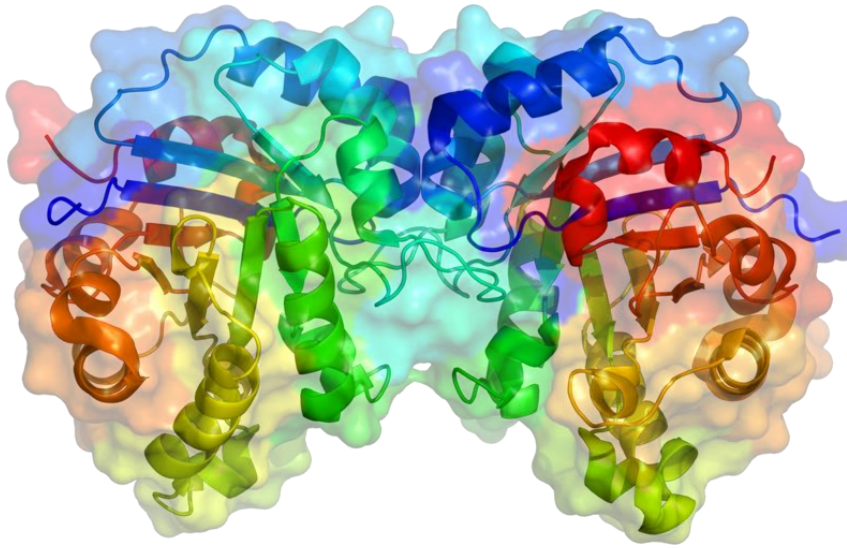
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
КРИВОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кафедра хімії та методики її навчання

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ З БІОХІМІЇ:
БІЛКИ ТА ФЕРМЕНТИ



Кривий Ріг 2022

УДК 577.1(075.8)(076.5)
А 57

Друкується за рішенням кафедри хімії та методики її навчання Криворізького державного педагогічного університету, протокол № 5 від «16» листопада 2022 року.

Автор-розробник:
кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник ***Альохіна Тетяна Миколаївна*** *– доцент кафедри хімії та методи її навчання Криворізького державного педагогічного університету*

Рецензент:
кандидат педагогічних наук, доцент ***Нечипуренко Павло Павлович*** *– доцент кафедри хімії та методи її навчання Криворізького державного педагогічного університету*

Альохіна Т. М.
Лабораторний практикум з біохімії: Білки та Ферменти. Кривий Ріг : Криворізький державний педагогічний університет, 2022. 77 с.; 1,55 авт. др. арк.

ЗМІСТ

ВСТУП……...5
ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ 7
СКОРОЧЕНІ НАЗВИ АМІНОКИСЛОТ ЛАТИНСЬКОЮ МОВОЮ..... 8
ПРАВИЛА РОБОТИ ТА ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ В УЧБОВИХ ХІМІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЯХ 9
РОЗДІЛ І. АМІНОКИСЛОТИ. ПЕПТИДИ. БІЛКИ..... 13
1.1. Загальна інформація..... 13
1.2. Лабораторна робота № 1 «Якісні реакції на амінокислоти та пептиди»..... 20
1.3. Лабораторна робота № 2 «Денатурація білка» 23
1.4. Лабораторна робота № 3 «Визначення загального білку сироватки крові біуретовим методом» 26
1.5. Лабораторна робота № 4 «Визначення вмісту загального білка у молоці колориметричним методом».... 30
1.6. Лабораторна робота № 5 «Кількісне визначення гемоглобіну крові»..... 32
1.7. Лабораторна робота № 6 «Визначення ізоелектричної точки казеїну та желатину»..... 34
1.8. Тестові завдання та задачі. 37
РОЗДІЛ ІІ. ФЕРМЕНТИ..... 44
2.1. Загальні відомості 44
2.2. Лабораторна робота № 1 «Дослідження тирозинази». 50
2.3. Лабораторна робота № 2 « Дослідження сахарази» 51

2.4. Лабораторна робота № 3 «Вивчення впливу фізико-хімічних факторів на активність ферментів (на прикладі α-амілаза слини)» 53
2.5. Лабораторна робота № 4 « Визначення активності супероксиддисмутази» 56
2.6. Лабораторна робота № 5 «Визначення активності каталази» 59
2.7. Лабораторна робота № 6 «Визначення активності уреази» 61
2.8. Лабораторна робота № 7 «Визначення активності пероксидази» 63
2.9. Лабораторна робота № 8 «Визначення активності аланінамінотрансферази (АлТ) методом Райтмана-Френкеля» 64
2.10. Тестові завдання та задачі. 66
ЛІТЕРАТУРА 755
ВІДПОВІДІ ДО ТЕСТІВ ТА ЗАДАЧ РОЗДІЛУ І 766
ВІДПОВІДІ ДО ТЕСТІВ ТА ЗАДАЧ РОЗДІЛУ ІІ 777

ВСТУП

Біохімія – це наука, що вивчає молекулярні процеси, які лежать в основі розвитку та функціонування живих організмів. Метою викладання навчальної дисципліни «Біохімія» – є формування у студентів розуміння єдності метаболічних процесів в організмах на основі системних знань про хімічну будову живих організмів та фізико-хімічних процесів, що забезпечують їх життєдіяльність. Сучасна біохімія приділяє особливу увагу вивченню білків, які є матеріальною основою життя, та ферментів – каталізаторів хімічних реакцій, що відбуваються в живих організмах.

Біохімія – є одним з базових курсів природничого циклу, вона гармонійно об'єднує та доповнює біологічні та хімічні дисципліни, що опановують майбутні педагоги. Формування відповідного рівня знань студентів з даної дисципліни передбачає застосування таких прийомів, форм і методів навчання, які можуть забезпечити засвоєння теоретичних основ біохімії, знань хімічного складу, будови та властивостей органічних молекул, що входять до складу живих організмів; вивчення основних хімічних перетворень, що лежать в основі життєдіяльності; розуміння логіки процесів, що відбуваються в організмах та їх регуляції.

Представлений лабораторний практикум містить короткий інформаційний матеріал з тем «Білки» та «Ферменти», низку лабораторних робіт із якісного та кількісного визначення біомолекул, тестові завдання та задачі. В лабораторних роботах викладено принцип методу згідно якого здійснюється визначення біомолекул з наведенням реакцій речовин, що

взаємодіють, детально описаний хід роботи та очікувані результати.

Під час виконання лабораторних робіт студенти не тільки отримують нові знання та практичні навички з біохімії, але й використовують знання та навички, що були здобуті з предметів: неорганічна хімія, органічна хімія, аналітична хімія, фізична хімія, методи лабораторного аналізу. Структура лабораторних робіт дозволяє проводити їх без додаткових вказівок, що особливо актуально у зв'язку з необхідністю підготовки студентів до самостійного рішення проблем в подальшій практичній роботі. Перед тим, як приступити до виконання лабораторних робіт, кожний студент повинен ознайомитися з правилами роботи і технікою безпеки у хімічній лабораторії. Результати виконаних лабораторних робіт оформляються студентами у вигляді звітів, що повинні містити: назву лабораторної роботи, принцип методу визначення досліджуваної речовини, експериментальну частину з результатами виконаних дослідів та висновки, що узагальнюють проведене дослідження.

Для більш глибокого засвоєння теоретичного матеріалу, студенти виконують тестові завдання та розв'язують задачі. Це надає викладачу можливість контролю за самостійною роботою студентів.

Даний лабораторний практикум містить перелік скорочень, що зустрічаються у лабораторних роботах та тестових завданнях.

Відповіді на тестові завдання та задачі надано у додатку.

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

а/к – амінокислота
АлТ – аланінамінотрансфераза
АсТ – аспартамамінотрансфераза
АТФ – аденозинтрифосфорна кислота
Да – дальтон, одиниця вимірювання маси молекул, субклітинних структур
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ІЕТ – ізоелектрична точка
$К_М$ – константа Міхаеліса
КФ – класифікація ферментів
НАД (NAD) – нікотинаміддинуклеотид
НАДФ (NADP) – нікотинаміддинуклеотидфосфат
НСТ – нітросиній тетразолій
РНК – рибонуклеїнова кислота
СОД – супероксиддисмутаза
ФАД – флавінаденіндинуклеотид
КФ – класифікація ферментів
ФМН – флавінмононуклеотид
ФК - фотоколориметр
Со-А – коензим А
Е – фермент
ES – фермент-субстратний комплекс
Hb – гемоглобін
S – субстрат

СКОРОЧЕНІ НАЗВИ АМІНОКИСЛОТ ЛАТИНСЬКОЮ МОВОЮ

Ala – аланін
Arg – аргінін
Asn – аспарагін
Asp – аспарагінова кислота
Gly – гліцин
Glu – глутамінова кислота
Gln – глутамін
Cys – цистеїн
His – гістидин
Ile – ізолейцин
Leu – лейцин
Lys – лізин
Met – метіонін
Pro – пролін
Phe – фенілаланін
Ser – серин
Thr – треонін
Tyr – тирозин
Trp – триптофан
Val – валін

ПРАВИЛА РОБОТИ ТА ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ В УЧБОВИХ ХІМІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Під час виконання лабораторних робіт з біохімії в учбових хімічних лабораторіях необхідно дотримуватися протоколу проведення робіт:

1. При роботі у лабораторії виконуйте тільки ту роботу, яка стосується даного заняття та надана викладачем. Забороняється здійснювати види робіт не передбаченні даним заняттям.
2. Виконувати лабораторні роботи з біохімії в хімічній лабораторії необхідно в халаті та гумових (латексних, нітрилових) рукавичках.
3. Перед початком проведення лабораторної роботи треба уважно ознайомтесь із завданням, ходом проведення роботи, необхідним обладнанням та реактивами.
4. Перед початком виконання лабораторної роботи необхідно приготувати робоче місце: підготувати штатив, промаркувати пробірки, підготувати необхідні піпетки, приготувати (за необхідності) реактиви та досліджуваний біологічний матеріал.
5. На робочому місці не повинно бути непотрібних для роботи речей (сумок, портфелів, одягу і т.п.).
6. При використанні готових реактиві для досліду звертайте увагу на етикетку, в разі сумніву щодо вмісту флакону, звертайтесь до викладача або лаборанта.

