

Министерство образования и науки Российской Федерации

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

Кафедра биохимии и микробиологии

Е.В. Бибарцева

**ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ К ДИСЦИПЛИНЕ
«БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИНФЕКЦИОННЫХ И
НЕИНФЕКЦИОННЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ»**

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 06.03.01 Биология

Оренбург

2018

УДК 577.1:616(076.5)

ББК 28.072я7+51.9я7

Б 59

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

Б 59 **Бибарцева, Е.В.**

Лабораторные работы к дисциплине «Биохимические основы инфекционных и неинфекционных патологических процессов»: методические указания/ Е.В. Бибарцева; Оренбургский гос.ун-т. – Оренбург: ОГУ, 2018. – 31с.

Данные методические указания содержат лабораторные работы по дисциплине «Биохимические основы инфекционных и неинфекционных патологических процессов» блока 1, дисциплины по выбору по образовательным программам высшего образования по направлению подготовки 06.03.01 Биология, профиль «Биохимия», в соответствии с требованиями рабочей программы.

УДК 577.1:616(076.5)

ББК 28.072я7+51.9я7

© Бибарцева Е.В, 2018

© ОГУ, 2018

Содержание

1 Лабораторная работа № 1 Количественное определение активности амилазы (по Вольгемуту). Специфичность действия амилазы слюны	4
2 Лабораторная работа № 2 Определение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ)	7
3 Лабораторная работа №3 Влияние температуры на активность α -амилазы слюны. Определение оптимума рН для действия α -амилазы слюны	12
4 Лабораторная работа №4 Обнаружение каталазы крови. Открытие пероксидазы	16
5 Лабораторная работа № 5. Получение тирозиназы и окисления тирозина в присутствии кислорода.....	18
6 Лабораторная работа № 6 Эмульгирование триацилглицеридов желчными кислотами.....	20
7 Лабораторная работа № 7 Качественная реакция Паттенкоффера на желчные кислоты.....	22
8 Лабораторная работа № 8 Определения содержания В-липопротеинов (липопротеинов низкой плотности) в плазме крови	23
9 Лабораторная работа № 9 Определение патологических компонентов в моче.....	26
Список использованных источников	31

1 Лабораторная работа № 1 Количественное определение активности амилазы (по Вольгемуту). Специфичность действия амилазы слюны

Амилаза - фермент, осуществляющий гидролитическое расщепление полисахаридов до декстринов и мальтозы. Конечные продукты действия амилазы не дают цветной реакции с йодом. Наиболее богаты амилазой слюнные и поджелудочная железы.

Амилазная активность крови по Вольгемуту в норме составляет 25-125 Ед/л. При остром панкреатите в первые сутки заболевания активность амилазы крови возрастает в десятки раз, а затем постепенно возвращается к норме. Амилаза имеет небольшую молекулярную массу – 45 000, поэтому легко проходит почечный фильтр и попадает в мочу. В связи с меньшей инвазивностью определение амилазной активности мочи (диастазный тест) широко используется в клинике для диагностики состояния поджелудочной железы. Одно из важнейших свойств ферментов специфичность действия. Каждый фермент воздействует лишь на определенное вещество или группу веществ, близких по своей структуре. Различают следующие виды специфичности: а) абсолютную, когда ферменты катализируют лишь одну реакцию превращения какого-либо вещества. Например, уреазы (карбамид — амидогидролаза) катализируют только реакцию гидролитического расщепления мочевины до аммиака и двуокиси углерода; б) групповую, когда ферментом катализируются реакции превращения близких по своей структуре веществ, построенных по одному типу; в) стереохимическую, которая проявляется в том, что фермент катализирует реакцию расщепления или синтеза только одного из стереоизомеров, не воздействуя на другой. Окисление молочной кислоты до пировиноградной катализируется ферментом лактатдегидрогеназой, тогда как тот же процесс у молочной кислоты катализируется другим ферментом - лактатдегидрогеназой.

Цель работы:

1. Количественное определение активности амилазы слюны
2. Определить специфичность действия ферментов амилазы.

Опыт № 1 Определение активности амилазы в слюне по Вольгемуту

Принцип метода: Метод основан на том, что слюну разводят в определенной последовательности, после чего приливают одно и то же количество раствора крахмала и находят наименьшее содержание фермента, которое полностью расщепляет все количество добавленного крахмала. Затем производят перерасчет активности фермента на 1 мл слюны.

Амилазная активность слюны или амилокластическая сила слюны выражается количеством 0,1% раствора крахмала в мл, которое может расщепляться 1 мл слюны при температуре 380 в течении 30 мин.

В норме амилазная активность слюны составляет 160-320 ед.

Ход работы: В 10 пронумерованных пробирок наливают по 1 мл воды. Затем в первую пробирку добавляют 1 мл слюны, разведенной в 10 раз. Содержимое первой пробирки перемешивают и 1 мл раствора (суммарное разведение в 20 раз) переносят из 1-й пробирки во вторую, перемешивают (слюна разведена в 40 раз). Затем 1 мл разведенной слюны из второй переносят в третью и т.д. - из предыдущей пробирки в следующую. Из 10 пробирки 1 мл смеси выливают. Таким образом, получается ряд разведенной слюны, в котором в каждой последующей пробирки содержание фермента вдвое меньше, чем в предыдущей.

Во все пробирки добавляют по 1 мл воды и по 2 мл 0,1 % раствора крахмала, перемешивают и помещают пробирки в термостат на 30 мин при температуре 380.

Через 30 минут пробирки вынимают, охлаждают, добавляют по 1-2 капли 1 % раствора йода и перемешивают. Жидкость в пробирках в зависимости от степени расщепления крахмала может окрашиваться в желтый, розовый, красный и фиолетовый цвет. Раствор желтого цвета свидетельствует о полном

расщеплении крахмала, фиолетовый – о том, что крахмал в растворе еще сохранился.

