

Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра биохимии и микробиологии

Е.В. Бибарцева

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ В БИОХИМИИ

Методические указания

Рекомендовано к изданию редакционно-издательским советом
федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Оренбургский государственный университет» для
обучающихся по образовательной программе высшего образования по
направлению подготовки 06.04.01 Биология

Оренбург

2018

УДК 577(076/5)
ББК 28.07я7
Б59

Рецензент - доцент, кандидат биологических наук, А.Н. Сизенцов

Б 59 **Бибарцева, Е.В.**

Молекулярная биология в биохимии: методические указания/ Е.В. Бибарцева; Оренбургский гос.ун-т. – Оренбург: ОГУ, 2018. – 36с.

Данные методические указания содержат лабораторные занятия по обязательной дисциплине «Молекулярная биология в биохимии» базовой части по образовательным программам высшего образования по направлению подготовки 06.04.01 Биология, магистерской программы «Биохимия и молекулярная биология», в соответствии с требованиями рабочей программы.

УДК 577(076/5)
ББК 28.07я7

© Бибарцева Е.В, 2018
© ОГУ, 2018

Содержание

1 Правила выполнения и оформления лабораторных работ	4
2 Лабораторная работа № 1 Осаждение белков органическими кислотами. Осаждение белков при кипячении	7
3 Лабораторная работа № 2 Выделение и анализ сложных белков	11
4 Лабораторная работа № 3 Выделение ДНК из растительных клеток	16
5 Лабораторная работа № 4 Открытие ферментов в биообъектах. Свойства ферментов.....	18
6 Лабораторная работа № 5 Термолабильность ферментов. Специфичность ферментов.....	21
7 Лабораторная работа № 6 Влияние активаторов и парализаторов на амилазу	24
8 Лабораторная работа № 7 Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину).....	26
9 Лабораторная работа № 8 Определение спонтанного и индуцированного гемолиза.....	29
10 Лабораторная работа № 9 Определение деформируемости эритроцитов	34
Список использованных источников	36

1 Правила выполнения и оформления лабораторных работ

Изучение методики выполнения работы производится студентами самостоятельно и включает в себя изучение физической сути исследуемого явления и принципиальной схемы экспериментальной установки. Для этого в начале каждой работы имеется краткий теоретический материал. Дополнительный материал можно получить, изучая учебную и научную литературу, список которой приведен в пособии. В тетради для лабораторного практикума должны быть подготовлены расчетные формулы, таблицы для записи измеренных значений, вычерчена схема экспериментальной установки. В лаборатории студент обязан подробно ознакомиться с используемыми в работе приборами (макетами), записать их характеристики в тетрадь, произвести предварительные расчеты режимов работы, оценить величины возможных ошибок в измерениях. Приступать к выполнению работы следует только после получения от преподавателя допуска.

Выполнение каждой лабораторной работы состоит из пяти основных этапов:

1. Предварительная подготовка к работе.
2. Получение допуска к работе.
3. Выполнение работы в лаборатории.
4. Оформление отчета.
5. Защита лабораторной работы.

Первый этап. При предварительной подготовке к лабораторной работе необходимо изучить теорию и методику работы по руководству к лабораторной работе, рекомендуемой литературе, лекциям.

В рабочую тетрадь записать:

- 1) Номер и название работы, приборы, оборудование.
- 2) Краткую теорию.
- 3) Рисунки, схемы.

4) Таблицы для записи измерений и вычислений (под таблицей оставить место для расчетных формул, погрешностей и результатов по вычислениям по ним).

5) Рекомендуемую литературу.

Второй этап. Получить допуск к работе. Для этого необходимо иметь представление об исследуемом физическом явлении и знать методику измерений величины, ожидаемый характер зависимостей между измеряемыми физическими величинами.

В рабочей тетради иметь предварительные записи.

(Допуск сдается перед началом работы).

Третий этап. Собрать установку, изучить применяемые в работе приборы и выполнить измерения. Результаты измерений записать карандашом в заготовленные на первом этапе таблицы в рабочей тетради.

Четвертый этап. После выполнения лабораторной работы студент обязан представить отчёт, форма которого должна быть следующей.

1) Сведения о лабораторной работе:

- a) номер лабораторной работы;
- b) название лабораторной работы;
- c) цель работы;
- d) приборы и материалы.

2) Методика эксперимента:

- a) проведение эксперимента;
- b) рисунок или схема установки;
- c) расчётные формулы.

3) Результаты измерений:

- a) номер таблицы;
- b) название таблицы;
- c) таблица с указанием в графах физических величин, единиц их измерения, погрешностей полученных величин.

4) Графическое представление результатов (если таковые имеются):

- a) указать физические величины, отложенные по осям координат, и единицы их измерения;
 - b) обосновать выбор масштаба по осям координат;
 - c) построить график (если графиков несколько, то они должны быть разного цвета).
- 5) Выводы по проведению работы.

Пятый этап. Для успешной защиты лабораторной работы необходимо знать теорию исследуемого явления, понимать результаты выполняемого эксперимента; уметь объяснить методику проведенных измерений, продемонстрировать умение грамотно пользоваться приборами, которые применялись в работе, представить аккуратно оформленный отчет.

Правила подготовки и оформление лабораторной работы

I. Форма протокола лабораторных работ

- 1) дата выполнения.
- 2) название работы.
- 3) цель работы.
- 4) принцип метода.
- 5) химизм реакций.
- 6) схема установки или рисунок прибора.
- 7) последовательность проводимых операций.
- 8) результаты экспериментальных наблюдений и измерений.
- 9) метод расчета.
- 10) выводы.

II. Порядок подготовки к выполнению лабораторной работы

Студент должен иметь специальную тетрадь (рабочий журнал) для лабораторных работ. При подготовке к занятию требуется изучить теоретические основы соответствующей темы, используя лекции и источники, указанные в списке литературы. В теоретическом введении к разделам практикума раскрываются основные понятия биохимии биомолекул, при этом ключевые слова выделены жирным шрифтом. Для успешного усвоения

изучаемой темы студенты должны выполнить задания и ответить на вопросы, которые приведены в соответствующем разделе практикума. Далее студент должен внимательно ознакомиться с методикой выполнения лабораторной работы, изложенной в практикуме, и заполнить пункты 1–6 протокола по прилагаемому образцу. Теоретические вопросы по теме и особенности выполнения предстоящей работы обсуждаются преподавателем и студентами непосредственно на занятии перед проведением работы. После обсуждения со студентами протокол может быть дополнен. Завершив подготовку, можно получить реактивы, лабораторную посуду и приступить к самостоятельному выполнению работы.