7. Біохімічні досліди необхідно виконувати в такій послідовності, використовувати реактиви у таких кількостях та концентраціях, та проводити реакції в тих умовах, що вказані у методичній літературі.

8. Використовуйте індивідуальні піпетки або індивідуальні насадки для автоматичного дозатору для кожного реактиву.

9. Вминання-вимикання, а також роботу з обладнанням здійснювати відповідно інструкцій до кожного приладу.

10. Після закінчення виконання лабораторної роботи треба привести до ладу своє робоче місце, заявити лаборанту або викладачу про закінчення роботи і тільки після цього залишити лабораторію.

Під час проведення лабораторних робіт у хімічній лабораторії необхідно дотримуватися правил техніки безпеки щодо роботи з реактивами:

1. Ніякі речовини у лабораторії не пробувати на смак, а також не пити з хімічного посуду.

2. Нагрівати рідину в пробірці треба поступово, спрямовуючи отвір пробірки в напрямку від себе, тому що внаслідок перегріву може відбутися викид рідини.

3. Досліди з леткими речовинами проводити у витяжній шафі.

4. Роботи з бензолом, діетиловим етером та спиртом треба проводити на відстані від полум’я, у витяжній шафі.

5. Розчиняти кислоти у воді треба шляхом додавання кислоти до води, постійно перемішуючи розчин.

6. Виливати у раковину кислоти та лужні розчини треба після їх нейтралізації лугом чи кислотою відповідно.

7. Розлиті кислоти та лужні розчини треба засипати піском або нейтралізувати і тільки після цього проводити прибирання.

Під час проведення лабораторних робіт у хімічній лабораторії ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ:

1. Самостійно вмикати силові установки.
2. Проводити роботи з хімічними речовинами у лабораторіях без загальної припливно-відтічної вентиляції.
3. Їсти у приміщенні.
4. Залишати без догляду запалені горілки, водяні бані та нагрівальні прилади.
5. Набирати рідини піпеткою ротом.
6. Відкривати центрифугу до її повної зупинки.
7. Залишатися працювати в лабораторії одному. Обов'язкова присутність другої особи у разу необхідності надання будь-якої допомоги.

Речовини, що вимагають обережного поводження:

1. АЦЕТОН. Летка речовина. Зберігати у склянках з притертою кришкою. При загоранні краще використовувати воду у розпиленому стані.
2. КАЛІЙ ТА НАТРІЙ НІТРАТИ. Можуть викликати подразнення шкіри. Легко займаються. Зберігати треба у сухому місці, у скляному посуді.
3. ЛУГИ. При попаданні на шкіру та слизові оболонки викликають сильні опіки. Їх треба зберігати у сухому місці, ізольовано від води та нагріву.
4. НІТРАТНА КИСЛОТА. Концентрована кислота викликає опіки шкіри. Пари нітратної кислоти спричиняють подразнюючу дію на дихальні шляхи та очі. Нітратна кислота

може вибухати при взаємодії зі скипидаром та спиртом, також з солями пікринової кислоти, карбідами та порошками металів.

5. ОЦТОВА КИСЛОТА. Може викликати тяжкі опіки шкіри. Пари оцтової кислоти викликає подразнення слизових оболонок. При взаємодії з нітратною кислотою та пероксидом натрію може виникнути спалах. Гасити водою.

6. ПЕРМАНГАНАТ КАЛІЮ. Вибухає при обробці концентрованою сульфатною кислотою, спиртом, етером та горючими речовинами.

7. СУЛЬФАТНА КИСЛОТА. При попаданні на шкіру викликає тяжкі опіки. Пари сульфатної кислоти можуть викликати подразнення слизових оболонок. Гасити треба піском або золою, застосовувати воду не можна.

8. ХЛОРИДНА КИСЛОТА. Викликає опіки шкіри. Пари викликають сильні опіки слизових оболонок. При пожежі застосовують воду, або нейтралізуючи речовини (сода).

Перша допомога у разі нещасного випадку:

1. При опіках кислотами та лужними розчинами слід негайно промити пошкоджене місце сильним струмом води. Потім нейтралізувати кислоту – 1% розчином бікарбонату натрію; луг – 1% розчином оцтової кислоти.

2. При хімічних опіках очей їх слід ретельно промити водою, потім 1% розчином бікарбонату натрію (при опіках кислотами), чи 2% розчином борної кислоти (при опіках лугами).

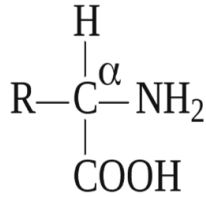
3. За підозри на отруєння леткими токсичними речовинами людину слід негайно вивести на свіже повітря. Потерпілому слід дати велику кількість молока та забезпечити спокій. За необхідності викликати швидку медичну допомогу.

РОЗДІЛ І. АМІНОКИСЛОТИ. ПЕПТИДИ. БІЛКИ

1.1. Загальна інформація

Амінокислоти – органічні сполуки, похідні карбонових кислот, в яких один або декілька атомів гідрогену у вуглецевому ланцюзі замінено на аміногрупу NH_2. Залежно від положення аміногрупи розрізняють α-, β-, γ- амінокислоти, проте у складі білків містяться лише α-амінокислоти.

Кожна амінокислота складається з аміногрупи, карбоксильної групи та певної групи – бічного ланцюга. Загальну формулу амінокислоти можна продемонструвати наступним чином:



З природних джерел виділено понад 500 амінокислот. В організмі людини міститься близько 60 амінокислот, 20 з яких постійно входять до складу білків. Ці 20 амінокислот носять назву *протеїногенні амінокислоти* та з них побудовані всі білки усіх живих істот. Цей універсальний білковий алфавіт існує вже понад 2 млрд. років.

В залежності від будови бічного ланцюга амінокислоти розрізняються за розмірами, за реакційною здатністю, за здатністю до утворення водневого зв'язку тощо. Той факт, що білки здатні виконувати різні функції, обумовлений різноманіттям та гнучкістю властивостей 20 структурних

амінокислот, що складають білки. В організмі людини знайдено понад 5×10^6 білків, хоча будова визначена для декількох тисяч. Теоретично, із 20 амінокислот можна побудувати 24×10^{18} різних білків, проте, існування білків у природі обумовлюється не математичними законами, а інформацією, що міститься у закодованому вигляді у молекулах ДНК.

Більшість з виявлених амінокислот синтезується у рослинних організмах. В організмі людини синтезується лише частина протеїногенних амінокислот – це, так званні, *замінні амінокислоти*, решту необхідних амінокислот організм людини не здатен синтезувати із простих попередників – це *незамінні амінокислоти* – тому людина повинна отримувати їх із їжею. Повністю незамінними в організмі людини є валін, лейцин, ізолейцин, треонін, лізін, метіонін, фенілаланін та триптофан. Такі амінокислоти як аргінін, тирозин, гістидін можуть синтезуватися кишковою мікрофлорою. Решта амінокислот може синтезуватися із простих попередників.

Усі амінокислоти крім гліцину містять асиметричний атом Карбону і є оптично активними речовинами, тобто здатні обертати площину поляризації світла. Всі протеїногенні амінокислоти належать до L-ряду, тобто обертають площину поляризації ліворуч. Однак у клітинах мікроорганізмів є і D-амінокислоти, так до складу клітинної стінки деяких антибіотиків входять білки, що мають D-амінокислоти.

Амінокислоти в розчинах виявляють властивості амфотерних поліелектролітів (амфолітів). Іонізація амінокислоти залежить від pH середовища. У кислих розчинах карбоксильна група знаходиться в неіонізованому стані, тоді як аміногрупа іонізована (NH_3^+); у лужних розчинах навпаки.

Значення pH середовища, за якого загальний сумарний заряд амінокислоти дорівнює нулю має назву *ізоелектричної точки* (pI). У цьому випадку молекула амінокислоти електронейтральна і в електричному полі не рухається ні до катоду ні до аноду.

За хімічною будовою бічного ланцюга протеїногенні амінокислоти поділяються на: аліфатичні (гліцин, аланін, лейцин, ізолейцин, валін); імінокислоту – пролін; амінокислоти, що містять гідроксильну групу (серин, треонін); амінокислоти, що містять сульфур (цистеїн, метіонін); ароматичні (фенілаланін, тирозин, триптофан); гетероциклічні (гістидин); моноамінодикарбонові (аспарагінова та глутамінова кислоти); діаміномонокарбонові (аргінін, лізин); аміди дикарбонових кислот (аспарагін, глутамін).

Пептиди – органічні сполуки, що утворюються внаслідок поліконденсації амінокислот – взаємодії їх α-карбоксильної та α-аміногрупи. Залежно від кількості залишків амінокислот, що беруть участь у реакції поліконденсації, утворені сполуки називаються дипептидами, трипептидами і так далі. Пептид, що містить до 20 амінокислотних залишків – це олігопептид, більше 20 – поліпептид. Молекули більшості білків – це поліпептиди.

Амінокислотній ланцюг має відповідний напрямок, оскільки кожен з її будівельних блоків має різні кінці – або α-аміно-, або α- карбоксильну групу. Початком поліпептидного ланцюга є N-кінець, тобто кінець, що несе аміногрупу. Назви пептидів утворюються з назв амінокислотних залишків, при цьому суфікс «н» замінюється на «л». Так, наприклад, трипептид, що складається з серину, аланіну та цистеїну, буде мати назву: серил-аланіл-цистеїн.

Білки (протеїни) – (від грец. protos – перший найважливіший) – природні органічні високомолекулярні сполуки, які у вигляді мономерних ланок містять залишки протеїногенних амінокислот, сполучених пептидним зв'язком. Білки зустрічаються в усіх живих організмах та є основою їх життєдіяльності. Білки є найважливішими в біологічному відношенні і найскладнішими за своєю хімічною структурою сполуками. Усі властивості, якими жива природа відрізняється від неживої пов'язані з білками.