Работу необходимо оформить в виде таблицы.

Разведение слюны	№ пробирки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10248
Кол-во 0,1%крахмала										
Окрашивание йодом										
Амилокластическая активность слюны										

Расчет: Берется количество слюны в последней пробирке с желтой окраской. Если это четвертая пробирка, то разведение слюны в ней – 160 раз. Составляется пропорция: 1). 160 мл слюны расщепляет 2 мл 0,1 % р-ра крахмала; 2) 1 мл слюны расщепляет X мл 0,1 % р-ра крахмала, т.е. амилокластическая активность слюны составляет 320 ед.

Опыт № 2 Специфичность действия амилазы слюны

Приборы и материалы: раствор амилазы (слюна), раствор крахмала 1%, раствор йода (раствор Люголя), раствор хлорида натрия, раствор сульфата меди.

Ход работы: В три пробирки отмеряют: в 1 – 2,0 мл дистиллированной воды; во 2 – 1,6 мл дистиллированной воды + 0,4 мл 1 % раствора хлорида натрия; в 3 – 1,6 мл дистиллированной воды + 0,4 мл 1 % раствора сульфата меди.

В каждую пробирку добавляют по 0,5 мл разведенной слюны, содержимое пробирок перемешивают и добавляют по 1,0 мл 1 % раствора крахмала. Перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре.

Через 5 мин в три пробирки с водой (по 1 мл в каждой), подкрашенной каплей раствора йода, отмеряют по 2-3 капли содержимого каждой опытной пробирки. Наблюдают появление окрашивания. Через 10-15 минут проводят

цветную реакцию с йодом с содержимым каждой из опытных пробирок. Для этого из трех опытных пробирок отмеряют по 2-3 капли содержимого и переносят их в три пробирки с водой (по 1 мл в каждой), подкрашенной каплей раствора йода. Результаты заносят в таблицу.

Фермент	Субстрат	Время действия фермента, мин	Окраска жидкости после добавления йода в присутствии:		
			Воды	Хлорида натрия	Сульфата меди
Амилаза	Крахмал				
Амилаза	Крахмал				
Амилаза	Крахмал				

Контрольные вопросы:

1. Каков механизм действия ферментов?
2. Что такое активный центр фермента?
3. В каком случае говорят об абсолютной, а в каком – об относительной специфичности действия ферментов?
4. На чем основано влияние активаторов и ингибиторов на скорость ферментативного катализа?
5. От каких факторов зависит скорость ферментативного катализа?
6. Из каких основных частей состоит сложный фермент?
7. Какое значение рН оптимально для действия амилазы?

2 Лабораторная работа № 2 Определение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ)

Среди многочисленных показателей липидного обмена процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) играют важную роль не только в физиолого-биохимическом гомеостазе нормальной клетки, но и выступают как универсальное неспецифическое звено механизма развития различных

патологических состояний организма. ПОЛ — нормальный метаболический процесс, представленный во всех органах и тканях организма.

Через стадию перекисных производных происходит биосинтез многих БАВ (простагландинов, гормонов и др.), а также регуляция активности ферментов. Равновесие свободнорадикальных процессов — основа нормального функционирования организма. Нарушение равновесия в сторону избыточного образования свободных радикалов связывают с ускоренным старением клеток, воспалительными процессами, стрессами, а пониженный уровень продуктов ПОЛ — с возможностью деструктивных перерождений клеток. ПОЛ представляет собой процесс непосредственного переноса кислорода на субстрат с образованием пероксидов, кетонов, альдегидов и других соединений.

Опыт № 1 Определение концентрации малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах

Принцип метода: При взаимодействии МДА с двумя молекулами тиобарбитуровой кислоты (ТБК) при температуре 90-100°C, образуется окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при 532 нм (зеленый светофильтр).

Реактивы:

1. Раствор гемолитика: 0,15 М калия хлорид в 1 мМ ЭДТА, pH=7,4
2. Трихлоруксусная кислота (ТХУ): 30% раствор
3. Тиобарбитуровая кислота (ТБК): 0,75% раствор
4. Натрия хлорид: 0,85% раствор
5. Антикоагулянт (цитрат натрия: 3,8% раствор)

6. Взвесь отмытых эритроцитов: цельную кровь собирают в центрифужную пробирку, куда предварительно вносят 1-1,5 мл антикоагулянта и центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а эритроциты дважды отмывают тройным объемом 0,85% раствора натрия хлорида, каждый раз центрифугируя при указанных выше условиях и сливая надосадочную жидкость.

Ход работы: В центрифужную пробирку вносят 0,1 мл взвеси эритроцитов, 1,9 мл раствора гемолитика и тщательно перемешивают; затем приливают 2 мл 30% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и 2 мл 0,75% ТБК, вновь перемешивают. Пробирку помещают на кипящую водяную баню (15 мин). После охлаждения до комнатной температуры центрифугируют (10 мин, 3000 об/мин.). Центрифугат колориметрируют в кювете с рабочей длиной 10 мм при зеленом светофильтре (530-540 нм) против контроля.

Расчет концентрации МДА (С) проводят по формуле:

$$C = D \cdot 50 / 1,56 \text{ нМоль/мл эритроцитов,}$$

где D – оптическая плотность,

50 – разведение,

1,56 – молярный коэффициент экстинкции МДА.