III. Порядок оформления экспериментальных результатов

Результаты экспериментальных наблюдений и измерений при проведении лабораторной работы заносят в протокол. По полученным экспериментальным данным проводят необходимые расчёты. Лабораторная работа считается выполненной только после выводов, полученных по результатам работы. Выводы должны содержать краткий анализ наблюдаемых изменений и полученных результатов.

2 Лабораторная работа № 1 Осаждение белков органическими кислотами. Осаждение белков при кипячении

Опыт №1. Осаждение белков органическими кислотами

Принцип метода: Органические кислоты также вызывают необратимое осаждение белков. Большое практическое применение получили трихлоруксусная и сульфосалициловая кислоты, обладающие высокой чувствительностью по отношению к белку. Помимо белков, сульфосалициловая кислота осаждает также продукты их распада высокомолекулярные пептоны и

полипептиды. Трихлоруксусная кислота способна осаждать только белки. После осаждения белков трихлоруксусная кислота удаляется путем кипячения фильтрата.

Реактивы: раствор яичного белка для высаливания; трихлоруксусная кислота, 10 % раствор; сульфосалициловая кислота, 20 % раствор.

Ход работы:

К 5 каплям раствора белка добавляют 2 капли 20 % раствора сульфосалициловой кислоты. Выпадает осадок белка.

К 5 каплям раствора белка добавляют 2 капли 10 % раствора трихлоруксусной кислоты. Выпадает осадок белка.

Оформление опыта: полученные результаты опыта записать в тетрадь и сделать вывод.

Опыт № 2 Осаждение белков при нагревании

Принцип метода: Выпадение белков в осадок при нагревании характерно почти для всех белков (исключение составляет желатина, не свёртывающаяся при нагревании). Особенно легко и более полно происходит осаждение белка в слабокислой среде, вблизи от изоэлектрической точки. В нейтральной и сильнокислой средах осаждение белков идёт значительно хуже, а в щелочной среде вовсе не наблюдается.

В щелочной среде понижается диссоциация белка по радикалам диаминокислот, молекулы его приобретают отрицательный заряд, вследствие чего остаются в растворе даже при нагревании до кипения.

Добавление к раствору белка нейтральных солей (NaCl) облегчает и ускоряет свёртывание белков при кипячении вследствие наступающего дегидратирования белковых частиц.

Ход работы:

В 5 пробирок наливают по 2 мл. белка: первую пробирку нагревают, осадок появляется еще до того, как жидкость закипит. Во вторую пробирку добавляют 1 каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты (CH_3COOH) и нагревают. Хлопьевидный осадок белка выпадает скорее и полнее, чем в первой

пробирке вследствие того, что при подкислении рН раствора приблизится к изоэлектрической точке белка (заряд белка = 0). В третью пробирку добавляют 0,5 мл. 10%-ной уксусной кислоты (CH_3COOH) и нагревают. Осадка не образуется даже при кипении. В четвертую пробирку добавляют 0,5 мл. 10%-ной уксусной кислоты (CH_3COOH) и несколько капель насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают. Осадок есть. В пятую пробирку добавляют 0,5 мл. 10% раствора щелочи и нагревают. Осадок не образуется даже при кипячении.

Оформление работы: Результаты опыта и выводы записывают в таблицу.

№ пробирки	Среда	Наблюдаемые изменения	Выводы
1.	Нейтральная		
2.	Слабокислая (1% раствор CH_3COOH)		
3.	Кислая (10% раствор CH_3COOH)		
4.	Кислая (10% раствор CH_3COOH + NaCl)		
5.	Щелочная (10% раствор NaOH)		

Опыт № 3 Осаждение белков солями тяжелых металлов

Принцип метода: С солями тяжелых металлов (ртути, серебра, свинца, меди и др.) белки образуют металлоорганические соединения, нерастворимые в воде. Чтобы осадить белки солями тяжелых металлов в отличие от высаливания белков солями щелочных и щелочноземельных металлов, требуются небольшие количества солей. Избыток таких солей, как $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ и PbSO_4 вызывает растворение выпавшего осадка, поскольку избыток ионов металла перезаряжает белковый комплекс. То же самое происходит при добавлении NaCl к осадку ртутного соединения.

Белковые осадки, полученные при действии солей тяжелых металлов, нерастворимы в первоначальном растворителе (в воде и слабых растворах солей), т.е. реакция необратима. Соли тяжелых металлов полностью осаждают

и денатурируют белки. Этими реакциями пользуются для освобождения растворов белков. Соли тяжелых металлов одновременно с белками осаждают и другие азотистые вещества. Доказано, например, что ряд аминокислот (лейцин, фенилаланин, метионин, триптофан, цистеин) образуют с медью труднорастворимые соли.

Ход работы:

В четыре пробирки наливают по 2 мл белковой вытяжки из муки и по каплям прибавляют растворы: в первую пробирку сулемы(яд!), во вторую – CuSO_4 , в третью – AgNO_3 , в четвертую - $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$. После добавления реактивов наблюдают за образованием осадков. В пробирки с осадками, полученными под действием $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ и CuSO_4 , добавляют избыток этих солей. Осадки растворяются. В пробирку с осадком, полученным от прибавления сулемы, добавляют 7-10 капель насыщенного раствора NaCl . Осадок растворяется.

Оформление опыта: полученные результаты опыта записать в тетрадь и сделать вывод.

Контрольные вопросы:

1. Как ведут себя белки в водном растворе и в присутствии избытка кислоты или щелочи?
2. Что такое изоэлектрическая точка белка и как её определяют?
3. От чего зависит растворимость белка? Какие факторы стабилизируют белок в растворе?
4. Каковы общие механизмы осаждения белка из растворов? Какими способами можно осадить белок, не вызывая его денатурацию?
5. Что такое высаливание белков?
6. Что такое денатурация белков? Какие денатурирующие белок агенты вам известны?
7. В чем заключается разница между осаждением и денатурацией белка?
8. Каким образом можно разделить альбумины и глобулины?
9. Чем отличается денатурированный белок от нативного?

10. При каких условиях, и какие вещества вызывают необратимое осаждение белков? В какой среде белок не свертывается?

3 Лабораторная работа № 2 Выделение и анализ сложных белков

Сложные белки – комплексы, состоящие из белка и небелкового компонента, называемого простетической группой. К сложным белкам относятся: нуклеопроотеиды, гликопротеиды, липопротеиды, металлопротеиды и сложные белки-ферменты. Так, небелковой частью хромопротеидов являются окрашенные вещества, фосфопротеидов – фосфорная кислота, нуклеопроотеидов – нуклеиновые кислоты и т. д. С помощью цветных реакций можно открыть составные компоненты сложных белков.