Основні функції білків в організмі людини:

1) Каталітична функція (ферментативний каталіз). В біологічних системах майже всі реакції каталізуються специфічними макромолекулами, що мають назву ферменти. Всі відомі на сьогоднішній день ферменти – це білки. Це дає змогу казати про те, що саме білки визначають хід хімічних перетворень у біологічних системах. *2) Транспортна функція.* Транспорт більшості невеликих молекул та іонів здійснюється специфічними білками. *3) Структурна функція.* Білки становлять від 18 до 21% загальної маси організму людини, складаючи паренхіму більшості внутрішніх органів. Основою м'язової та сполучної тканини є білки. *4) Захисна функція.* Гуморальний імунітет забезпечується за рахунок утворення антитіл – високо специфічних білків. До захисної системи також належить система гемокоагуляції з її головними білками фібриногеном та тромбіном. *5) Генерування та передача нервових імпульсів.* Відповідь нервових клітин на специфічні імпульси опосередкована рецепторними білками. Наприклад, родопсин – фоторецепторний білок клітин паличок сітківки ока; молекули рецепторів, що приводяться у дію специфічними речовинами невеликої молекулярної маси типу γ-аміномасляна

кислота забезпечують передачу нервових імпульсів у синапсах. *6) Енергетична функція білків.* Білки, як і вуглеводи та жири можуть виступати джерелом енергії. Енергетична цінність білків 4,1 ккал/г (або 17 кДж/г). *7) Регуляторна функція.* На субклітинному рівні білки можуть бути активаторами чи репресорами транскрипції, регулюють процеси зчитування спадкової інформації та прискорюють чи гальмують синтез білку. На організмовому рівні діють гормони білкової природи, такі як: інсулін, глюкагон, соматотропін, адренокортикотропний гормон та інші. *8) Буферна роль білків.* Кожен білок за хімічною структурою є амфотерним поліелектролітом. Білки підтримують відповідні значення pH у різних частинах клітини, забезпечуючи цим компартменталізацію клітини. Крім того, білки підтримують pH крові у сталому стані.

Прийнято розрізняти 4 структурних рівня в архітектурі білків. *Первинною структурою білка* називають порядок чергування амінокислотних залишків у білку. Первинна структура білків – це важлива характеристика, яка визначає властивості, функції, біологічну роль та просторову конфігурацію нативних (природних) білків. Первинна структура стабілізується ковалентними зв'язками – пептидним та дисульфідним.

Вторинна структура білка утворюється в результаті стеричної взаємодії амінокислотних залишків, розташованих один біля одного в лінійній послідовності. Внаслідок обмежень, що накладаються пептидним зв'язком при утворенні пептидного ланцюга, він приймає не будь-яку, а строго визначену конформацію. Відомо три основних типи

вторинної структури білків: α-спіраль, β-складчастий шар та невпорядкований клубок.

Модель просторової конфігурації поліпептидного ланцюга у вигляді α-спіралі запропонували у 1951 р. Полінг та Корі. На основі даних рентгеноструктурного аналізу α-спіраль є найоптимальнішою у енергетичному відношенні, оскільки має найменший рівень вільної енергії. Стабілізується α-спіраль внутрішньо-молекулярними водневими зв'язками. СО-група кожної амінокислоти з'єднується водневим зв'язком з NH-групою амінокислоти, що розташована на 4 залишки попереду. Дві або більше α-спіралей можуть закручуватись одна вздовж іншої як тяжі у канаті. Така структура виявлена у багатьох білків: кератині волосся, міозині – білку м'язів, фібрині – білку, що приймає участь в утворенні тромбів.

У β-складчастому шарі сегменти пептидного ланцюга розташовуються паралельно або антипаралельно один одному в один шар, утворюючи фігуру подібну до складеного гармошкою листка. Шар може бути утвореним двома або більшою кількістю пептидних ланцюгів; суміжні сегменти можуть бути орієнтовані у шарі N-кінцями в один бік (паралельно) або N-кінцями в різні боки (антипаралельно).

Третинна структура білка обумовлюється стеричною взаємодією амінокислотних залишків, що далеко відстоюють один від одного в лінійній послідовності. *Третинна структура специфічна для кожного окремого білка і визначає його властивості* (каталітичні, гормональні, антигенні). Враховуючи це, третинна структура дістала назву *нативної конформації.* Рушійною силою для утворення такої структури є гідрофобна взаємодія. Крім гідрофобної взаємодії третинну

структуру стабілізують іоні зв'язки, водневі та дисульфідні містки, що виникають між віддаленими ділянками білку.

Четвертинна структура білків притаманна білкам, що складаються з двох або більше поліпептидних ланцюгів. Під четвертинною структурою розуміють спосіб просторового розміщення цих поліпептидних ланцюгів один стосовно інших. Кожен поліпептидний ланцюг у такому білку називається *субодиницею або доменом.*

За хімічною будовою білки поділяють на прості та складні. *Прості білки* – це білки, до складу яких входять лише залишки амінокислот, сполучені в поліпептидний ланцюг. Простими є альбуміни, глобуліни, протаміни, гістони, глутаміни, проламіни, склеропротеїни. Під час гідролізу простих білків утворюються лише амінокислоти.

Складні білки – це такі білки, що складаються з білкової частини та небілкового компоненту (простетичної групи). Залежно від хімічної природи простетичної групи складні білки поділяють на хромопротеїди, фосфопротеїди, металопротеїди, нуклеопротеїди, ліпопротеїди, глюкопротеїди.

1.2. Лабораторна робота № 1 «Якісні реакції на амінокислоти та пептиди»

Мета і завдання лабораторної роботи: сформувати практичне вміння виявлення амінокислот у розчинах та біологічних рідинах.

Нінгідринова реакція. Поліпептиди і вільні амінокислоти при нагріванні з нінгідрином дають синє або фіолетове забарвлення. Реакція характерна для NH_2-групи, що має α-положення й використовується для виявлення α-амінокислот.

Хід роботи: у пробірку вливають 2-3 мл розчину амінокислот (або 1% розчину білка), додають 2-3 мл 0,5% спиртового розчину нінгідрину, злегка підігрівають і спостерігають появу фіолетового забарвлення.

Ксантопротеїнова реакція. Реакція характерна для бензольного ядра ароматичних амінокислот (фенілаланіну, тирозину, триптофану). Ароматичне кільце амінокислот нітрується при дії концентрованої нітратної кислоти з утворенням нітросполук, забарвлених у жовтий колір. Забарвлення переходить в оранжеве при додаванні аміаку.

Хід роботи: у пробірку вливають 2-3 мл тирозину (або 1% розчину яєчного білка), 1-2 мл концентрованої нітратної кислоти, обережно нагрівають і спостерігають за утворенням осаду жовтого кольору. Потім додають по краплях розчин аміаку до утворення жовтогарячого забарвлення.

Реакція Адамкевича. Реакція характерна для триптофану, який містить у своєму складі індольне кільце. При

додаванні до розчину триптофану концентрованої оцтової кислоти (яка завжди має залишок гліоксалевої кислоти) і концентрованої сульфатної кислоти на межі двох рідин утворюється червоно-фіолетове кільце. Позитивну реакцію Адамкевича дають усі білки, які містять триптофан.

Хід роботи: у пробірку вливають 2-3 мл розчину триптофану (або білка), додають 1-2 мл концентрованої оцтової кислоти і, нахиливши пробірку, обережно по стінці пробірки вливають 5 крапель сульфатної кислоти. Через деякий час на межі двох рідин утворюється червоно-фіолетове кільце. Цей процес можна прискорити, якщо поставити пробірку на киплячу водяну баню.

Реакція Фоля. Ця реакція визначає сульфурвмісну амінокислоту цистеїн та дипептид – цистин (який складається з двох залишків цистеїну). У процесі кип'ятіння білка з лугом від цих амінокислот легко відщеплюється сульфур у вигляді сірководню, який з ацетатом свинцю утворює чорний осад сірчистого свинцю. Всі білки, які містять цистин або цистеїн, дають позитивну реакцію Фоля. Метіонін цієї реакції не дає, тому що сульфур в ньому зв'язаний метильною групою.

Хід роботи: у пробірку вливають 5 крапель 1% розчину яєчного білка, додають 5 крапель 30% розчину NaOH і одну краплю 5% розчину ацетату свинцю (або реактиву Фоля). Нагрівають і спостерігають за появою чорного забарвлення.

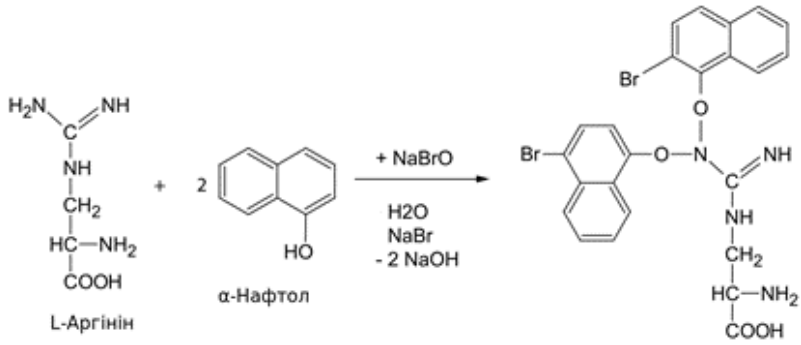
Нітропрусидна реакція. Виявляє сульфурвмісні амінокислоти в білках.

Хід роботи: до 10 крапель 1% розчину яєчного білка додають 10 крапель розчину лугу, інтенсивно кип'ятять, після

охолодження доливають 3-5 крапель свіжо виготовленого нітропрусиду натрію, після чого з'являється червоно-фіолетове забарвлення.

Сакагучі реакція. Виявляє амінокислоту аргінін.

Оскільки аргінін має гуанідинову групу у бічному ланцюзі, то за наявності окисника – розчину брому – він дає червоне забарвлення з α-нафтолом у лужному середовищі.



Хід роботи: беруть 1 мл NaOH і 3 мл розчину аргініну (або 10% розчину білку) змішують і додають 2 краплі α-нафтолу. Ретельно перемішують та додають 4-5 крапель розчину брому (під витяжкою!). Спостерігають за зміною кольору.

Після проведення експериментальної частини потрібно оформити протоколи лабораторної роботи. Для цього одержані результати заносять до таблиці, роблять висновки.

№ п/п	Назва реакції	Що визначається	Спостереження
1.			
2.			
3.			

1.3. Лабораторна робота № 2 «Денатурація білка»

Мета та завдання лабораторної роботи: сформувати практичне вміння проведення реакцій згортання та осадження білків; сформувати поняття денатурація білка.

1.Згортання білків при нагріванні.