Опыт № 2 Определение содержания диеновых и триеновых конъюгатов, оснований Шиффа

Принцип метода: Метод основан на установлении содержания продуктов ПОЛ в крови по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра. Количество диеновых 12 конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и оснований Шиффа (ОШ) экстрагируются в гептанизпропанольных фракциях. Так как в гептане экстрагируются в основном нейтральные липиды, а в изопропанол – фосфолипиды, т.о. гептановая фракция свидетельствует об активности ПОЛ в нейтральных липидах, а изопропанольная – в фосфолипидах.

Реактивы: н-Гептан, Изопропанол, 0,01 N водный раствор соляной кислоты, Хлорид натрия прокаленный.

Ход работы: К 0,1 мл плазмы крови добавляют 8 мл гептан-изопропанольной смеси в соотношении 1:1, встряхивают в течение 15 мин и центрифугируют при 6000 об/мин в течение 10 минут. Далее липидный экстракт переносят в чистую пробирку и добавляют 5 мл гептан-изопропанольной смеси в соотношении 3:7, после чего в пробирку добавляют 2 мл 0,01 N водного раствора соляной кислоты для разведения фаз и удаления

нелипидных примесей. После разделения фаз (верхнюю) гептановую переносят в чистую пробирку, а к нижней добавляют 1г прокаленного хлорида натрия для обезвоживания изопропанольного экстракта, который переносят в чистую пробирку.

Замер оптических плотностей (E) производят на спектрофотометре. Каждая фаза оценивается против соответствующего контроля при длинах волн 220 нм (поглощение изолированных двойных связей), 232 нм (поглощение ДК), 278 нм (поглощение ТК) и 400 нм (поглощение ОШ). Содержание ДК, ТК и ОШ оценивают по относительным величинам E232/E220, E278/E220, E400/E220 и выражают в относительных единицах.

Опыт № 3 Определение концентрации глутатиона

Принцип метода: Об уровне свободных SH-групп глутатиона (G-SH) судят по количеству пошедшего на титрование раствора йодноватистокислого калия. Окисленный глутатион переводят в восстановленную форму с помощью цинковой пыли и вновь оттитровывают SH-группы; получают общий глутатион (G-SH + G-S-S-G). Окисленный глутатион определяют по разнице (общий глутатион - G-SH).

- Реактивы:
1. Сульфосалициловая кислота (ССК): 25% раствор
 2. Сульфосалициловая кислота (ССК): 22% раствор
 3. Сульфосалициловая кислота (ССК): 4% раствор
 4. Йодистый калий: 5% раствор
 5. Цинковая пыль
 6. Крахмал: 1% раствор (готовится в день определения) 13
 7. Основной раствор - 0,005N раствор йодноватистокислого калия (KJO3): 0,1783 г в 1 л воды
 8. Рабочий раствор для титрования - 0,001N раствор KJO3: в мерную колбу на 250 мл вносят 50 мл основного раствора и 22,8 мл 22% раствора сульфосалициловой кислоты, перемешивают и доводят дистиллированной водой до метки.

Ход работы: В колбу емкостью 50 мл наливают 24 мл воды, вносят 3 мл цельной крови. Через 5 мин осаждают белки: по каплям при постоянном взбалтывании приливают 3 мл 25% раствора сульфосалициловой кислоты (ССК), оставляют при комнатной температуре на 10 мин, после чего фильтруют через беззольный фильтр в сухую колбу. Фильтрат делят на две части:

а) определение восстановленного глутатиона: 10 мл фильтрата переносят в сухую колбу (колба № 1);

б) определение общего глутатиона: в оставшийся фильтрат вносят небольшое количество цинковой пыли и оставляют на 30 мин, взбалтывая время от времени. Затем жидкость фильтруют через беззольный фильтр и 10 мл фильтрата переносят в сухую колбу (колба №2).

В обе колбы (№ 1, № 2) приливают по 2,5 мл 4 % раствора ССК, по 2,5 мл 5 % раствора йодистого калия, по 2-3 капли 1 % раствора крахмала и титруют 0,001N раствором йодноватистого калия до появления слабо-голубого окрашивания.

Концентрацию глутатиона (А) в колбах № 1 и № 2 определяют по формуле:

$$A=I \cdot 100 / 3,26 \text{ мг\%},$$

где I - количество 0,001N раствора йодноватистого калия (мл), израсходованного на титрование пробы,

3,26 – число, соответствующее объему йодноватистого калия (мл), идущего на титрование 1 мг глутатиона,

100 – коэффициент пересчета на 100 мл крови. Окисленный глутатион определяют по разнице между общим и восстановленным.

Контрольные вопросы:

1. Какими АФК запускается процесс ПОЛ?
2. Из каких стадий состоит процесс ПОЛ?
3. Каким образом происходит разветвление ПОЛ?
4. Как обрывается процесс перекисного окисления липидов?
5. Почему повышается текучесть мембран при ПОЛ?

6. Какие продукты ПОЛ обладают прооксидантным действием?
7. Механизм действия малонового диальдегида на белки и нуклеиновые кислоты.
8. Перечислите методы определения содержания продуктов ПОЛ

3 Лабораторная работа № 3 Влияние температуры на активность α -амилазы слюны. Определение оптимума рН для действия α -амилазы слюны

Активность ферментов зависит от температуры. Та температура, при которой активность фермента наибольшая, называется температурным оптимумом ($opt-t^{\circ}$). Для организма человека $opt-t^{\circ}$ находится в пределах 37-40 $^{\circ}C$. Снижение t° приводит к уменьшению активности ферментов, и при очень низких температурах (от 0 $^{\circ}C$ до +4 $^{\circ}C$) ферментативная активность практически прекращается, т.к. резко изменяются кинетические свойства ферментов. Поэтому снижение активности ферментов имеет обратимый характер: при повышении температуры ферментативная активность полностью восстанавливается.