Цель работы:

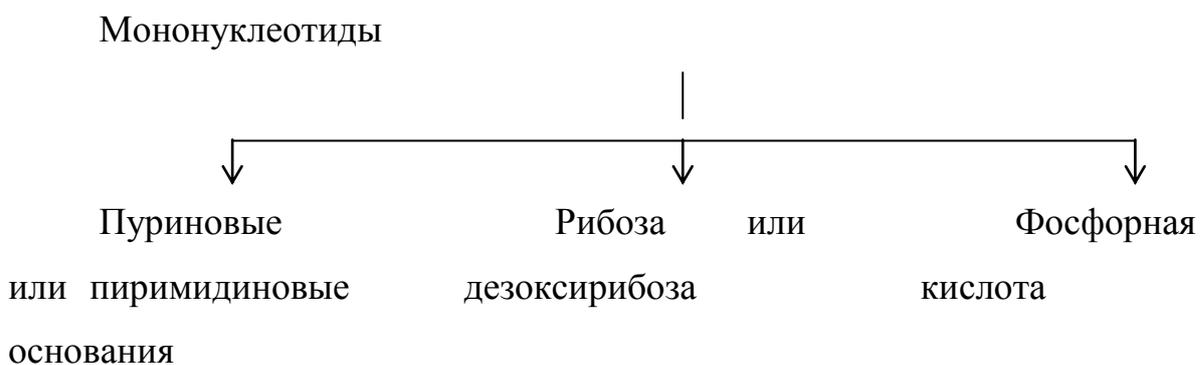
- 1) изучить состав сложных белков – хромопротеидов, фосфопротеидов, нуклеопроотеидов;
- 2) научиться практически открывать сложные белки, открывать их составные части и компоненты.

Принцип метода: Нуклеиновые кислоты в клетке находятся в виде нуклеопроотеиновых комплексов, которые рассматриваются как сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты. Для качественного анализа химического состава нуклеопроотеинов может быть использован гидролизат дрожжей как объект, богатый нуклеопроотеинами.

При частичном гидролизе нуклеопроотеины распадаются на белок (протамины и гистоны) и нуклеиновые кислоты. При полном гидролизе нуклеиновые кислоты распадаются на составляющие их компоненты по схеме:

Нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды)





Опыт № 1 Получение нуклеопротеидов из пекарских дрожжей

Дрожжи богаты нуклеопротеидами рибозного типа. Нуклеопротеид можно извлечь из разрушенных клеток дрожжей при щелочной реакции раствора и осадить подкислением.

Приборы: ступка с пестиком, стакан или колба на 50-100 мл, цилиндр на 100 мл, центрифуга на 2500-3000 оборотов, пробирки для центрифуги, пипетки, стеклянная палочка.

Реактивы: дрожжи прессованные, диэтиловый эфир, стеклянный песок, 0,4%-ный раствор NaOH, 5%-ная уксусная кислота.

Ход работы:

5 г дрожжей помещают в ступку, добавляют 10 капель эфира и 10 капель воды. Вносят щепотку песка и тщательно растирают. К гомогенату приливают 30 мл раствора NaOH и продолжают растирание в течение 15 минут.

Содержимое ступки разливают в две пробирки для центрифуги (с помощью пробирки с делениями на 10 мл) поровну. Вес одной центрифужной пробирки с содержимым должен быть равен весу другой центрифужной пробирки с содержимым. Центрифугируют в течение 5 - 10 мин при 2500 оборотов.

Центрифугат из всех пробирок выливают, а осадок нуклеопротеида собирают со дна шпателем и переносят в круглодонную колбу для гидролиза.

Опыт № 2 Гидролиз нуклеопротеида

Эту реакцию можно осуществить путем кипячения нуклеопротеидов с 5%-ной H_2SO_4 в течение часа. Нуклеопротеид при этом расщепляется на белок и нуклеиновую кислоту, которая распадается на отдельные мононуклеотиды, а затем отщепляются пуриновые основания (аденин, гуанин) и фосфорная кислота. Белок за это время также подвергается частичному гидролизу до низкомолекулярных полипептидов и аминокислот. В гидролизе последовательно можно определить белок, пуриновые основания, пентозу и фосфорную кислоту.

Приборы: штатив с пробирками, колба с обратным холодильником, воронка с фильтром, химический стакан на 100 миллилитров.

Реактивы: H_2SO_4 5%-ный раствор.

Ход работы:

Нуклеопротеид, полученный из дрожжей, переносят в колбочку для гидролиза и добавляют 15 мл 5%-ного раствора серной кислоты. Колбочку закрывают пробкой с обратным холодильником и осторожно кипятят в течение часа.

После охлаждения гидролизат отфильтровывают в химический стакан и используют для анализа продуктов гидролиза.

Опыт №3 Обнаружение простых белков с помощью биуретовой реакции

Приборы: штатив с пробирками, пипетки

Реактивы: 10%-ный раствор $NaOH$, 1%-ный раствор $CuSO_4$.

Ход работы:

В пробирку наливают 1 мл профильтрованного гидролизата, добавляют 1 мл едкого натра и 1 каплю сернокислой меди. Отмечают цвет раствора в пробирке и на основании этого делают вывод о наличии белка (наличие белка в растворе позволяет судить о том, достаточно ли полно прошел гидролиз нуклеопротеида). Вышеописанная реакция называется биуретовой.

Опыт № 4 Обнаружение пентоз в гидролизате нуклеопротеида

Для того, чтобы обнаружить в гидролизате нуклеопро­теида пентозы удобно пользоваться реакцией с жидкостью Фелинга (это одна из реакций окисления альдопентоз).

Приборы: штатив с пробирками, пипетки, спиртовка.

Реактивы: реактив Фелинга, 10%-ный раствор NaOH.

Ход работы:

В пробирку наливают 0,5 - 1 мл гидролизата и нейтрализуют по универсальной индикаторной бумаге путем осторожного прибавления по капле из пипетки NaOH. К нейтрализованному гидролизату добавляют равный объем реактива Фелинга, пробирку встряхивают и нагревают. Отмечают цвет осадка в пробирке, который свидетельствует о наличие пентоз в исследуемом гидролизате.

Опыт № 5 Обнаружение пуриновых оснований в гидролизате нуклеопро­теида

Сущность реакции сводится к образованию серебряных солей пуриновых оснований, которые выпадают на дно пробирки в виде осадка.

Приборы: штатив с пробирками, пипетки, спиртовка.

Реактивы: аммиачный раствор серебра.

Ход работы:

В пробирку наливают 2 мл гидролизата нуклеопро­теида, добавляют 5-6 капель концентрированного аммиака до щелочной реакции (реакцию среды проверяют с помощью универсальной индикаторной бумаги). Затем приливают 0,5 мл аммиачного раствора серебра. Отмечают выпадение хлопьевидного осадка серебряных солей пуриновых оснований, который постепенно оседает на дно. При необходимости раствор можно слегка нагреть, чтобы отчетливее видеть выпадение осадка.

