красящий раствор (1 мкг/мл бромистого этидия). После 15 мин. прокрашивания вынимают подложку вместе с гелем и промывают в воде в течение 4 мин.

10. Жидкость с подложки удаляют с помощью фильтровальной бумаги и перекладывают подложку в камеру трансиллюминатора гель-документирующей системы.

11. Рассматривают гель в проходящем ультрафиолетовом свете. Фиксируют полученное изображение и оформляют результаты, используя гель-документирующую систему.

## 8. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИННОГО АЗОТА МЕДНЫМ СПОСОБОМ

**Цель работы:** Освоить метод количественный метод определения азота в биологических образцах

**Оборудование:**

автоматическая пипетка механическая с переменным объемом Thermo (Ленпипет) с наконечниками

весы аналитические, 120 г/ 0,1 мг, внутренняя калибровка

pH-метр портативный pH-420, Аквилон

титратор универсальный

магнитные мешалки с термоконтроллером

Реактивы и материалы:

колбы мерные на 25мл,

бюретка на 20–50 мл,

воронка для фильтрования,

конические колбы на 50 мл – 2 шт.,

раствор хлорной меди (27,3 г в 1 л раствора), трехзамещенный фосфат натрия (68,5 г ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ) в 1 л раствора), боратный буферный раствор (28,6 г буры растворяют в 750 мл воды, добавляют 50 мл 1н раствора  $\text{HCl}$  и добавляют водой до 1 л), суспензия фосфорнокислой меди, тимолфталейн (0,25 г тимолфталейна в 100 мл 50% этилового спирта), 0,1н раствор тиосульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ), 1% раствор крахмала, раствор иодистого калия (10г в 100 мл раствора), концентрированная уксусная кислота, 0,5н раствор гидроксида натрия, 1% раствор глицина.

**Ход работы:**

В мерную колбу на 25 мл берут 2 мл исследуемого раствора (1% раствор глицина). Добавляют 2 капли фенолфталеина и по каплям прибавляют раствор едкого натра до слабозащелочивания, (т.е. доводят pH раствора до 10,2). После этого добавляют 10 мл суспензии фосфата меди и хорошо перемешивают. Если вся суспензия фосфата меди входит в реакцию (на что указывает отсутствие осадка – избытка фосфата меди), следует добавить еще 5

мл суспензии. Колбу доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают многократным переворачиванием колбы и отфильтровывают избыток фосфата меди через плотный фильтр. Фильтрат должен быть совершенно прозрачным. Из фильтрата берут две пробы по 10 мл в конические колбы для титрования, подкисляют 0,5 мл концентрированной уксусной кислоты, добавляют 5 мл раствора йодистого калия и выделившийся йод титруют 0,01 н раствора тиосульфата натрия. Крахмал добавляют в тот момент, когда раствор примет соломенно-желтую окраску, в количестве 0,1–0,2 мл (2-4 капли). Титрование продолжают до исчезновения появившейся синей окраски. По окончании процесса титрования отмечают количество мл тиосульфата натрия, пошедшего на титрование 10 мл пробы. Необходимо также проделать холостой опыт, в котором вместо раствора глицина берется такой же объем дистиллированной воды и все остальные операции проводятся также, как и в случае раствора аминокислоты. Если на титрование холостого опыта затрачивается какое-то количество мл тиосульфата натрия, то это его количество вычитают из найденного для опытного раствора. По уравнению реакции 1 атом выделившегося йода соответствует 1 атому меди, а атом меди соответствует 2 атомам или 28 г аминного азота. С другой стороны, 1 атом йода реагирует с другим эквивалентом тиосульфата натрия, следовательно, 1 эквивалент тиосульфата натрия соответствует 28 г аминного азота. Отсюда, 1 мл 0,01 н раствора тиосульфата натрия отвечает 0,28 мг аминного азота. Умножением величины 0,28 мг на затраченный объем 0,01 н раствора тиосульфата натрия получают количество мг аминного азота во взятом объеме пробы (10мл). После этого делают перерасчет на весь объем раствора в колбе (25мл) и сравнивают найденное количество аминного азота с теоретическим количеством содержащимся в 2 мл исследуемого раствора глицина.



## Рекомендуемая литература

1. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2-х томах. – М.: Мир, 1993.
2. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
3. Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В. Биохимия. –М.: ГЭОТАР-Мед., 2004. – 779 с.
4. Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В., Силаева С.А. Биологическая химия. – М.: Медицина, 2008. – 368 с.
5. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. – М.: МАИК, 2002. – 431 с.
6. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки: В 2-х томах. – М.: Мир, 1994.
7. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. – М.: Просвещение. – 1987. – 815 с.
8. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир. – 2000. – 469 с.
9. Уилсон К., Уолкер Дж. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. – М.: Бином, 2014. – 848 с.
10. Boyer R. Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques. 2nd Edition. - Prentice Hall, 2012. - 382 p.
11. Ленинджер А. Основы биохимии. – М.: Мир, 1985.
12. Рис. Э., Стенберг М. Введение в молекулярную биологию. От клеток к атомам. – М.: Мир, 2002.
13. Льюин Б., Кассимерис Л., Лингаппа В. П., Плоппер Д. Клетки. – М.: Бином, 2011.