Повышение t выше $opt-t^{\circ}$ приводит к постепенному снижению активности и при достижении определенной t для каждого фермента – к полной инактивации фермента, которая является необратимой. При $t = 60^{\circ}C$, (для некоторых от 70 $^{\circ}C$ до 100 $^{\circ}C$) происходит денатурация белка-фермента, разрушение активного центра фермента, образование E-S-комплекса становится невозможным, и ферментативная реакция прекращается.

Существует три типа амилаз, обозначаемых альфа, бета и гамма.

α -Амилаза (1,4- α -D-глюкан-глюканогидролаза) является кальций-зависимым ферментом. К этому типу относятся амилаза слюнных желез и амилаза поджелудочной железы. Она способна гидролизовать полисахаридную

цепь крахмала и других длинноцепочечных углеводов в любом месте. Таким образом, процесс гидролиза ускоряется и приводит к образованию олигосахаридов различной длины.

β -Амилаза (1,4- α -D-глюкан-мальтогидролаза) присутствует у бактерий, грибов и растений, но отсутствует у животных. Она отщепляет вторую с конца α -1,4-гликозидную связь, образуя, таким образом, дисахарид мальтозу. При созревании фруктов β -амилаза расщепляет плодовой крахмал на сахара, что приводит к сладкому вкусу зрелых плодов.

γ -Амилаза (1,4- α -D-гликан-глюкогидролаза) отщепляет последнюю α -1,4-гликозидную связь, приводя к образованию глюкозы. Кроме этого, γ -амилаза способна гидролизовать α -1,6-гликозидную связь. В отличие от других амилаз γ -амилаза наиболее активна в кислых условиях при pH= 3.

На активность амилазы влияют: pH среды, температура, введение активаторов и ингибиторов.

Скорость ферментативных реакций в очень большой степени зависит от концентрации водородных ионов в среде. Концентрация H^+ ионов, при которой наблюдается максимальная скорость реакции, называется оптимальной. Изменение кислотности среды в ту или другую сторону от оптимума pH вызывает понижение активности фермента.

Влияние значения pH на активность фермента связано в первую очередь с ионизацией функциональных групп фермента, входящих в состав активного центра фермента.

Оптимум pH действия амилазы слюны определяют при взаимодействии ее с крахмалом при различных значениях pH среды. О степени расщепления крахмала судят по окраске продуктов реакции с раствором йода.

При оптимальном значении pH расщепление крахмала произойдет полностью (отсутствие окраски с йодом); по мере удаления от этой точки в кислую или щелочную зону расщепление крахмала произойдет только частично, до стадии декстринов (красно-бурая или фиолетовая окраска), или крахмал вообще не будет расщепляться (синяя окраска с йодом).

Опыт № 1 Влияние температуры на активность фермента α -амилазы слюны

Ход работы: В 4 пробирки отмерить по 4 мл 0,5 % раствора крахмала и по 1 мл слюны, разведенной в 10 раз. Пробирку 1 поместить в кипящую баню, 2 пробирку в ледяную баню, пробирку 3 –в термостат при температуре 38°C, пробирку 4 оставить при комнатной температуре. Через 10 минут содержимое каждой пробирки разделить на 2 части и провести пробу Фелинга, а с другой частью –пробу Люголя.

Реакция Люголя. Реакция обнаруживает крахмал. К содержимому пробирки добавить 1 каплю раствора Люголя. Появление синего окрашивания свидетельствует о наличии крахмала.

Реакция Фелинга. К содержимому пробирки добавить примерно половину объема реактива Фелинга. Верхний слой жидкости нагреть на пламени спиртовки. Появление желтого окрашивания, переходящего в кирпично-красное, указывает на наличие редуцирующих углеводов.

Результат оформляют в виде таблицы, объясняют причины разной активности α -амилазы в зависимости от температуры.

№ проб	Температура °С	Реакция с реактивом Люголя	Проба Фелинга	Выводы
1				
2				
3				
4				

Опыт № 2 Влияние значения реакции среды на активность фермента амилазы

Реактивы: Раствор амилазы (слюна), раствор крахмала 1%, раствор йода (раствор Люголя), фосфатная буферная смесь (рН от 5,4 до 8,0)

Ход работы: В восемь пронумерованных пробирок приливают по 2 мл фосфатной буферной смеси с различным значением рН от 5,4 до 8,0. Жидкость в каждой пробирке перемешивают и в каждую добавляют по 1 мл 1 % раствора

крахмала и по 0,5 мл раствора слюны. Пробирки оставляют стоять на столе на 10 мин. После этого из каждой пробирки 1 каплю смешивают с 1 каплей йода на предметном стекле и сравнивают между собой окраски из каждой пробирки. Когда содержимое пятой пробирки будет давать с йодом красно-бурую окраску, через 1-2 мин во все пробирки добавляют по 2-3 капли раствора йода, начиная с первой, и содержимое хорошо взбалтывают. Сравнивают между собой окраску всех пробирок и по полученной окраске судят о степени расщепления крахмала, а, следовательно, об активности фермента в зависимости от значения рН среды.

Результаты опыта и выводы записывают в таблицу.

Значение рН пробы	5,4	5,8	6,2	6,6	6,8	7,0	7,4	8,0
Окраска йодом								

Контрольные вопросы:

1. Что такое ферменты?
2. Каковы их химическая природа и свойства?
3. Зависимость активности ферментов от реакции среды и температуры: биологическое и медицинское значение этих свойств ферментов.
4. Какие качественные и количественные методы используют для изучения действия ферментов?
5. Понятие об активном центре ферментов.
6. Механизм действия ферментов.
7. Специфичность действия ферментов, связь со строением активного центра.