Реакції проводять згідно схеми наведеної у таблиці

Пробірка №1	Пробірка №2	Пробірка №3	Пробірка №4	Пробірка №5
В усі пробірки наливають по 2 мл розчину білку				
Вміст пробірки нагрівають. Осад білка з'являється ще до того, як рідина закипить.	До розчину білку додають 1-2 краплі 1% оцтової кислоти і нагрівають. Осад випадає швидше ніж у реакції № 1	До розчину білку додають 0,5 мл 10% оцтової кислоти і нагрівають. Осад не утворюється.	До розчину білку додають 0,5 мл 10% оцтової кислоти та декілька крапель насиченого розчину NaCl і нагрівають. Утворюється осад.	У пробірку додають 0,5 мл розчину NaOH та нагрівають. Осад не утворюється навіть при кип'ятінні.
Записують результати та висновки до кожної проведеної реакції.				

2. Денатурація білків органічними та мінеральними кислотами.

Мінеральні кислоти, крім ортофосфорної, викликають дегідратацію білкових часток і їх денатурацію. Порушення просторової структури білка призводить до утворення осаду у вигляді комплексних солей білка з кислотами. Органічні кислоти здатні нейтралізувати заряд білка й зруйнувати його

просторову структуру, що призводить до денатурації і осадження білка.

Реакції проводять згідно схеми наведеної у таблиці:

Пробірка №1	Пробірка №2	Пробірка №3	Пробірка №4	Пробірка №5
В пробірку обережно наливають 1-2 мл концентро-ваної ***нітратної*** кислоти	В пробірку обережно наливають 1-2 мл концентро-ваної ***сульфатної*** кислоти	В пробірку обережно наливають 1-2 мл концентро-ваної ***хлоридної*** кислоти	В пробірку наливають 2-3 мл розчину білку та додають декілька крапель 5% розчину (трихлор-оцтової кислоти)	В пробірку наливають 2-3 мл розчину білку та додають декілька крапель 20% сульфо-саліцилової кислоти
Нахиливши пробірку обережно наливають по 1 мл розчину білку так, щоб він не змішувався з кислотою. На межі двох рідин з'являється білий аморфний осад.			Випадає осад.	
При струшуванні пробірки осад не розчиняється, а збільшується.	Якщо пробірку обережно струсити, то осад розчиняється.	Якщо пробірку обережно струсити, то осад частково розчиняється.		
Записують результати та висновки до кожної реакції.				

3. Осадження білків солями важких металів та органічними сполуками.

Реакції проводять згідно схеми наведеної у таблиці

Пробірка №1	Пробірка №2	Пробірка №3	Пробірка №4	Пробірка №5	Пробірка №6
В пробірку наливають 1-2 мл розчину білку	В пробірку наливають 1-2 мл розчину білку	В пробірку наливають 3 мл розчину білку	В пробірку наливають 1-2 мл розчину білку	В пробірку наливають 1-2 мл розчину білку	В пробірку наливають 1-2 мл розчину білку
Повільно, краплинами при струшуванні додають розчин сульфату міді $CuSO_4$	Повільно, краплинами при струшуванні додають розчин ацетату свинцю $Pb(CH_3COO)_2$	Додають 0,5 мл розчину сульфатної кислоти та 0,5 мл 10% розчину натрію вольфрамату	Додають трішки кристаліч-ного NaCl доливають поступово 5-6 мл етилового спирту.	Додають рівний об'єм насиченого водного розчину фенолу.	Додають рівний об'єм 40% розчину формальдегіду
Спостерігають за характером осаду. Записують результати та висновки до кожної проведеної реакції.					

1.4. Лабораторна робота № 3 «Визначення загального білку сироватки крові біуретовим методом»

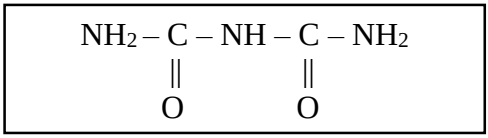
Мета і завдання лабораторної роботи: сформувати вміння кількісного визначення вмісту загального білку у сироватці крові колориметричним методом.

Принцип методу: Білок утворює з іонами міді (Cu^{2+}) у лужному середовищі комплекс (біуретова реакція), інтенсивність забарвлення якого прямо пропорційна концентрації загального білку у пробі та вимірюється фотометрично за довжини хвилі 540 (520-560) нм.

Біуретова реакція (реакція Піотровського) зумовлена наявністю в молекулах білків пептидних зв'язків. У лужному середовищі в присутності йонів двовалентної міді розчини білків і пептидів набувають фіолетового забарвлення з червоним або синім відтінком залежно від кількості пептидних зв'язків. У сильно лужному середовищі пептидні групи поліпептидних ланцюгів переходять в енольну форму, яка взаємодіє з йонами двовалентної міді й утворює забарвлений біуретовий комплекс.

Цю реакцію дають усі білки, а також пептиди, що містять не менше двох пептидних зв'язків. З ди- та трипептидами забарвлення нестійке. Біуретову реакцію дають також біурет, деякі амінокислоти (гістидин, серин, треонін, аспарагін) та інші сполуки при досить значній концентрації в розчині. Деякі кислоти, у яких пептидні зв'язки виникають за рахунок карбоксильної та амінної груп (аспарагін) дають біуретову

реакцію. Біурет, що дав назву цій реакції, утворюється при сплавленні двох молекул сечовини:



Для проведення визначення загального білку у сироватці крові біуретовою реакцією застосовується стандартний набір реагентів:

Реагент 1: розчин, що містить гідроксид натрію, 100 ммоль/л; калій-натрій виннокислий, 16 ммоль/л, сульфат міді, 6 ммоль/л, калію йодид, 15 ммоль/л.

Реагент 2: калібрувальний розчин альбуміну сироватки, 70 г/л у розчині 0,9% хлористого натрію та азиду натрію 0,095%.

Стандартний набір забезпечує лінійну область визначення концентрації загального білку у діапазоні від 10 до 150 г/л із чутливістю не більше 5 г/л.

Проведення аналізу

Компоненти реакційної суміші відбирають у кількостях, що наведені у таблиці.

Компонент суміші	Калібрувальна проба, мл	Контрольна (холоста) проба, мл	Дослідна проба, мл
Сироватка або плазма крові	-	-	0,1
Вода дистильована або фізіологічний розчин	-	0,1	-
Калібратор (реагент 2)	0,1	-	-
Реагент 1	4	4	4

Проби необхідно перемішати та інкубувати при температурі +37°С або за кімнатної температури (+ 18-25°С) протягом 10 хвилин. Потім вимірюють оптичну щільність дослідної та калібрувальної проби проти контрольної проби при довжині хвилі 540 нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 (або 5) мм. Колір розчину має бути стабільним протягом 60 хвилин.

Розрахунки: Вміст загального білку в сироватці крові визначають за формулою:

$$C = (E_д / E_к) \times К, \text{ де}$$

С – концентрація загального білку в пробі, що аналізується, г/л;

$E_д$ – оптична щільність дослідної проби, од.опт.щ.;

$E_к$ - оптична щільність калібратору, од.опт.щ.;

К – вміст білка у калібраторі, г/л.

Нормальні величини концентрації загального білку у сироватці або плазмі крові людини становлять 64-83 г/л.

Застереження: При роботі з сироваткою крові та реактивами необхідно працювати у гумових рукавичках. В реагенті 1 міститься луг, в реагенті 2 міститься азид натрію. При роботі з ними необхідно дотримуватись обережності і не допускати щоб реактиви потрапили на шкіру чи слизові оболонки.

1.5. Лабораторна робота № 4 «Визначення вмісту загального білка у молоці колориметричним методом»

Мета та завдання лабораторної роботи: сформувати вміння кількісного визначення загального білка цільного молока колориметричним методом.

Принцип методу: Метод заснований на здатності білків молока при pH нижче ізоелектричної точки зв'язувати кислий барвник – «Амідо чорний 10 Б», утворюючи з ним нерозчинний осад. Після видалення осаду вимірюють оптичну щільність вихідного розчину барвника порівняно з отриманим розчином. Оптична щільність зменшується пропорційно масової частки білка.

Приготування реактивів:

Буферного розчину: Зважують 31,70 г лимонної кислоти та 8,40 ортофосфату натрію двозаміщеного 12-ти водного. Реактиви вносять у колбу на 500 мл та додають 400 мл дистильованої води. Розчин нагрівають до температури 70°С перемішуючи до повного розчинення інгредієнтів, потім охолоджують до 20°С.

Приготування розчину барвника: Наважку барвника «Амідо черний 10 Б», масою 4,60 г вносять у колбу на 500 мл додають 200 мл дистильованої води. Розчин нагрівають до температури 70°С перемішуючи до повного розчинення, профільтровують крізь паперовий фільтр у колбу ємністю 2 л. Фільтр промивають водою до видалення слідів барвника. В цю ж колбу вносять розчин буферу. Вміст колби охолоджують до 20°С. Доливають водою до мітки 2 л та добре перемішують. pH розчину повинен бути 2,3±0,1 , якщо розчин має інший pH його корегують. Оптична щільність розчину розведеного у 50 разів

повинна становити 0,82±0,02 при довжині хвилі 590 нм в кюветі 10 мм. Якщо оптична щільність не відповідає цьому значенню його корегують або буферним розчином, або розчином барвника. Розчин слід використовувати тільки після 12 годинної експозиції. Розчин зберігають у холодильнику у склянці з темного скла.

Проведення аналізу:

До скляної пробірки відбирають 0,5 мл молока (цільного, не пастеризованого) додають 10 мл розчину барвника та ретельно перемішують (запобігаючи утворенню піни). Після цього пробірку центрифугують при 1500 об/хв 10 хвилин або при 1000 об/хв. 20 хвилин. 1мл супернатанту відбирають у колбу ємністю 50 мл та доливають водою до мітки. Аналогічно готують розчин барвника: у колбу на 50 мл відбирають 1 мл вихідного розчину барвника доливають до 50 мл водою. Вимірюють оптичну щільність дослідної проби молока проти розчину барвника.

Розрахунок результатів:

$C=7,78\ E_{д.} – 1,34$, де

$E_{д.}$ – оптична щільність дослідної проби молока;

7,78 – емпіричний коефіцієнт;

1,34 - емпіричний коефіцієнт.

Нормальні значення вмісту білку у цільному молоці 2,5-4,0% (±0,1%).