Опыт № 6 Определение фосфорной кислоты

Фосфорную кислоту можно обнаружить с помощью молибдата аммония

Приборы: штатив с пробирками, пипетки, спиртовка.

Реактивы: раствор молибдата аммония в азотной кислоте.

Приготовление молибденового реактива: 7,5 г молибдата аммония растворяют в 100 мл воды и добавляют 100 мл 32%-ной азотной кислоты ($\rho = 1,2$ г/мл). Полное растворение молибдата аммония происходит после добавления азотной кислоты.

Ход работы:

К 2 мл раствора молибдата аммония в азотной кислоте добавляют 1 мл испытуемого раствора. Смесь слегка нагревают. Отмечают цвет образующегося осадка, по которому судят о наличии в исследуемом растворе фосфорной кислоты.

Опыт № 7 Проведение биуретовой реакции

Для подтверждения наличия белков в составе нуклеопротеидов.

Ход работы: к 6 каплям гидролизата прибавляют 10 капель 10%-ного раствора едкого натра до отчетливой щелочной реакции (по лакмусу, опущенному в пробирку), затем 2 капли 1%-ного раствора сульфата меди; появляется розовая или фиолетовая окраска.

Контрольные вопросы:

1. Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
2. Укажите элементный состав белков и пептидов.
3. Охарактеризуйте свойства пептидов.
4. Белки как природные полипептиды.
5. Функции белков.
6. Классификация белков.
7. Структуры белка.
8. Понятие о коагуляции и денатурации. Причины данных явлений.

4 Лабораторная работа № 3 Выделение ДНК из растительных клеток

При выделении ДНК из тканей растений важным фактором является эффективное разрушение клеточных стенок. Многие методы, используемые для этого, приводят к сильной фрагментации ДНК (из-за гидродинамических разрывов в цепи!). Часто приходится находить компромисс между размером ДНК и её количественным выходом, ведь молекулы ДНК – самые крупные полимерные биомолекулы. Высвобождение высокомолекулярной ДНК из клеток – это только часть задачи, поскольку растительные экстракты содержат большие количества белков, полисахаридов, танинов и пигментов, которые в ряде случаев весьма трудно отделить от ДНК. Ткани растений обычно разрушают механическим растиранием в присутствии детергентов, растворяющих мембраны клеток, и хелатирующих агентов, подавляющих действие клеточных нуклеаз за счет связывания двухвалентных катионов. От белков ДНП-комплекса избавляются фенольной депротенизацией образца. Некоторые методики для освобождения ДНК от белков хроматина предусматривают использование протеиназ. После депротенизации препарат всё ещё сильно загрязнён полисахаридами.

Приборы: весы, ножницы, ступка для растирания, мензурка, центрифуга, центрифужные пробирки, химический стакан (50-100 мл), деревянная палочка с насечками.

Реактивы: банан, буферный раствор (120 мл H_2O , 1,5 г $NaCl$, 5 $NaHCO_3$, 5 мл жидкого средства для мытья посуды), изопропиловый спирт охлажденный в морозилке (либо этиловый спирт).

Ход работы:

1. Половину банана измельчите до состояния кашицы любым удобным для Вас способом.

2. 5 мл полученного пюре перенесите в стаканчик и добавьте 10 мл буферного раствора.

3. Полученную смесь энергично перемешивайте в течение не менее 2 минут.

4. Содержимое стаканчика разлейте в центрифужные пробирки. Центрифугируйте 5 минут при 1 тыс. об/мин.

5. Надосадочную жидкость (не менее 5 мл), слейте в чистую пробирку.

6. Аккуратно нанесите 10 мл охлажденного изопропилового (этилового) спирта на стенку слегка наклоненной пробирки. Позвольте спирту медленно стечь по стенке. Если вы все сделали правильно, спирт, плотность которого меньше плотности буфера, останется на поверхности раствора.

7. Поместите тонкую стеклянную или деревянную палочку, например карандаш, в раствор таким образом, чтобы ее кончик оказался непосредственно под границей между буфером и спиртом, и очень осторожно в течение 1 мин поворачивайте попеременно в разные стороны. При этом наиболее длинные фрагменты ДНК накрутятся на палочку. Затем вытащите палочку – спирт заставит ДНК прилипнуть к концу палочки, и вы увидите на нем прозрачный вязкий осадок.

Контрольные вопросы:

1. Что такое ДНК?
2. Формы ДНК, встречающиеся в клетке
3. Какие методы используют для депротеинизации?
4. Где в клетке располагаются молекулы ДНК и РНК?
5. Почему при выделении ДНК из тканей растений важным фактором является эффективное разрушение клеточных стенок?
6. Из чего выделяют ДНК для исследования?
7. Этапы процессы выделения ДНК
8. Методы разрушения клеточных мембран.
9. Для чего проводят лизис клеточных и ядерных мембран?

5 Лабораторная работа № 4 Открытие ферментов в биообъектах. Свойства ферментов

Ферменты — биологические катализаторы белковой природы. Термин фермент (от лат. fermentum закваска) был предложен в начале XVII в. голландским ученым Ван. Гельмонтом для веществ, влияющих на спиртовое брожение. Ферменты и катализаторы неорганической природы, подчиняясь общим законам катализа, имеют сходные признаки:

- катализируют только энергетически возможные реакции;
- не изменяют направление реакции;
- не расходуются в процессе реакции;
- не участвуют в образовании продуктов реакции.

Почти все химические процессы в организмах и в различных производственных смесях протекают при участии ферментов.

Ферменты очень чувствительны к воздействию тепла, кислот, щелочей и солей металлов.

По своей химической природе ферменты являются белками, поэтому обладают всеми свойствами последних: термолабильностью, амфотерностью, способностью образовывать коллоидные растворы. Наряду с этим ферментам присущи и некоторые только для них характерные свойства, такие как, высокая специфичность, действие при определенном значении рН среды и др.

К общим свойствам ферментов относятся высокая каталитическая активность, специфичность действия, чувствительность к изменению температуры.

Действие почти всех ферментов связано с тем, что фермент временно вступает в химическое соединение со своим субстратом, тем самым видоизменяя его, а затем и отделяясь от него. Особенность ферментов —

обратимость их действия. Они катализируют как процесс распада, так и синтеза, однако эти процессы могут катализироваться разными ферментами.

Ферменты, являясь белками, обладают термолабильностью, их действие зависит от рН.

Действие ферментов может активизироваться веществами, которые называют активаторами, или замедляться веществами – ингибиторами.