4 Лабораторная работа № 4 Обнаружение каталазы крови.

Открытие пероксидазы

Каталаза - гемосодержащий фермент, осуществляющий защитную функцию в отношении перекиси водорода. Разложение перекиси водорода каталазой на молекулярный кислород и воду осуществляется в два этапа. При этом в окисленном состоянии каталаза работает и как пероксидаза, катализируя окисление спиртов или альдегидов. Кроме того, каталаза может выступать источником образования активных форм кислорода. Около 5 % кислорода, образующегося в результате разложения, H_2O_2 возникает в возбужденном синглетном состоянии. По химической природе каталаза является геминферментом. Каталаза катализирует разложение перекиси водорода на молекулярный кислород и воду: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2\uparrow + 2\text{H}_2\text{O}$

Биологическая роль каталазы заключается в обезвреживании перекиси водорода, образующейся в организме во время течения окислительно-восстановительных процессов.

Максимальное содержание каталазы обнаружено в эритроцитах, значительное количество в печени и почках. Обладает специфической антиоксидантной защитой в отношении эндотелиальных клеток.

Норма:

- a) эритроциты: 31 - 34,1 нМ H_2O_2 / мг гемоглобина
- b) плазма: 14,8 - 16,5 нМ H_2O_2 / мг гемоглобина

Как и каталаза, пероксидаза – геминсодержащий фермент. Пероксидаза катализирует окисление некоторых веществ (фенолы, полифенолы, ароматические амины) в присутствии перекиси водорода. От субстратов под действием пероксидазы переносятся электроны на перекись водорода. Образуется окисленный субстрат и вода. В организме млекопитающих слабой пероксидазной активностью обладают гемоглобин, миоглобин и цитохромы. Пероксидаза содержится почти во всех растительных клетках.

Опыт № 1 Обнаружение каталазы крови

Принцип метода: Об активности каталазы крови судят по бурному выделению пузырьков кислорода при добавлении перекиси водорода к капле крови.

Реактивы: 1) кровь; 2) H_2O_2 , 1 % раствор; 3) штатив с пробирками; 4) капельницы.

Ход работы: В пробирку наливают 10-15 капель 1 % раствора H_2O_2 и добавляют каплю крови. Жидкость вспенивается, так как происходит бурное выделение пузырьков кислорода.

Результат занести в таблицу.

№	Фермент	Субстрат	Реакция, катализируемая ферментом	Выявление действия фермента

Опыт № 2 Открытие пероксидазы

Принцип метода: От бензидина под действием пероксидазы переносятся электроны и протоны на перекись водорода. В результате образуется окисленный бензидин и вода. Окисленный бензидин приобретает зеленую, синюю, постепенно переходящую в бурую окраску.

Исследуемый материал и реактивы: 1. Кровь. 2. Спирт. 3. Вата. 4. Скарификатор. 5. Раствор бензидина в ледяной уксусной кислоте (1%). 6. Перекись водорода (3%). 7. Вода.

Ход работы: В две пробирки наливают по 5 капель 1% раствора бензидина в ледяной уксусной кислоте и по 5 капель 3% раствора перекиси водорода. В первую пробирку добавляют 5 капель крови, во вторую – 5 капель воды. Наблюдают за изменением окраски.

Указания к оформлению лабораторной работы: В тетради для лабораторных работ запишите принцип метода, ход работы, зарисуйте полученные результаты (окраска проб) и сделайте выводы.

Контрольные вопросы:

1. Понятие каталазы и пероксидазы.
2. Какое значение для организма имеет фермент пероксидаза?
3. Какие соединения в организме обладают пероксидазной активностью?
4. Какова биологическая роль фермента каталазы?
5. Что является простетической группой фермента каталазы?
6. Где в организме содержится каталаза?

5 Лабораторная работа № 5 Получение тирозиназы и окисления тирозина в присутствии кислорода

Тирозиназа относится к группе оксидаз и катализирует окисление одноатомных и многоатомных фенолов (*орто*-дифенолы) и родственных им соединений (групповая специфичность) кислородом воздуха. По химической природе тирозиназа является металлопротеидом, содержащим медь в количестве 0,20-0,25%. Медь является необходимым компонентом активного центра фермента и действует как переносчик электронов в процессе окисления и восстановления. Тирозиназа находится в отдельных тканях и органах и широко распространена в растениях и грибах.

В организме животных и человека тирозиназа катализирует превращение адреналина в физиологически неактивный пигмент адренохром. Последний, конденсируясь, превращается в бурый пигмент меланин. Бронзовый цвет кожи при заболевании надпочечников (аддисонова болезнь) обусловлен образованием избыточного количества меланина.

Опыт № 1 Окисление тирозина молекулярным кислородом в присутствии тирозиназы (катехолоксидазы)

Реактивы: насыщенный раствор тирозина

Ход работы. Мелкоизмельченный картофель в количестве 0,5-1 г растирают в фарфоровой ступке с 3 мл дистиллированной воды и фильтруют через два слоя марли. Фильтрат содержит фермент тирозиназу.

В две пробирки наливают по 1 мл вытяжки из картофеля, содержащей фермент тирозиназу. Содержимое одной пробирки кипятят 1-2 минуты и охлаждают в стакане с холодной водой. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл насыщенного раствора тирозина, перемешивают и помещают в водяную баню при температуре от 40 °С до 45 °С. Каждые 5 минут пробирки вынимают и содержимое их сильно встряхивают для лучшего соприкосновения жидкости в пробирках с воздухом. Жидкость в пробирке с активным ферментом постепенно принимает сначала розовую, красную, а через 1-2 часа – бурую и черную окраску. В контрольной пробе с прокипяченной вытяжкой цвет жидкости не изменяется.