1.6. Лабораторна робота № 5 «Кількісне визначення гемоглобіну крові»

Мета і завдання лабораторної роботи: сформувати практичне вміння кількісного визначення гемоглобіну крові.

Гемоглобін − це складний білок, що складається з білкової частини та небілкового компоненту − гему, міститься в еритроцитах та переносить O_2 від легень до всіх тканин організму. Гемоглобін складається з 4 поліпептидних ланцюгів, двох α-ланцюгів та двох β-ланцюгів. Молекулярна маса білка 68 кДа. Атом заліза у гемі в нормі знаходиться у ферроформі (Fe^{+2}).

Принцип методу: гемоглобін в присутності окисника та ціанід аніонів утворює в водному розчині ціанметгемоглобін, забарвлення якого пропорційне концентрації гемоглобіну у крові. За допомогою цього методу можна визначити всі похідні гемоглобіну крім сульфогемоглобіну.

Гемоглобін окислюють в метгемоглобін гексаціанофератом (III) калію (червона кров'яна сіль); з ацетонціангідрином утворюється забарвлений ціанметгемоглобін (геміглобінціанід), який вимірюють колориметрично.

Для проведення визначення застосовується стандартний ***набір реагентів***: 1) трансформуючий розчин (ацетонціангідрин – 0,5 мг; червона кров'яна сіль – 0,2 г; натрію гідрокарбонат – 1 г; дистильована вода – до 1 л);

2) калібрувальний розчин геміглобінціаніду.

Проведення аналізу. В пробірку до 5 мл трансформуючого розчину обережно (запобігаючи утворенню піни) додають 0,02 мл крові (розведеної у 251 раз). Вміст

пробірки ретельно перемішують і залишають на 15 хвилин. Оптичну щільність вимірюють на ФК при довжині хвилі 540 (520-550 нм, зелений світофільтр), кювета з довжиною оптичного шляху 10 мм проти холостої проби (трансформуючий розчин). При тих же умовах вимірюють стандартний розчин.

Розрахунок. Вміст гемоглобіну в крові визначають за формулою:

$$C = (E_{д.} / E_{к.}) \times K, \text{ де}$$

С – концентрація гемоглобіну в пробі, що аналізується, г/л;
$E_{д.}$ – оптична щільність проби, що аналізується, од.опт.щ.;
$E_{к.}$ – оптична щільність калібратору, од.опт.щ.;
К – вміст гемоглобіну у калібраторі, г/л.

Нормальні величини вмісту гемоглобіну у крові:
Чоловіки: 132-173г/л; Жінки: 117-155г/л.

Застереження: При роботі з кров'ю та реактивами необхідно надівати гумові рукавички. При роботі з реактивами необхідно дотримуватись обережності і не допускати потрапляння реактивів на шкіру чи слизові оболонки.

1.7. Лабораторна робота № 6 «Визначення ізоелектричної точки казеїну та желатину»

Мета та завдання лабораторної роботи – сформувати вміння визначення ізоелектричної точки казеїну та желатину; опанувати поняття ізоелектричної точки білків.

В ізоелектричній точці (ІЕТ) білок нестабільний і легко випадає в осад, особливо в присутності дегідратуючих речовин (спирту, ацетону та ін.). Знаючи ІЕТ індивідуальних білків, можна підібрати сприятливі умови для осадження їх із біологічних рідин, тканинних екстрактів, що містять суміш різних білків, а також для одержання і очистки білкових препаратів.

Хід роботи:

1. Визначення ізоелектричної точки казеїну.

Готують буферні розчини з різними значеннями pH (див. таблиця 1). У шість пронумерованих пробірок вносять буферні розчини. До кожної пробірки

додають по 0,5 мл 0,1%- го розчину казеїну. Після цього суміш у пробірках збовтують і відзначають величину помутніння розчину (значення заносять до відповідної колонки таблиці). Потім у кожну пробірку додають по 2 мл 95% етилового спирту, збовтують і оцінюють ступінь помутніння знаками «плюс» або «мінус» : відсутність осаду (–), наявність його (+), значне помутніння — декількома плюсами (не більше трьох). Ізоелектричну точку казеїну визначають за максимальним ступенем помутніння.

Таблиця 1

Співвідношення компонентів реакційної суміші для визначення ізоелектричної точки казеїну

№ пробірки	Буферна суміш		pH суміші	Ступінь мутності	
	0,2 моль/л CH_3COOH, мл	0,2 моль/л CH_3COONa, мл		до додавання спирту	після додавання спирту
1	1,9	0,1	3,4		
2	1,8	0,2	3,8		
3	1,4	0,6	4,4		
4	1,0	1,0	4,7		
5	0,6	1,4	5,1		
6	0,2	1,8	5,7		

2. Визначення ізоелектичної точки желатину.

У 6 пробірок відповідно до таблиці 2 відміряють відповідний об‘єм в мл розчинів оцтової кислоти, натрію ацетату, дистильованої води і желатину. Вміст кожної пробірки перемішують. Потім в кожну пробірку повільно по стінці доливають по 2 мл 96% етилового спирту (або ацетону 95%). Через 30 хвилин визначають ізоелектричну точку. Вона буде відповідати pH пробірки із максимальним ступенем помутніння.

Таблиця 2

Співвідношення компонентів реакційної суміші для визначення pH під час визначення ізоелектричної точки желатину

№ пробірки	Дистил. вода	0,1 моль/л CH_3COOH	1 моль/л CH_3COOH	0,1 моль/л CH_3COONa	1% розчин желатину	pH
1	3,8	0,2	-	2,0	2,0	5,6
2	3,5	0,5	-	2,0	2,0	5,3
3	3,0	1,0	-	2,0	2,0	5,0
4	2,0	2,0	-	2,0	2,0	4,7
5	-	4,0	-	2,0	2,0	4,4
6	3,2	-	0,8	2,0	2,0	4,1

За допомогою фотоелектроколориметра виміряти каламутність приготованих розчинів желатину (коефіцієнти пропускання, τ). Дані внести в таблицю нижче.

№ пробірки	pH	Коефіцієнт пропускання, τ
1	5,6	
2	5,3	
3	5,0	
4	4,7	
5	4,4	
6	4,1	

Після закінчення вимірів побудувати криву залежності коефіцієнта пропускання від pH досліджуваних розчинів желатину та за мінімумом кривої визначити pH, що відповідає ізоелектричній точці желатину. Пояснити форму отриманої кривої.

1.8. Тестові завдання та задачі.

Рівень А. У наведених нижче тестових завданнях знайти одну правильну відповідь.

1. Нінгідринова реакція використовується для виявлення:

а) глюкози б) нуклеїнових кислот

в) α-амінокислот г) ацетил-СоА

2. Реакцію Фоля використовують для визначення:

а) цистеїну б) триптофану

в) гістидину г) метіоніну

3. Ксантопротеїнову реакцію можна використати для виявлення:

а) аспарагіну б) фенілаланін

в) цистеїну г) проліну

4. За допомогою реакції Адамкевича можна виявити:

а) цистеїн б) триптофан

в) треонін г) лізин

5. Яка сполука є амінокислотою:

а) лізин б) етаноламін

в) карнітин г) креатин

6. Амінокислотою, що містить Сульфур є:

а) пролін б) метіонін

в) глутамін г) триптофан.

7. Аліфатичною амінокислотою є:

а) фенілаланін б) триптофан

в) гістидин г) валін

8. Ароматичною амінокислото є:

а) аспарагінова амінокислота

б) лізин

в) тирозин г) ізолейцин

9. Діаміномонокарбоновою амінокислотою є:

а) лізин б) треонін

в) цистеїн г) валін

10. Моноамінодикарбоновою кислотою є

а) аланін б) глутамінова амінокислота

в) гліцин г) лейцин

11. Гетероциклічною амінокислотою є:

а) фенілаланін б) гістидин

в) аспарагін г) валін

12. Амінокислотою не є:

а) холін б) аланін

в) валін г) пролін

13. Для якого білка характерна β-складчаста структура поліпептидного ланцюга:

а) гемоглобіну б) казеїну молока

в) яєчного альбуміну г) фіброїну шовку

14. В процесі гідролізу білка:

а) зменшується кількість вільних -COOH груп

б) збільшується кількість вільних аміногруп

в) виділяється N_2

г) утворюються пептидні зв'язки

15. При утворенні первинної структури білків між амінокислотами утворюється зв'язки:

а) глікозидні б) іонні

в) гідрофобні г) пептидні

16. Третинний рівень організації білків, поміж інших зав'язків, стабілізується:

а) глікозидним б) пептидним

в) гідрофобним г) подвійним ковалентним

17. Який з перерахованих білків належить до простих:

а) гемоглобін б) казеїн

в) вітелін г) колаген

18. Який з перерахованих білків не належить до склеропротеїнів:

а) гліадин б) еластин

в) кератин г) колаген

19. Кератин є:

а) альбуміном б) протаміном

в) гістоном г) склеропротеїном

20. Який з зазначених білків належить до металопротеїдів:

а) ксантиноксидаза б) кератин

в) вітелін г) колаген

21. Від чого залежить здатність білку до розчинення у воді:

а) від кількості гідрофобних груп

б) від кількості гідрофільних груп

в) від кількості амінокислот

г) від кількості сульфурвмісних амінокислот.

22. До хромопротеїдів належить:

а) пероксидаза б) еластин

в) яєчний альбумін г) казеїн

23. До нуклеопротеїдів належить:

а) хроматин б) тубулін

в) колаген г) гепарин

24. Ізоелектрична точка білків це:

а) значення pH, за якого білок отримує позитивний заряд,

б) значення pH, за якого білок отримує негативний заряд,

в) значення pH, за якого білок стає електронейтральним,

г) сумарний заряд усіх бічних радикалів амінокислот.

25. В ізоелектричній точці білок:

а) має найменшу розчинність

б) має найбільший ступінь іонізації

в) денатурований

г) змін не зазнає.

26. Оптична активність не притаманна:

а) гліцину б) валіну

в) цистеїну г) триптофану

27. Які білки мають чітко визначену лужну реакцію:

а) глобуліни б) склеропротеїни

в) гістони г) альбуміни

28. Простетична група гемоглобіну зв'язана з білковою частиною через:

а) гістидин б) аспарагінову амінокислоту

в) тирозин г) лізин

29. Виберіть функцію, що не притаманна білкам:

а) каталітична б) транспортна

в) структурна г) теплоізолююча

30. Виберіть функцію, що не притаманна білкам тварин:

а) каталітична б) запасаюча

в) структурна г) транспортна

Рівень В. Розв'язати задачу.