Цель занятия:

1) ознакомить студентов с методиками проведения ферментативных реакций на примере амилазы;

2) исследовать влияние реакции среды, концентрации фермента и субстрата, температуры на ферментативные реакции; закрепить представления об особенностях строения молекул ферментов;

3) выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;

4) ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;

5) привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

Опыт № 1 Влияние рН среды на активность ферментов

Для каждого фермента существует определенное значение реакции среды, при которой он проявляет наивысшую активность. Изменения рН вызывают снижение или полное торможение деятельности фермента. В основе этого лежит нарушение структуры активного центра (при изменении реакции среды происходит изменение заряда функциональных групп, входящих в состав активного центра). Большинство ферментов проявляет максимальную активность при значениях рН, близких к нейтральным. Лишь отдельные ферменты "работают" в сильно кислой или сильно щелочной среде. В щелочной среде "работают" ферменты, локализованные в кишечнике. Изменение оптимального для данного фермента значения рН-среды может привести к изменению третичной структуры фермента, что скажется на его активности. С другой стороны, при

изменении рН может измениться ионизация субстрата, что повлияет на образование фермент-субстратного комплекса.

Оптимум рН для амилазы слюны можно определить при взаимодействии её с крахмалом при различных значениях рН.

О степени расщепления крахмала судят по его реакции с раствором йода. При оптимальном значении рН расщепление крахмала произойдет полностью и реакция на крахмал с йодом будет отрицательная, но по мере удаления от этой точки в кислую или щелочную среду расщепление крахмала произойдет только частично, до стадии декстринов, которые дадут и йодом красно-бурую или фиолетовую окраску, или же крахмал вообще не будет расщепляться и реакция с йодом будет положительная.

Оборудование и реактивы: 8 пробирок, дистиллированная вода, 0,2 % раствор соляной кислоты (HCl), 1 % раствор крахмала, раствор слюны (1:10), термостат или водяная баня, 1 % раствор йода в йодиде калия.

Ход работы. а) В 8 пробирках приливают по 1 мл дистиллированной воды, а затем в пробирку №1 вносят 1 мл 0,2 % раствора соляной кислоты, перемешивают и отбирают из нее 1 мл смеси, которую переносят в пробирку №3 и так далее. Из пробирки № 8 отбирают 1 мл и выливают. Таким образом, получают различные разведения соляной кислоты, которые соответствуют различным значениям рН среды. После этого в каждую пробирку добавляют по 2 мл 1% раствора крахмала и по 1 мл раствора слюны, разведенной 1:10. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат на 15 мин при 37°C. Затем охладить и добавить во все пробирки по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия. Отметить, что полный гидролиз крахмала произошел в пробирках № 5 и 6, где рН среды раствора находится в пределах 6,8 – 7,2, т. е. оптимальных для действия амилазы.

Оформление результатов: Результаты заносят в таблицу.

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8
рН								
Результат								

Контрольные вопросы:

1. Какие вещества называют ферментами?
2. Какова химическая природа ферментов?
3. Перечислите основные свойства ферментов как биокатализаторов.
4. Каким образом рН среды влияет на активность ферментов?
5. С чем связано действие ферментов?
6. Когда ферменты проявляют максимальную активность?
7. Какую роль выполняют ферменты?
8. В каких органах происходит выработка амилазы?
9. Какие типы изоамилаз обнаруживаются в сыворотке и моче?
10. Каково значение количественного определения активности амилазы в крови и моче?

6 Лабораторная работа № 5 Термолабильность ферментов. Специфичность ферментов

Ферменты являются главным компонентом функционального аппарата клетки. Это белки, действующие как специфические высокоэффективные катализаторы химических реакций, протекающих в живых организмах. К настоящему времени свыше тысячи ферментов получены в индивидуальном виде, а около ста ферментов в виде кристаллов. Ферменты используются как мощные инструменты при изучении структуры биополимеров, а также в генно-инженерных исследованиях. Они нашли широкое применение в медицине и пищевой промышленности.

Опыт №1 Влияние температуры на активность ферментов

Ферменты весьма чувствительны к температуре и проявляют свою наивысшую активность при оптимальном ее значении, которая для ферментов тела человека находится в пределах от 35 °С до 45 °С. При

высокой температуре (свыше 500 °С) их активность снижается, а затем наступает инактивация, так как при этом нарушается структура активного центра и не происходит соединения его с субстратом.

Степень инактивации зависит от длительности теплового воздействия. Вследствие тепловой денатурации белковой молекулы фермента происходит замедление и прекращение ферментативных реакций. При низких температурах ферменты хорошо сохраняются, но скорость ферментативного катализа резко снижается. Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется температурным оптимумом фермента. Различные клеточные ферменты имеют собственные температурные оптимумы, которые определяются экспериментально. Для ферментов животного происхождения температурный оптимум находится в интервале от 40 °С до 50 °С.

В термолабильности ферментов можно убедиться на примере действия фермента амилазы слюны

Ход работы. В две пробирки прилить по 10 капель 1 % раствора крахмала. Затем в одну из них добавить 5 капель раствора слюны, разведенной в 5 раз, а в другую – такое же количество предварительно прокипяченной в течение 10 мин слюны. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат на 15 мин при 37 °С, после чего с содержимым каждой пробирки сделать реакции с йодом, Троммера. В пробирке с прокипяченной слюной гидролиза крахмала не произойдет (почему?).

Опыт №2 Определение специфичности действия ферментов

Каждый фермент действует только на одно вещество или на группу сходных субстратов, что обусловлено соответствием структуры фермента, точнее его активного центра и структуры субстрата. Например, амилаза действует только на крахмал, сахароза – только на сахарозу и т. п.

Специфичность действия бывает абсолютная (действует только на определенный субстрат), относительная, групповая и стереохимическая. Высокая специфичность ферментов определяется только тем, что только

некоторые строго определенные функциональные группы, входящие в состав ферментов, могут участвовать в образовании фермент – субстратного комплекса. Специфичность – это избирательность фермента по отношению к субстрату (или субстратам). Специфичность действия ферментов объясняется тем, что субстрат должен подходить к активному центру как "ключ к замку".

Амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов, не действуя на дисахариды. Сахароза состоит из двух молекул глюкозы, но на неё не действует амилаза, поэтому пробирка с сахарозой не даст реакции в реактивом Фелинга.

Ход работы. В две пробирки (№1) вносят 10 капель 1% раствора крахмала, в другую (№ 2) – 10 капель 2% раствора сахарозы. Затем в пробирки добавляют по 4 капли раствора слюны, разведенной в 5 раз. Перемешивают и оставляют в термостате на 15 мин. при 37⁰С. После этого с содержимым всех четырех пробирок проводят реакции с йодом, с реактивом Фелинга: к 5 каплям исследуемого раствора приливают 3 капли реактива, нагревают пробирку до кипения и кипятят в течение 1 мин. В случае положительной реакции на глюкозу наблюдается красное окрашивание вследствие образующейся закиси меди; результаты заносят в таблицу.