Реакция обусловлена окислением тирозина кислородом воздуха и протекает благодаря каталитическому действию тирозиназы. В процессе окисления из тирозина образуется красный пигмент галахром, который затем превращается в темный пигмент, родственный естественным меланинам.

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

Опыт № 2 Обнаружение тирозиназы в картофеле

Тирозиназа катализирует окисление фенолов и родственных по строению соединений. Она является металлопротеином, содержащим медь, которая служит переносчиком электронов от субстрата на кислород воздуха. Тирозиназа содержится в растениях, грибах, в отдельных органах и тканях животных.

Реактивы: дистиллированная вода, раствор аминокислоты тирозина, экстракт картофеля.

Ход работы. Несколько кусочков свежего картофеля растирают в ступке с чистым песком, добавляют в ступку 10 – 15 мл дистиллированной воды и

фильтруют через двойной слой марли. Экстракт делят на две равные части. Одну часть в пробирке или колбочке кипятят для денатурации фермента.

В две пробирки наливают по 1 мл раствора аминокислоты тирозина. В одну пробирку добавляют первую часть некипяченого экстракта картофеля. Во вторую пробирку наливают охлажденный кипяченный экстракт. Обе пробирки ставят в водяную баню (40°C). Время от времени пробирки встряхивают. Через некоторое время наблюдают, что в первой пробирке раствор постепенно становится розово-красным, потом бурым и, в конце концов, черным. В пробирке с кипяченым экстрактом фермент не активен из-за денатурации и поэтому окисление тирозина происходит значительно медленнее.

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

Контрольные вопросы

1. Что является предшественником тирозина в организме?
2. Какова роль тирозин в организме?
3. Почему тирозиназа катализирует окисление фенолов и родственных по строению соединений?

4 Жидкость в пробирке с активным ферментом постепенно принимает сначала розовую, красную, а через 1-2 часа – бурую и черную окраску. В контрольной пробе с прокипяченной вытяжкой цвет жидкости не изменяется почему?

6 Лабораторная работа № 6 Эмульгирование триацилглицеридов желчными кислотами

Расщепление триглицеридов в желудке играет важную роль в пищеварении у детей, особенно грудного возраста. Несмотря на то, что

расщепление триглицеридов в желудке взрослого человека невелико, оно в определенной степени облегчает последующее переваривание их в кишечнике: приводит к появлению свободных жирных кислот, которые подвергаясь всасыванию в желудке, поступают в кишечник и способствуют там эмульгированию жиров, облегчая, таким образом, воздействие на них липазы панкреатического сока. Жиры и другие липиды нерастворимы в воде, но растворяются во многих органических жидкостях. Желчь в особенности обладает свойством эмульгировать жиры, так как содержит соли желчных кислот, сильно понижающих поверхностное натяжение. Это свойство желчи имеет большое значение для переваривания жиров в организме, так как во много раз увеличивает поверхность соприкосновения жира с липазой поджелудочной железы.

Реактивы: 1. Растительное масло, 2. Дистиллированная вода, 3. Желчь 4. Едкий калий 5. Карбонат натрия, 6. Белок 7. Пробирки.

Ход работы: В 5 пробирок помещают по 2 капли растительного масла, по 1 мл дистиллированной воды и по 5 капель соответственно в каждую пробирку, начиная с первой: желчи, едкого калия, карбоната натрия, белка и воды. Пробирки встряхивают и наблюдают образование устойчивых эмульсий во всех пробирках, кроме 5-й, где происходит расслаивание на жир и воду.

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

Контрольные вопросы:

1. Что такое мицеллы желчи.
2. Какие желчные кислоты вы знаете?
3. Где происходит переваривание жиров?
4. Устойчива ли липаза при кислых значениях pH (почему?)

7 Лабораторная работа № 7 Качественная реакция Паттенкоффера на желчные кислоты

Желчные кислоты выполняют важную роль в переваривании и всасывании липидов - они обеспечивают эмульгирование жиров, активацию панкреатической липазы, образование смешанных мицелл. В норме желчные кислоты подвергаются энтеропечёночной циркуляции и выводятся из организма через кишечник. Нормальная моча, как правило, их не содержит. При механической желтухе они появляются в моче, и их количество увеличивается при длительной закупорке желчных протоков. Желчные кислоты в моче можно выявить и при паренхиматозной желтухе.

Принцип. При взаимодействии желчных кислот с оксиметилфурфуролом образуются продукты их конденсации, которые имеют красно-фиолетовую окраску. Оксиметилфурфурол образуется из фруктозы (сахарозы) при взаимодействии с концентрированной серной кислотой.

Реактивы: 1. Сахароза, 20 %-ный раствор, свежеприготовленный. 2. Серная кислота концентрированная. 3. Чашка Петри (сухая). 4. Стеклянные палочки. 5. Желчь, разведенная в 2 раза.

Ход работы. На чашку Петри или стекло нанести 2-3 капли мочи, 2 капли раствора сахарозы и тщательно перемешать стеклянной палочкой. После этого прибавить 7 капель концентрированной серной кислоты и снова перемешать стеклянной палочкой. При наличии желчных кислот через несколько минут появляется красное окрашивание, которое постепенно переходит в красно-фиолетовое.