1. З тканин мозку виділили поліпептид. Визначення його молекулярної маси показало орієнтовне значення 1200 Да. Обробка вихідного пептиду фтординітробензолом з наступним повним гідролізом та хроматографуванням отриманих продуктів дає вільні амінокислоти та динітрофеніл-лейцин. Частковий гідроліз поліпептиду бромціаном дозволив отримати наступні фрагменти: Arg-Gly-Val-Pro; Leu-Asn-Lis-Met; Pro-Gly-Ser-Met. Ферментативний гідроліз трипсином дав наступні фрагменти: Gly-Val-Pro; Leu-Asn-Lis; Met-Pro-Gly-Ser-Met-Arg. Визначте амінокислотну послідовність поліпептиду.

2. Із здорової мозкової тканини був виділений лей-енкефалін. Використовуючи наведену нижче інформацію визначте його амінокислотну послідовність. Повний кислотний гідроліз з наступним амінокислотним аналізом виявив наявність Gly, Leu, Phe, Tyr в молярному відношенні 2:1:1:1. Після обробки вихідного пептиду фтординітробензолом з наступним повним гідролізом і хроматографічним розділенням отриманих продуктів було отримано 2,4-динітрофенільне похідне тирозину. Вільний тирозин, при цьому, не визначався. Частковий ферментативний гідроліз за допомогою хімотрипсину дав Leu, Tyr та трипептид. Повний кислотний гідроліз трипептиду показав наявність Gly та Phe у співвідношенні 2:1.

3. Адренокортикотропний гормон людини – це поліпептид наступного складу: Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asp-Ala-Gly-Glu-Asp-Gln-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe. а) Скільки окремих амінокислот та пептидних фрагментів можна отримати, якщо обробити даний поліпептид трипсином? б) Скільки пептидних фрагментів можна отримати, якщо обробити даний поліпептид бромціаном? в) Скільки пептидних фрагментів можна отримати, якщо обробити даний поліпептид гідроксиламіном?

4. Визначити напрямок міграції – до катоду (-), до аноду (+), залишиться на старті (S) − поліпептиду наступного складу: Arg-His-Ile-Met-Asn-His-Lys за умов pH 7,0; pH 2,0; та pH 10,0.

5. Визначити напрямок міграції – до катоду (-), до аноду (+), залишиться на старті (S) − поліпептиду наступного складу: Ser-His-Glu-Met-Asp-Tyr-Lys за умов pH 7,0; pH 2,0; та pH 10,5.

6. Скільки заліза міститься в гемоглобіні (Hb) людини масою 80 кг? Вважатимемо, що об’єм крові складає 70 мл/кг, вміст гемоглобіну в крові 16 г/100 мл, а молекулярна маса Hb ≈ 66кДа.

7. Вміст міоглобіну у скелетних м’язах людини складає 8 г/кг. У кашалота – 80 г/кг. Скільки кисню зв’язується з міоглобіном м’язів людини (на 1 кг м’язів), а скільки з міоглобіном м’язів кашалоту? Припускаємо, що міоглобін насичений киснем, а його молекулярна маса ≈ 17,8 кДа.

8. Волосся людини росте доволі повільно, в середньому 18 см за рік. Ростові ділянки розташовуються біля основи волосини в клітинах епідермісу, де синтезуються α-кератинові нитки. Основним структурним елементом α-кератину є α-спіраль, крок якої складає 0,54 нм, а на один виток α-спіралі припадає 3,6 амінокислотних залишків. Розрахуйте швидкість утворення пептидних зв'язків у ланцюгах α-кератину (кількість утворення пептидних зав'язків за 1 с).

9. Добова потреба людини в L-триптофані складає 1,00 г. Розрахуйте масу серотоніну, що утворюється у здорових людей та людей, які страждають злоякісними новоутвореннями, якщо у першому випадку на це витрачається лише 1% триптофану, що міститься у їжі, а в другому випадку – 60%.

10. За даними кількісного амінокислотного аналізу сироватковий альбумін корови містить 0,58% (за вагою) триптофану (молекулярна маса 204). А) Розрахуйте мінімальну молекулярну масу сироваткового альбуміну корови; б) За даними досліджень, молекулярна маса нативного сироваткового альбуміну корови складає 70 кДа. Скільки залишків триптофану міститься у молекулі нативного сироваткового альбуміну корови?

РОЗДІЛ ІІ. ФЕРМЕНТИ

2.1. Загальні відомості

Ферменти (Е) – це білки, які виконують роль каталізаторів хімічних реакцій в живих організмах. Розділ біохімії, що займається вивченням ферментів наз. ензимологією. За хімічною природою Е поділяються на прості – протеїни, вони складаються лише з білка та складні – протеїди або холоферменти, вони містять білок та небілковий компонент. Білкова частина холоферменту називається апоферментом, небілкова – кофактром. В свою чергу кофактор може бути простетичною групою, якщо від приєднаний до білкової частини ковалентно, чи коферментом, якщо з'єднання не ковалентне.

У тривимірній структурі ферменту (простого чи складного білка) розрізняють ряд ділянок, що виконують певні функції. **Активний центр** ферменту – це місце в його просторовій структурі, яке забезпечує приєднання субстрату до ферменту і його хімічні перетворення. Активний центр простого ферменту складається із сукупності залишків радикалів амінокислот. До активного центру складного ферменту крім амінокислотних залишків можуть входити вітаміни, іони металів тощо. Активний центр визначає ***специфічність*** і ***каталітичну активність*** ферменту. Багато ферментів, особливо четвертинної структури (олігомерні ферменти), мають ще й регуляторні центри, які одержали назву алостеричних. **Алостеричний центр** являє собою ділянку, яка в молекулі

ферменту просторово віддалена від активного центру (з грецьк. allos – інший, чужий). До алостеричного центру можуть приєднуватися різні хімічні речовини, що отримали назву алостеричних ефекторів або модуляторів; при цьому вони змінюють просторову конформацію ферменту (третинну, четвертинну структуру), переводячи фермент в активну або неактивну форму, тобто сприяють або перешкоджають формуванню активного центру.

Ізоферменти – молекулярні форми ферментів, що характеризуються генетично зумовленими відмінностями первинної структури, набором і співвідношенням субодиниць та різною каталітичною активністю. Тобто це ферменти, що каталізують одні і ті ж самі реакції, але можуть відрізнятися амінокислотним складом та фізико-хімічними властивостями.

Найбільш характерною рисою ферментів є їх **специфічність дії**. Ферменти мають високу специфічність як по відношенню до реакцій, що ними каталізуються, так і по відношенню до субстратів. Фермент з абсолютною специфічністю каталізує лише одну ферментативну реакцію. Так, наприклад, ***трипсин*** – протеолітичний Е підшлункової залози, який розщеплює пептидний зв'язок, що утворений карбоксильними групами лише лізіну чи аргініну; ***тромбін*** – білок, що приймає участь у гемокоагуляції – розриває пептидний зв'язок, що утворений між аргініном та гліцином. Ферменти із груповою специфічністю каталізують типові перетворення схожих за будовою речовин (часто гомологів). Наприклад, триацилгліцеролліпаза здійснює гідроліз тригліцеридів до гліцерину та жирних кислот. Ліпаза розщеплює жири, що мають різні жирно-кислотні залишки. Ще

одним прикладом може бути Е – алкогольдегідрогеназа, що каталізує перетворення спиртів у альдегіди.

Ферменти мають величезне значення для життєдіяльності організму. Без них хімічні реакції йшли б повільно. При цьому фермент не викликає ніяких надприродних реакцій, термодинамічно вони можливі і без ферменту, але швидкість їх може бути незначною, і реакції затягуються на години, місяці, роки. Ферменти, завдяки вмісту різних функціональних груп білків і кофакторів, здатні здійснювати хімічні реакції на суттєво зниженому енергетичному рівні порівняно з іншими небіологічними каталізаторами. Завдяки ферментам хімічні реакції проходять не хаотично, а взаємопов'язано та взаємообумовлено.

Здійсненню ферментативної реакції передує формування фермент-субстратного комплексу (ES). При цьому субстрат (S) приєднується до ферменту (Е) не будь-де, а у строго специфічному місці, що має назву **активного центру ферменту**. По суті, специфічність каталітичної дії Е залежить від специфічності процесу зв’язування в активному центрі. Будова активного центру ферменту комплементарна будові субстрату. Цей феномен носить назву **субстратної специфічності**.

Низка ферментів синтезуються в організмі у вигляді неактивного попередника. Такі попередники мають назву **проферментів**. В активований стан такі Е можуть перейти у відповідному місці і у відповідний час. Прикладами таких ферментів можуть бути ферменти кишково-шлункового тракту.

Активність ферментів виражають в одиницях – **каталах** – це каталітична активність, яка здійснює хімічне

перетворення 1 молю субстрату за 1 секунду. Часто слово катал не використовують, а лише моль/с.

На активність Е впливає багато факторів – перш за все температура, а також pH, іонна сила розчину, наявність активаторів та інгібіторів.

Швидкість ферментативних реакцій, як і будь-яких інших реакцій залежить від температури, із підвищенням t на кожні 10°С швидкість реакції збільшується вдвічі (правило Вант-Гоффа). Але для ферментів це правило працює в обмеженому діапазоні температур (до 50-60°С). При більш високих t відбувається денатурація Е. При температурах 80-90°С більшість Е денатурує практично миттєво.

Зміни pH призводять до іонізації іоногенних груп в активному центрі Е, що впливає на спорідненість до нього субстрату та відповідно швидкість ферментативних реакцій. Оптимум pH для більшості Е лежить в діапазоні 6-8 одиниць.

Активатори ферментів – сполуки різноманітної природи, що здатні посилювати інтенсивність роботи Е, тобто активувати його.

Інгібітори ферментів викликають гальмування хімічних процесів. Гальмування може бути **оборотним чи необоротним**. ***Необоротне гальмування ферментів*** характеризується тим, що інгібітор міцно (ковалентно) зв'язується з ферментом і цей комплекс не розпадається, тобто певна ферментативна реакція не відбувається. Прикладом необоротної дії інгібіторів ферментів є дія отрути гриба Amanita phalloides – α-аманітін. Ця речовина інгібітор РНК-полімерази – ферменту що здійснює процес синтезу матричної РНК – першого етапу в процесі експресії генетичної інформації

(процес транскрипції). Зв'язування необоротне. Наслідки також.