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция с йодом	Реакция Троммера
1	Крахмал	Амилаза		
2	Сахароза	Амилаза		

В выводах следует отметить, в какой пробирке и при каких условиях обнаружено действие ферментов и почему.

Приготовление реактива Фелинга: медный купорос выкристаллизовывают из горячего раствора и высушивают на фильтровальной бумаге. Готовят отдельно два раствора: а) 200 г сегнетовой соли и 150 г едкого натра разводят в мерной колбе (1 л) и доводят водой до метки; б) 40г медного купороса разводят в колбе вместимостью 1 л и доводят

водой до метки. Перед употреблением смешивают эти два раствора в равных пропорциях.

Контрольные вопросы:

1. Что такое фермент?
2. Что такое специфичность (избирательность) действия?
3. Какие виды специфичности выделяют?
4. Приведите примеры ферментов, обладающих абсолютной специфичностью.
5. Что такое термолабильность?
6. Каков температурный оптимум большинства ферментативных реакций?
7. Область применения ферменты?

7 Лабораторная работа № 6 Влияние активаторов и парализаторов на амилазу

Различные вещества могут вызывать или активирование действия фермента (активаторы) или тормозить его активность (ингибиторы). Примерами активаторов служат ионы хлора для амилазы, желчные кислоты для липазы поджелудочной железы, тогда как в качестве ингибиторов амилазы выступают ионы меди; цитохромов, ферментов, участвующих в биологическом окислении, - цианиды и т. п.

Активаторы и ингибиторы влияют на активный центр фермента, способствуют образованию его или блокированию. Они могут взаимодействовать с аллостерическим центром и тем самым менять ферментативную активность. Например, сульфат меди оказывает тормозящее действие на активность амилазы. Ингибиторами нередко

являются продукты промежуточных или конечных реакций какого-либо биохимического процесса. Некоторые природные или синтетические вещества оказывают избирательное ингибирующее действие на ферменты и используются в качестве лекарственных препаратов. В больших дозах подобные вещества могут оказаться ядами.

Обратимые ингибиторы. Различают три типа обратимого ингибирования ферментов; конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное,

Конкурентным называют ингибитор, обратимо взаимодействующий с активным центром фермента. Как правило, конкурентные ингибиторы по структуре похожи на субстрат и могут вытесняться из фермент-ингибиторного комплекса избытком субстрата. Взаимодействие с конкурентным ингибитором не приводит к денатурации или инактивации фермента, поэтому при замене ингибитора на субстрат скорость ферментативной реакции не снижается.

Неконкурентные ингибиторы взаимодействуют с ферментами не в области активного центра, а на каком-то от него удалении, причем никаким избытком субстрата из комплекса не удаляются. При взаимодействии ингибитора с ферментом происходит изменение его конформации с последующей частичной дезинтеграцией активного центра.

Бесконкурентное ингибирование имеет место, когда ингибитор взаимодействует с ферментом только в составе фермент-субстратного комплекса, препятствуя его распаду. Примером необратимого действия ингибиторов на ферменты могут служить фосфорорганические вещества, применяемые в качестве инсектицидов.

Принцип метода: метод основан на сравнении скорости гидролиза крахмала под действием амилазы слюны до и после добавления ионов хлора и меди. Продукт гидролиза крахмала обнаруживают пробой с йодом.

Ход работы: В пробирку №1 вносят 1 каплю 1% раствора хлорида натрия, в пробирку №2 – 1 каплю 1% раствора сульфата меди, а в пробирку

№3 – 1 каплю воды. Затем во все пробирки добавляют по 10 капель слюны в разведении 1:5. Перемешивают и вносят в каждую пробирку по 5 капель 1% раствора крахмала и оставляют 1-3 мин при комнатной температуре. После чего вносят во все пробирки по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия.

Результаты записывают в виде таблицы:

№ Пробы	Модификатор активности	Амилаза	Раствор крахмала	Результат (окрашивание)
1	Хлорид натрия	10 капель	5 капель	
2	Сульфат меди	10 капель	5 капель	
3	Вода	10 капель	5 капель	

Контрольные вопросы:

1. Общая характеристика регуляторов ферментов.
2. Характеристика строения и действия активаторов.
3. Химическая природа и механизм действия ингибиторов.
4. Характеристика аллостерических (ключевых) ферментов и их роли в регуляции процессов метаболизма.
5. Какие соединения в опыте были активаторами и ингибиторами. Объясните механизм их действия.

8 Лабораторная работа № 7 Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину)

Оксидоредуктазы – класс ферментов катализирующих окислительно-восстановительные реакции. Окисление мономеров, образующихся в процессе катаболизма полимеров, представляет собой сложный многоступенчатый процесс.

Окисление веществ в клетках протекает, в основном, путем отщепления водорода (дегидрированием) или отщеплением электронов или путем присоединения кислорода к молекуле окисляемого соединения.

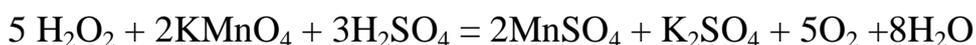
Акцепторами водорода у дегидрогеназ является НАД⁺, НАДФ, ФАД и ФМН, у некоторых флавиновых – кислород (их называют оксидазами), у гемсодержащих (пероксидаз и каталазы) – Н₂О₂ (пероксид водорода).

Акцепторами и переносчиками электронов являются цитохромы, содержащие гем (гемопротеины).

Каталаза (КФ 1.11.1.6) относится к гемопротеинам, катализирует процесс разрушения ядовитого для клеток пероксида водорода на воду и кислород: $2 \text{H}_2\text{O}_2 = 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Для живой клетки пероксид водорода является сильным ядом, поэтому все ферменты образующие и обезвреживающие Н₂О₂ находятся в пероксисомах – органеллах покрытых мембраной. Главными потребителями Н₂О₂ являются пероксидазы (КФ 1.11.1.7.), которые окисляют фенолы, амины, некоторые гетероциклические соединения и др. субстраты дегидрированием, переносят снятые с субстратов [2Н] на Н₂О₂, восстанавливая его до 2 Н₂О. Молекулы пероксида водорода, невостребованные пероксидазами, обезвреживаются каталазой.

Метод определения активности каталазы основан на определении количества пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом. Количество Н₂О₂ в реакционной смеси определяют титрованием в кислой среде раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л:



На основании приведенного уравнения реакции можно рассчитать, что 1 мл раствора с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л соответствует 1,7 мг (50 мкмоль) пероксида водорода.