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

Контрольные вопросы:

1. Дайте биохимическую характеристику панкреатической липазе

2. Что является основным компонентом желчи?
4. Где осуществляется синтез желчных кислот?
5. К чему приводит нарушение желчеобразования

8 Лабораторная работа № 8 Определения содержания В-липопротеинов (липопротеинов низкой плотности) в плазме крови

Общие липиды в крови представлены нейтральными жирами, свободными жирными кислотами, фосфолипидами, холестерином, липопротеинами различной плотности и являются показателями липидного обмена. Существуют различные методы количественного определения общих липидов: колориметрические, нефелометрические. Большинство липидов находится в крови не в свободном состоянии, а в составе белково-липидных комплексов: хиломикронах, α -липопротеинах, β -липопротеинах. Липопротеины можно разделить различными методами: центрифугированием в солевых растворах различной плотности, электрофорезом, тонкослойной хроматографией. При ультрацентрифугировании выделяются хиломикроны и липопротеины разной плотности: высокой (ЛПВП – α -липопротеины), низкой (ЛПНП – β -липопротеины), очень низкой (ЛПОНП – пре- β -липопротеины) и др.

Фракции липопротеинов отличаются по количеству белка, относительной молекулярной массе липопротеинов и процентному содержанию отдельных липидных компонентов. Так, α -липопротеины, содержащие большое количество белка (50-60%), имеют более высокую относительную плотность (1,063-1,21), тогда как β -липопротеины и пре- β -липопротеины содержат меньше белка и значительное количество липидов – до 95% от всей

относительной молекулярной массы и низкую относительную плотность (1,01-1,063).

Опыт № 1 Определение общих липидов в сыворотке крови

Принцип метода. Продукты гидролиза ненасыщенных липидов образуют с фосфованилиновым реактивом соединение красного цвета, интенсивность окраски которого прямо пропорциональны содержанию общих липидов.

Исследуемый материал: плазма и эритроциты кролика.

Реактивы: стандартный раствор липидов (8 г/л), концентрированная серная кислота, фосфованилиновый реактив.

Оборудование: пробирки, пипетки, водяная баня, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 5 мм.

Ход работы. Производят гидролиз липидов, для этого в сухие пробирки приливают реактивы по схеме:

Реактивы (мл)	Опытная	Стандартная	Контроль
	проба	проба	ь
Сыворотка	0,02	-	-
Стандартный раствор	-	0,02	-
Серная кислота	1,50	1,50	1,50

Пробы перемешать и нагревать 15 мин в кипящей водяной бане. Затем охладить и гидролизат использовать для приготовления других проб

Гидролизат (для каждой пробы свой)	0,10	0,10	0,10
Фосфованилиновый реактив	1,50	1,50	1,50

Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 40 мин. Колориметрируют опытные и стандартную пробы против контроля при зеленом светофильтре в кювете толщиной 0,3 см. Расчет содержания общих липидов проводят по формуле

$$A = 8 E_{оп}/E_{ст} \text{ (г/л)}$$

Нормальное содержание липидов – 4-8г/л.

Клинико-диагностическое значение. Как физиологическое явление увеличение содержания липидов в крови (гиперлипемия) наступает через 1-4 часа после приема пищи. Концентрация липидов крови увеличивается при

диабете (до 10-20 г/л), липоидном нефрозе, циррозе печени, ожирении, атеросклерозе, ишемической болезни сердца, гипотиреозе, панкреатите.

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

Опыт № 2 Определение общего холестерина в сыворотке крови ферментативным методом

Принцип метода. При взаимодействии ЛПНП сыворотки крови с гепариновым реактивом появляется мутность, интенсивность которой определяется фотометрически. Гепариновый реактив представляет собой смесь гепарина с хлоридом кальция.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы: 0,27%-ный раствор CaCl_2 , 1%-ный раствор гепарина.

Оборудование: микропипетка, ФЭК, кювета с длиной оптического пути 5 мм, пробирки.

Ход работы: В пробирку вносят 2 мл 0,27%-ного раствора CaCl_2 и 0,2 мл сыворотки крови, перемешивают. Определяют оптическую плотность раствора (E_1) против 0,27%-ного раствора CaCl_2 в кюветах при красном светофильтре (630 нм). Раствор из кюветы переливают в пробирку, добавляют микропипеткой 0,04 мл 1%-ного раствора гепарина, перемешивают и точно через 4 мин снова определяют оптическую плотность раствора (E_2) в тех же условиях.

Вычисляют разность оптической плотности и умножают ее на 1000 – коэффициент эмпирический, предложен Ледвиной, так как построение калибровочной кривой сопряжено с рядом трудностей. Ответ выражают в г/л.

$$x(\text{г/л}) = (E_2 - E_1) \times 1000.$$

Клинико-диагностическое значение. Содержание ЛПНП (b-липопротеинов) в крови колеблется в зависимости от возраста, пола и составляет в норме 3,0-4,5 г/л. Увеличение концентрации ЛПНП наблюдается

при атеросклерозе, механической желтухе, острых гепатитах, хронических заболеваниях печени, диабете, гликогенозах, ксантоматозе и ожирении, снижение – при b-плазмоцитоме. Среднее содержание холестерина в ЛПНП около 47%.

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

Контрольные вопросы:

1. Классификация и строение липопротеинов крови.
2. Функция и значения липопротеинов
3. Роль липопротеины высокой плотности и липопротеины низкой плотности в развитии атеросклероза
4. Клинико-диагностическое значение определения липидного спектра крови

9 Лабораторная работа № 9 Определение патологических компонентов в моче

Моча представляет собой водный раствор конечных продуктов обмена веществ, выделяемых организмом. За сутки человек выделяет в среднем 1,5 л мочи. Суточное количество мочи может колебаться в широких пределах, что зависит от ряда условий, главным образом, от питьевого режима. В патологических случаях может быть полное прекращение выделения мочи (анурия), уменьшение выделения мочи (олигурия) или повышение выделения мочи (полиурия). Определение суточного количества мочи (диурез) позволяет судить о функциях почек и сердечно-сосудистой системы.