При ***оборотному гальмуванні*** інгібітор утворює з Е слабкий комплекс, який має здатність розпадатись, в результаті чого Е вивільняється. Механізми дії інгібіторів досить різні, але у більшості випадків вони зводяться до двох типів: ***конкурентного*** або ***неконкурентного***. При конкурентному гальмуванні інгібітор має будову подібну до субстрату, тому між ними виникає конкуренція за Е. При неконкурентному гальмуванні інгібітор взаємодіє з важливими функціональними групами Е, але не в активному центрі, а в алостеричному центрі. Це призводить до конформаційних змін у будові Е і таким чином він втрачає свою активність. Також до неконкурентних належать інгібітори, які утворюють комплекс не з самим Е, а з фермент-субстратним комплексом. У цьому випадку збільшення концентрації субстрату не зменшує дію інгібітору.

В основу **класифікації ферментів** покладено принцип розподілу їх за типами хімічних реакцій, що вони каталізують. На цій основі усі Е поділяють на 6 класів:

1. ***Оксидоредуктази*** – каталізують окислювально-відновні реакції.

2. ***Трансферази*** – каталізують реакції перенесення окремих атомів і груп атомів від одних субстратів на інші.

3. ***Гідролази*** – каталізують гідролітичні реакції (тобто розщеплення за допомогою води).

4. ***Ліази*** – каталізують процеси відщеплення будь-яких груп не гідролітичним шляхом (з утворення подвійного зв'язку).

5. ***Ізомерази*** – каталізують процеси ізомеризації органічних сполук.

6. ***Лігази*** (або синтетази) каталізують реакції синтезу, що пов’язані з використання енергії АТФ.

У кожному класі є підкласи, що характеризують функціональні групи субстрату, на який діє даний фермент. Підкласи діляться на підпідкласи, які деталізують тип реакцій у кожному підкласі і визначаються акцепторами або типом сполук, на які діє фермент. Кожний фермент має свій шифр із чотиризначного числа, де перша цифра означає клас, друга – підклас, третя – підпідклас, а четверта цифра — порядковий номер ферменту в цьому підпідкласі. Наприклад, пепсин (за класифікацією ферментів – КФ) має класифікаційний номер – КФ 3.4.4.1, де 3 – клас: «гідролази»; 4 – підклас: «реакції гідролізу пептидного зв'язку білка»; 4 – підпідклас: «розрив пептидного зв'язку, утвореного ароматичними амінокислотами»; 1 – порядковий номер ферменту в цьому підпідкласі.

2.2. Лабораторна робота № 1 «Дослідження тирозинази»

Принцип методу. Тирозиназа (КФ 1.14.18.1) каталізує перетворення тирозину в меланін (пігмент чорного кольору). Проміжні продукти забарвлені в червоний колір.

Матеріали та реактиви для проведення досліду: препарат тирозинази (10 г подрібненої картоплі розтирають у ступці з 30 мл води й фільтрують крізь два шари марлі), насичений розчин тирозину.

Обладнання: фарфорова ступка з товкачиком, пробірки, піпетки, водяна баня, термостат (40 °С).

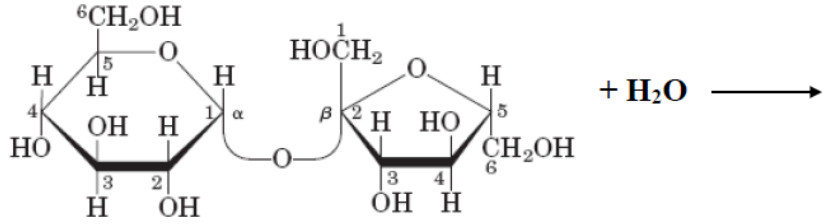
Хід роботи. У дві пробірки (досліджувана проба та контроль) наливають по 1 мл препарату тирозинази. Вміст контрольної пробірки кип'ятять 3 хв і охолоджують. Потім у кожну пробірку додають по 0,5 мл насиченого розчину тирозину й ставлять у термостат за температури 40 °С на 20 хвилин. Кожні 5 хв пробірки струшують.

У пробірці з активною тирозиназою рідина поступово забарвлюється у рожевий, бурий і червоний кольори. У контрольній пробірці зміни кольору не спостерігається.

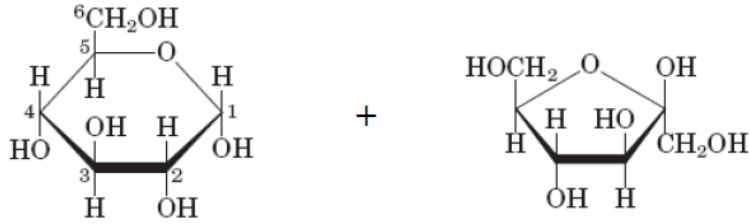
Після проведення досліду потрібно оформити протокол лабораторної роботи. Для цього одержані результати заносять до таблиці, роблять висновки.

2.3. Лабораторна робота № 2 « Дослідження сахарази»

Принцип методу. Сахараза (КФ 3.2.1.26) каталізує гідроліз сахарози до глюкози та фруктози. Глюкозу, що утворюється під час гідролізу, можна визначити за реакцією Фелінга.



Сахароза



Глюкоза **Фруктоза**

Матеріали та реактиви: препарат сахарази (5 г пивних дріжджів розтирають у фарфоровій ступці з 2-3 мл дистильованої води та невеликою кількістю скляного піску, додають 8-10 мл води та фільтрують крізь ватний фільтр), 2%-й розчин сахарози, реактив Фелінга, який складається з двох розчинів – перед використанням змішують рівні об'єми цих розчинів.

Обладнання: пробірки, піпетки, фарфорова ступка з товкачиком, лійки, термостат, водяна баня, газовий пальник.

Хід роботи. У дві пробірки (досліджувана проба та контрольна) наливають по 1 мл препарату ферменту. Вміст контрольної пробірки кип'ятять протягом 3 хв для руйнування сахарази, після чого в обидві охолоджені пробірки додають по 3 мл розчину сахарози, добре перемішують і ставлять у термостат за температури 38°С. Через 15 хвилин у пробірки вносять по 2 мл реактиву Фелінга, перемішують і нагрівають до кипіння.

У контрольній пробірці осаду немає, а в пробірці з активним ферментом (дослід) утворюється червоний осад.

Після проведення досліду потрібно оформити протокол лабораторної роботи. Для цього одержані результати заносять до таблиці, роблять висновки.

2.4. Лабораторна робота № 3 «Вивчення впливу фізико-хімічних факторів на активність ферментів (на прикладі α-амілаза слини)»

Принцип методу: В присутності α-амілази (КФ 3.2.1.1) крохмаль гідролізується до похідних (декстринів та мальтози), що не дають кольорової реакції із йодом. При взаємодії крохмалю з йодом утворюється забарвлений комплекс, оптична щільність якого за 640 нм пропорційна концентрації *негідролізованого* крохмалю. *Активність* α-амілази оцінюють за зменшенням інтенсивності забарвлення. Зміни інтенсивності забарвлення йод-крохмального комплексу пропорційні активності ферменту в дослідній пробі.

Швидкість розщеплення крохмалю під дією амілази залежить від температури та pH, й визначається за інтенсивністю забарвлення розчину крохмалю або продуктів його перетворення з йодом.

Матеріали та реактиви: субстратно-буферний розчин готують змішуванням буферу (pH 7,0 ± 0,1) і розчину крохмалю у співвідношенні 24:1. Субстратно-буферний розчин стабільний протягом 15 діб за температури 2-8°C; розчин йоду 0,01 N готують розведенням 0,1 N розчину йоду дистильованою водою в 10 разів (*розчин готують перед проведенням реакції*); розчин інгібітору (0,1 N хлоридної кислоти), фізіологічний розчин.

Обладнання: пробірки, піпетки, лійки, термостат, водяна баня, фотоколориметр або СФ.

Хід роботи. Для досліду беруть 4 пробірки: три для досліду і одну для холостої проби. Слину (попередньо розведену у 10 разів) розливають у три дослідні пробірки. ***Першу пробірку*** із 1-2 мл досліджуваного розчину слини

занурюють на 5 хвилин у водяну баню з температурою 70-80°С. Після цього проводять реакцію (див. таблицю нижче). Вимірюють оптичну щільність та розраховують активність ферменту α-амілази.

До ***другої пробірки*** із 1-2 мл досліджуваного зразка розчину слини додають 0,3-0,5 мл концентрованої хлоридної кислоти. Після цього проводять реакцію аналогічно схемі.

У ***третій пробірці*** залишається не дезактивований фермент. Зміни інтенсивності забарвлення йод-крохмального комплексу пропорційні активності ферменту в дослідній пробі.

За умов дезактивації α-амілази слини різними чинниками крохмаль не гідролізується до похідних та дає кольорову реакцію із йодом.

Схема проведення досліду

Компонент суміші	Холоста проба, мл	Дослідна проба 1 (після прогрівання), мл	Дослідна проба 2 (після додавання кислоти), мл	Дослідна проба (не дезакти-вований фермент), мл
Субстратно-буферний розчин	0,5	0,5	0,5	0,5
Інкубують 5 хвилин за 37°С.				
Розчин слини	-	0,01	0,01	0,01
Інкубують точно 5 хвилин за 37°С!!!				
Розчин хлоридної кислоти	4,5	4,5	4,5	4,5
Розчин йоду	0,05	0,05	0,05	0,05
Розчин слини	0,01	-	-	-

Оптичну густину проб: дослідних та холостої вимірюють окремо *проти дистильованої води* при 640 нм. Забарвлення стійке протягом 10 хвилин.

Розрахунок:

Активність Е в дослідних пробах розраховують:

$$А\ (мг/сек \cdot л) = (Е_{хол.} – Е_{досл.}) / Е_{хол.} \cdot 44{,}4 \cdot К,$$

де К – коефіцієнт розведення слини.

Результати проведених експериментів записують у висновках окремо.