Ход работы: 2-3 г сырого картофеля (или другого свежего растительного материала) тщательно растирают в ступке с кварцевым песком или стеклом. Для уменьшения кислой реакции добавляют на кончике

скальпеля CaCO_3 до прекращения выделения пузырьков CO_2 . В процессе растирания в ступку добавляют небольшими порциями 40-50 мл воды. Растиртую массу количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Смесь оставляют стоять 10-15 мин и после перемешивания фильтруют.

Берут две конические колбочки вместимостью 150-200 мл и вносят в них по 20 мл полученного фильтрата. Содержимое одной колбы кипятят в течение 1 мин и охлаждают до комнатной температуры (контроль). Другая колба опытная содержит активный фермент. К содержимому опытной и контрольной колб приливают по 20 мл воды и по 3 мл раствора с массовой долей H_2O_2 1 %. Содержимое тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. По окончании инкубации в обе колбы добавляют по 5 мл раствора с массовой долей серной кислоты 10 %, перемешивают и избыток H_2O_2 в каждой колбе оттитровывают раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л до образования розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Активность каталазы выражают в мкмоль пероксида водорода, расщепившегося под действием фермента в расчете на 1 г исследуемого материала (или на 1 мг вытяжки из него) за 1 мин. Вычисление ведут по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 20 \cdot 30},$$

где X – активность каталазы, Е/г;

$(a-b)$ – разность между объемами раствора с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л, пошедшего на титрование контрольной (a) и опытной (b) проб, мл;

T – титр примененного для титрования раствора перманганата калия;

50 – коэффициент пересчета на мкмоль H_2O_2 ;

100 – общий объем приготовленного экстракта;

m – масса взятого для анализа материала, г;

20 – объем фильтрата, взятого для анализа, мл;

30 – время инкубации, мин.

Принцип определения, порядок анализа и результат анализа записывают.

Контрольные вопросы:

1. Основные пути окисления субстратов в клетке.
2. Характеристика строения и действия НАД⁺- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ.
3. Характеристика строения и действия ФАД-зависимых дегидрогеназ.
4. Какие ферменты называют оксидазами? Их кофакторы.
5. Характеристика строения и действия пероксидаз и каталаз.
6. Характеристика строения и действия цитохромов.
7. Химизм, образование и пути обезвреживания пероксида водорода в клетках.
8. Метод определения активности каталазы.

9 Лабораторная работа № 8 Определение спонтанного и индуцированного гемолиза

Определить целостность эритроцитарной мембраны по выходу гемоглобина в среду инкубации. Устойчивость мембраны может оцениваться по спонтанному гемолизу, а также при действии разнообразных факторов физической (температура, встряхивание, излучение) и химической (кислоты, щелочи, соли и др.) природы. Эритроцит обладает развитым мембранным комплексом и совершенным рецепторным аппаратом. Мембрана служит барьером проницаемости с повышенной степенью избирательности,

обеспечивая таким образом поддержание клеточного гомеостаза в условиях больших различий химического состава цитоплазмы клеток и среды. Перенос веществ через мембрану совершается в зависимости от их химических свойств различными способами: диффузией, путем проникновения через липидные участки, либо взаимодействуя с встроенными в мембрану белками-переносчиками.

Мембрана эритроцитов отражает особенности биохимического строения мембран различных тканей, а именно представляет пластичную молекулярную мозаику, состоящую из белков, липо- и гликопротеинов и, возможно, чисто липидных участков.

Реактивы. Фосфатный буфер, 1М раствор с рН 7,4^{*}; хлорид натрия, 170 г/л раствор; рабочий свежеприготовленный раствор хлорида натрия, объем смеси доводят до 1 л и перед употреблением насыщают кислородом воздуха путем встряхивания; фосфатный буфер, 0,17 М раствор с рН 7,4^x; раствор гидрохлорида натрия, приготовленный на фосфатном буфере (0,17 М фосфатный буфер и 1 %-ный раствор NaCl в соотношении 1:3 по объему); изотонический спиртовой раствор эргокальциферола Д₂(продажный препарат 0,5 %-ного спиртового раствора эргокальциферола разбавляют в 50 раз раствором гидрохлорида натрия на фосфатном буфере); аммиачный раствор (растворяют 1 мл концентрированного раствора аммиака в колбе вместимостью 250 мл); ацетат α -токоферола, 5 %-ный масляный раствор.

Оборудование. Штатив с пробирками; пипетки вместимостью 0,1; 5 и 10 мл; стеклянные палочки; центрифуга с центрифужными весами; термостат, отрегулированный на 38°C; ФЭК или спектрофотометр.

Материал. Кровь, взятая из пальца.

Опыт №1. Определение спонтанного гемолиза по Ягеру

Метод основан на определении при 540 нм экстинкции внеэритроцитарного гемоглобина, поступающего в среду вследствие спонтанного лизиса мембран эритроцитов, вызванного пероксидным окислением липидов кислородом воздуха.

Ход определения. В пробирку с 7,5 мл рабочего раствора хлорида натрия добавляют 0,1 мл крови. Готовят суспензию эритроцитов, втягивая и выдувая жидкость с помощью пипетки.

Центрифугируют взвесь 10 мин при 1000 об/мин, надосадочную жидкость осторожно отсасывают. К осадку эритроцитов добавляют 7,5 мл рабочего раствора хлорида натрия и вновь суспензируют тем же способом.

В три центрифужные пробирки наливают по 1 мл приготовленной суспензии: в первые две пробирки прибавляют по 4 мл рабочего раствора хлорида натрия; а в третью – 4 мл дистиллированной воды (для полного гемолиза). Пробы перемешивают стеклянной палочкой и ставят на 2 ч в термостат при 38 °С.

По окончании инкубации содержимое пробирок перемешивают, центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин и измеряют экстинкцию всех проб против дистиллированной воды на ФЭКе или спектрофотометре при 540 нм (светофильтр зеленый) в кювете с толщиной слоя 1 см.

Расчет проводят по формуле

$$x = \frac{(E_1 + E_2)100}{2E_3},$$

где x – степень гемолиза, %;

E_1 и E_2 – экстинкции первой и второй проб;

E_3 – экстинкция третьей пробы.

Опыт №2 Исследование гемолитического действия витамина D_2 (эргокальциферола) по В.Б.Спиричеву и Н.В.Блажеевич

Метод основан на определении при 540 нм экстинкции внеэритроцитарного гемоглобина, выход которого усиливается с помощью витамина D_2 , запускающего пероксидное окисление липидов в мембранах эритроцитов. α -токоферол как антиоксидант уменьшает гемолитическую активность эргокальциферола.

Ход определения. В три пробирки вносят по 0,1 мл крови. В одну предварительно наливают 4 мл изотонического раствора эргокальциферола (прооксидант), а в другую – тот же объем раствора эргокальциферола и 1 каплю раствора ацетата α -токоферола (антиоксидант), в третью – 4 мл раствора хлорида натрия на фосфатном буфере (контроль).