При выполнении физических нагрузок различного характера происходит значительное повышение содержания метаболитов углеводного, липидного и

белкового обмена как в крови, так и в моче. Использование методов экспресс-анализа позволяет быстро провести и дать предварительную оценку воздействия на организм физических нагрузок различных по своей интенсивности и длительности, что является особенно важным фактором при проведении оперативного биохимического контроля.

Цель работы:

- знать какие вещества называют нормальными и патологическими компонентами мочи;
- познакомиться с методами обнаружения и определения патологических составных частей мочи;
- научиться объяснять появления патологических компонентов в моче
- изучить методы и биохимического контроля мочи.

Опыт № 1 Определение белка

Появление в моче белка носит название альбуминурия. Различают истинную альбуминурию, при которой почки пропускают мочу, уже содержащую белок, и случайную, когда почки выделяют нормальную мочу, но затем в нее попадают белоксодержащие примеси (кровь, гной, семя). Альбуминурия наблюдается при нефритах, расстройстве сердечной деятельности, острых инфекционных заболеваниях, иногда, беременности.

Принцип метода: Метод основан на образовании тонкого кольца осадка белка при наслоении мочи на реактив Ларионовой или 50% азотную кислоту. Экспериментально установлено, что растворы, содержащие 0,033 г/л, дают мутное белое колечко между второй и третьей минутой после наслаивания.

Ход работы:

1. В 5 пробирок вносят по 2 мл дистиллированной воды. В первую приливают 2 мл мочи, перемешивают и переносят 2 мл полученной смеси во вторую пробирку и т.д. Из пятой пробирки берут 2 мл смеси и отбрасывают, таким образом, получают пробы мочи с разведением в 2, 4, 8, 16 и 32 раза.

2 В другие 5 пробирок наливают по 1 мл реактива Ларионовой. Затем осторожно, по стенке наслаивают такое же количество проб мочи с

разведениями. Отмечают, в какой пробирке между 2-ой и 3-ей минутами появилось белое кольцо.

2. Чтобы вычислить содержание белка в исследуемой моче, необходимо 0,033 г/л умножить на степень разведения мочи в пробирке с кольцом.

Результат анализа:

Опыт № 2 Обнаружение сахара в моче

В моче здорового человека глюкоза присутствует в виде следов. Выделение с мочой больших количеств глюкозы (глюкозурия) обусловлено либо повышением содержания сахара в крови, либо пропускной способностью почек. Стойкое повышение сахара в моче наблюдается при диабете (в тяжелых случаях доходит до 80-100 г/л). Гликозурия, обусловленная нарушением пропускной способности почек, называется почечной и наблюдается при введении в организм больших количеств алкоголя, опиума, адреналина, окиси углерода (II), хлороформа и других веществ. Для обнаружения сахара в моче пользуются пробами Троммера или Фелинга.

Ход работы: К 5-6 каплям реактива Фелинга добавляют 5-6 капель исследуемой мочи, жидкость перемешивают и нагревают до начала кипения (не кипятить!). В присутствии глюкозы выпадает желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди. (Возможно изменение цвета без осадка).

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

Опыт № 3 Обнаружение кетоновых тел в моче

К кетоновым телам относятся ацетон, ацетоуксусная кислота, оксимасляная кислота. В норме с мочой выделяется 0,05 г за сутки кетоновых тел. Повышение выделения кетоновых тел из организма (кетонурия) наблюдается при острых лихорадочных процессах (у детей при скарлатине и кори), при диабете, раке, цинге, голодании, при расстройствах пищеварения.

Ход работы: Проба Легалья: К 10 каплям мочи добавляют 1-2 капли 5 % раствора нитропруссиды натрия и 3-4 капли 10 % раствора NaOH. Появляется оранжево-красное окрашивание. Добавляют 5-6 капель концентрированной

уксусной кислоты; в присутствии ацетоновых тел возникает вишнево-оранжевое окрашивание.

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

Опыт № 4 Обнаружение кровяных пигментов

При нарушении целостности кровеносных сосудов мочевых путей в моче появляется кровь (гематурия). При тяжелых инфекционных заболеваниях, отравлениях и ожогах происходит разрушение эритроцитов, переход гемоглобина в плазму, а затем появление его в моче (гемоглобинурия). Моча при этом бывает окрашена в красный или кофейно-бурый цвет. В случаях гематурии и гемоглобинурии в моче содержится белок.

Ход работы: В пробирку наливают 10 капель мочи, кипятят и охлаждают. Добавляют равный объем раствора бензидина и несколько капель 3 % перекиси водорода. При наличии кровяных пигментов моча окрашивается в синий или зеленый цвет.

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

Опыт № 5 Обнаружение желчных пигментов

Желчные пигменты – билирубин, биливердин и др. появляются в моче при желтухе. Моча, содержащая желчные пигменты, имеет желтовато-коричневый или зеленый цвет (характерный признак желтухи).

Ход работы: В пробирку наливают 3-5 мл мочи и осторожно наслаивают 0,1 % спиртовой раствор йода. При наличии билирубина на границе между объемами жидкостей образуется зеленое кольцо. При наличии в моче крови проба также положительна.

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

Контрольные вопросы:

1. Нефрон как функциональная единица почки
2. Назвать нормальные и патологические компоненты мочи.

3. Причина появления патологических компонентов в моче.
4. Понятие альбинурии.
5. Глюкозурия: её виды, причины появления глюкозы в моче.
6. Какие вещества оказывают влияние на цвет мочи?

Список использованных источников

1. Методические основы экспериментальной работы в биохимической лаборатории: учеб.-метод. пособие / Г.П. Диге, Н.Д. Ещенко, И.Е. Красовская, Т.В. Гришина. – СПб., СПбГУ, 2008. – 102 с. 2.

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.