Суспензируют эритроциты во всех пробах, втягивая и выдувая жидкость с помощью пипетки, и оставляют стоять при 20-22°C. Через 30 мин пробы центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин, отбирают 0,1 мл надосадочной жидкости в три чистые пробирки и прибавляют в них по 5 мл аммиачного раствора.

Осадок эритроцитов в центрифужных пробирках вновь суспензируют, втягивая и выдувая жидкость пипеткой, и оставляют их стоять при 20-22°C еще на 30 мин. По истечении этого времени пробы вновь центрифугируют в том же режиме, отбирают по 0,1 мл надосадочной жидкости в три чистые пробирки и приливают в них по 5 мл аммиачного раствора.

После добавления аммиачного раствора все шесть пробирок закрывают кусочком фольги и энергично встряхивают содержимое 2 мин. Затем измеряют экстинкцию в пробах против контроля на ФЭЖе или на спектрофотометре при 540 нм (светофильтр зеленый) в кювете с толщиной слоя 1 см.

Расчет проводят по формуле:

$$x = \frac{E_3 100}{E_1} \quad \text{и} \quad A = \frac{E_2 100}{E_1},$$

где x – степень гемолиза при добавлении эргокальциферола, %;

E_1 – экстинкция пробы с эргокальциферолом;

E_3 – экстинкция контрольной пробы;

A – степень гемолиза после совместного добавления эргокальциферола и α -токоферола, %

E_2 – экстинкция пробы с эргокальциферолом и α -токоферолом.

Торможение антиоксидантом пероксидного окисления (в %) рассчитывают по формуле:

$$\frac{A100}{x}$$

Оформление работы. Провести необходимые расчеты и сделать вывод о причинах спонтанного гемолиза, а также о действии изучаемых прооксидантов и антиоксидантов.

Практическое значение работы. По степени гемолиза эритроцитов можно судить о состоянии антиокислительных систем клетки, в частности, об обеспеченности организма витамином Е. При нормальной обеспеченности спонтанный гемолиз, как правило, составляет 2-10%. Недостаток витамина Е резко повышает этот показатель. Имеется соответствие между спонтанным или индуцированным гемолизом и содержанием токоферолов в сыворотке крови. Способность витамина D₂ ускорять пероксидное окисление липидов в мембранах эритроцитов и других клеток свидетельствует о его прооксидантных свойствах.

Контрольные вопросы:

1. Понятие гемолиза.
2. Укажите стадии протекания гемолиза.
3. Определение спонтанного и индуцированного гемолиза.
4. Где происходит разрушение эритроцитов?
5. Что влияет на разрушение эритроцитов?
6. Биологическая роль витамина D₂ в организме человека?
7. Почему происходит спонтанный гемолиз?
8. Какую роль играет эритроцитарная мембрана при гемолизе эритроцитов?

10 Лабораторная работа № 9 Определение деформируемости эритроцитов

Принцип метода: Под деформируемостью эритроцитов понимают одно из важнейших свойств клеток видоизменять свою форму в процессе циркуляции в ответ на воздействия внешних сил на клеточную мембрану. Степень деформируемости зависит от состояния внутренней среды эритроцита и окружающей его среды. Внутренняя среда эритроцита определяется внутриклеточной вязкостью, вязкоэластическими свойствами мембраны и отношением площади поверхности эритроцитов к их объему. Изменения отношения «площадь - объем» и индекса сферичности оказывает влияние на способность эритроцитов к деформируемости. Для исследования последней используют метод, основанный на изменении времени растекания буферного раствора и эритроцитарной массы по поверхности бумажного фильтра.

Реактивы, исследуемый материал: альбумин, 0.7% раствор на фосфатном буфере, рН7.4; NaCl 0.85%; приготовленное из цитратной крови взвесь эритроцитов отмытых трижды охлажденных физиологическим раствором NaCl до величины гематокрита 60%; обездоленные фильтры (типа «Красная лента» или filtrak 338).

Ход работы: Фильтр закрепляют в горизонтальной рамке. Вертикально расположенной пипеткой на него наносят 0.2 мл буфера с 0.7 раствором альбумина и одновременно включают секундомер. Определяют время T₁, необходимое для полного растекания капли. Через 1 мин. На этот же фильтр в цент влажного пятна вносят 0,02 мл эритроцитарной массы. Массы , предварительно разведенный в физиологическом растворе NaCl до величины гематокрита 60% . Измеряют время растекания эритроцитарной суспензии T₂. Насчитывают индекс деформируемости (ИД) по формуле:

$$\text{ИД} = T_1 / T_2,$$

где, T₁ - время, необходимое для полного растекания капли;

T_2 - время T_1 , необходимое для полного растекания капли.

Чем больше ИД, тем больше деформируем эритроцит.

Примечание. Для ускорения исследования из реагентов можно убрать раствор альбумина.

Контрольные вопросы:

1. Что представляет собой мембрана эритроцита?
2. От чего зависит степень деформируемости?
3. Опишите форму эритроцита и его ядра.
4. На что указывает повышение эритроцитов в мазке на цитологию?
5. В чем причина незначительного превышения лимфоцитов и белка крови?
6. Что оказывает влияние на деформируемость эритроцитов?
7. Чем определяется внутренняя среда эритроцита?

Список использованных источников

1 Методические основы экспериментальной работы в биохимической лаборатории: учеб.-метод. пособие / Г.П. Диже, Н.Д. Ещенко, И.Е. Красовская, Т.В. Гришина. – СПб., СПбГУ, 2008. – 102 с.

2 Практикум по общей биохимии: учеб. пособие / Е.В. Романовская, Т.В. Гришина, И.Е. Красовская [и др.]; Под ред. Е.В. Романовской, Н.Д. Ещенко. – СПб.: СПбГУ, 2010. – 194 с.

3 Биохимия крови : лабораторный практикум: учебное пособие для студентов, обучающихся по программам высшего профессионального образования по направлению подготовки 020400 Биология / Е. С. Барышева, К. М. Бурова; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т".

4 Биохимия: метод. указания к лаб. работам / А. Д. Стрекаловская - М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. агентство по образованию, Гос. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т", - Оренбург : ГОУ ОГУ, 2007. - 24 с.

5 Практические основы биохимии: учеб. пособие / Е. С. Барышева, О. В. Баранова, Т. В. Гамбург; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования - Оренбург : ОГУ, 2011. - 217 с.

6 Биохимия: метод. указания к лаб. практикуму / Е. Г. Владимирова, Г. И. Ушакова, О. П. Кушнарёва; М-во образования Рос. Федерации, Гос. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т", Каф. химии. - Оренбург : ГОУ ОГУ, 2004. - 60 с.