2.5. Лабораторна робота № 4 « Визначення активності супероксиддисмутази»

Фермент супероксиддисмутаза (КФ1.15.1.11) – єдиний серед відомих антиоксидантних ферментів, який безпосередньо забезпечує обрив ланцюгів киснезалежних вільно-радикальних реакцій у клітинах аеробних організмів. Супероксиддисмутаза (СОД) здійснює рекомбінацію радикалів кисню (реакцію дисмутації, коли в одній і тій же реакції одна молекула супероксиду служить донором електрона, а інша – акцептором) з утворенням пероксиду водню та триплетного кисню.

$$0_2^- + 0_2^- + 2H^+ = H_20_2 + 0_2$$

Генерування радикалів супероксиду виникає за одноелектронного відновлення кисню ферментами у процесі транспорту електронів по дихальному ланцюгу мітохондрій та редокс-системі ендоплазматичного ретикулуму, а також за автоокиснення різних внутрішньоклітинних компонентів: NAD(P)H, глутатіону, флавінів, цитохрому с, аскорбінової кислоти, адреналіну та ін. Аніон-радикал кисню може окиснюватися та відновлюватися, перетворюватися у реакційноздатний синглетний кисень та гідроксильний радикал, який є ініціатором пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Активність супероксиддисмутази пов’язана з інтенсивністю пероксидного окиснення ліпідів.

Принцип методу: визначення активності ферменту базується на здатності супероксиддисмутази (СОД) конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії

відновленої форми NADH і присутності феназинметасульфату (ФМС). В результаті цієї реакції НСТ відновлюється з утворенням гідразинтетразолію. У присутності СОД відсоток відновлення НСТ зменшується.

Матеріали та реактиви: біологічний (рослинний) матеріал; 0,15 М фосфатний буфер (pH – 7,8); ***реагент 1:*** 57 мкМ нітросинього тетразолію (НСТ) та 16 мкМ феназинметасульфату (ФМС), що готується на 0,15 М фосфатному буфері із додавання ЕДТА (pH 7,8); ***реагент 2:*** 98,5 мкМ NADH на трис-ЕДТА буфер (pH – 8,0).

Обладнання: мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, лійка, паперові фільтри, бюкси, спектрофотометр, водяна баня.

Хід роботи. Визначення активності супероксиддисмутази здійснюють у клітинному лізаті, який отримують після 5-хвилинної обробки клітин (рослинна сировина чи тканини тварин) у гіпоосмотичному тріс-буфері та центрифугуванні за 3000 об/хвилину.

У пробу, що містить 0,15 М розчин фосфатного буферу додають аліквоту клітинного лізату, що містить 0,5 мг білка. Загальний об’єм проби 0,5 мл. До проби додають 1 мл реагенту 1 та відразу вимірюють оптичну густину проби за 540 нм.

Потім до проби додають 35 мкл реагенту 2, проби витримують за температури 30°С 10 хвилин та знову визначають оптичну густину за 540 нм.

Розраховують відсоток пригнічення ступеню відновлення НСТ у пробі:

$$((E_1\text{-}E_2) : E_2) \cdot 100 = \text{відсоток блокування реакції відновлення НСТ,}$$

де E_1 – оптична густина проби до додавання реагенту 2;

E_2 – оптична густина проби після додавання реагенту 2.

Активність ферменту визначають за калібрувальною кривою та виражають в умовних одиницях на хвилину на 1 мг білку.

Після проведення досліду потрібно оформити протокол лабораторної роботи, зробити висновки.

2.6. Лабораторна робота № 5 «Визначення активності каталази»

Принцип методу: Каталаза (КФ 1.11.1.6) розщеплює пероксид водню на воду та молекулярний кисень. Метод визначення активності каталази ґрунтується на визначенні кількості пероксиду водню, що залишилася після дії на нього каталази, титруванням розчину $KMnO_4$ у кислому середовищі. Активність каталази визначають титрометрично. Реакція відбувається за рівнянням:

$$2KMnO_4 + 5H_2O_2 + 3H_2SO_4 \rightarrow 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 8H_2O + 5O_2$$

Матеріали та реактиви: препарат каталази; 10 %-й розчин H_2SO_4; 1%-й розчин H_2O_2 на фосфатному буфері pH 7,0 (35,0 мл 0,2 моль/л Na_2HPO_4 і 13,6 мл 0,2 моль/л NaH_2PO_4); 0,1 н. розчин KMnO4.

Обладнання: мірні колби, бюретка, хімічні склянки, пробірки, піпетки, фарфорова ступка, кварцовий пісок, лійка, паперові фільтри, бюкси, центрифуга, термостат.

Хід роботи: Препарат каталази готується наступним чином: 20 г картоплі нарізають на шматочки, розтирають у фарфоровій ступці з невеликою кількістю кварцового піску, настоюють у 100 мл води протягом 30 хв і центрифугують.

В дві колби наливають по 5 мл препарату (центрифугату картоплі) каталази, в одну з них (контрольна проба) додають 3 мл розчину H_2SO_4. Потім в обидві колби вносять по 10 мл розчину пероксиду водню та ставлять у термостат за температури 37 °С. Через 30 хв у другу колбу (досліджувана проба) додають 3 мл H_2SO_4 і титрують вміст обох колб

(спочатку контрольної) розчином $KMnO_4$ до появи стійкого рожевого забарвлення від надлишку $KMnO_4$.

Про активність каталази судять за кількістю міліграмів пероксиду водню, що розщепився протягом 30 хв ферментом, що міститься в 1 г досліджуваного матеріалу.

Розрахунок:

Беремо до уваги, що 1 мл 0,1 н. розчину KMnO4 відповідає 1,7 мг H_2O_2. Активність каталази визначають за кількістю H_2O_2, що розклався, і розраховують за формулою:

$$A_к = \frac{(A - B) \times 1,7}{n}$$

де: $A_к$ – активність каталази;

А – кількість 0,1 н. розчину $KMnO_4$, яка витрачається на титрування контрольної проби, мл;

В – кількість 0,1 н. розчину $KMnO_4$ яка витрачається на титрування дослідної проби, мл;

n – наважка досліджуваного матеріалу в пробі, що титрується, г.

Після проведення досліду потрібно оформити протокол лабораторної роботи. Для цього одержані результати заносять до таблиці, роблять висновки.

2.7. Лабораторна робота № 6 «Визначення активності уреази»

У насінні та продуктах переробки сої міститься фермент уреаза (КФ 3.5.1.5), який розщеплює сечовину (карбамід) до амоніаку.

Принцип методу: З подрібненого рослинного матеріалу фосфатним буферним розчином екстрагують фермент уреазу. До ферменту додають субстрат − сечовину, яка розщеплюється з виділенням амоніаку. Наявність амоніаку змінює pH середовища у лужний діапазон значень. Розщеплення уреазою сечовини відбувається за реакцією:

$$CO(NH_2)_2 + H_2O = 2NH_3 + CO_2 ,$$
$$2NH_3 + 2NaH_2PO_4 = (NH_4)_2HPO_4 + Na_2HPO_4$$

Оскільки pH 1 % розчину Na_2HPO_4 за температури 20°С дорівнює 8,9, а NaH_2PO_4 − 6,4, тому активна кислотність зміщується у лужний діапазон. Активність уреази оцінюють за величиною зміни pH протягом 30 хв.

Матеріали та реактиви: сечовина; фосфатний буферний розчин pH 7,0 (61,2 $см^3$ 1/15 М розчин гідрофосфату натрію вносять у мірну колбу на 100 $см^3$ і доводять об'єм до мітки 1/15 М розчином дигідрофосфату калію); 1/15 М розчин гідрофосфату натрію (11,866 г $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ у 1 $дм^3$); 1/15 М розчин дигідрофосфату калію (9,073 г KH_2PO_4 у 1 $дм^3$).

Обладнання: ваги, подрібнювач лабораторний, струшувач-перемішувач лабораторний термостатований; конічні колби ємністю 200-250 $см^3$

Хід роботи: Соєвий шрот (або сою) ретельно подрібнюють і зважують близько 1 г на аналітичних вагах у конічній колбі. У колбу до наважки вносять 50,0 мл фосфатного буферного розчину (pH 7,0) і 1,5 г сечовини. Колбу ставлять у струшувач лабораторний і витримують за постійного перемішування 30 хвилин за температури 20-25 °С. Визначення pH середовища проводять за допомогою pH-метра. Активність уреази (А) характеризують зміною величини pH протягом 30 хв і визначають за формулою:

$$A = pH_2 - pH_1 \ ,$$

де pH_2 – значення pH суміші із рослинним матеріалом (шротом) після 30 хв. експозиції у струшувачі-перемішувачі;

pH_1 – значення pH фосфатного буферного розчину.

Роблять як мінімум 2 паралельні проби. Початкові дані та аналіз даних заносять у таблицю:

№ проби	Маса порож-ньої колби, г	Маса колби з наваж-кою, г	Наваж-ка, г	pH_1	pH_2	Розрахунок

Відхилення між двома паралельними визначеннями не мають перевищувати 0,05 pH.

2.8. Лабораторна робота № 7 «Визначення активності пероксидази»

Принцип методу: Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) каталізує окиснення багатьох органічних сполук: фенольні сполуки, цитохром с, нітрити, аскорбінова кислота, індоліламін, гідрохінони та їх аміни. Метод визначення активності пероксидази заснований на визначенні швидкості реакції окиснення бензидину до утворення продукту окиснення синього кольору.

Матеріали та реактиви: рослинний матеріал, ацетатний буфер (pH=5,4), дистильована вода, 1%-й розчин пероксиду водню, бензидин.

Обладнання: мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, фарфорова ступка, кварцовий пісок, лійка, паперові фільтри, бюкси, ФК, центрифуга, водяна баня, термометр.

Хід роботи: Наважку рослинного матеріалу масою 200-500 мг розтирають у фарфоровій ступці з водою або ацетатним буфером pH=5,4 і переносять у мірну колбу на 50 мл. Після 10 хв настоювання витяжку центрифугують за 4000 об/хв. Для визначення активності в дві кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм кожна наливають по 2 мл ферментативної витяжки (центрифугату), 2 мл буферного розчину та 2 мл бензидину. Вимірюють оптичну густину дослідних проб проти контрольної. Вимірювання проводять за довжини хвилі 590 нм. В контрольну кювету доливають 2 мл води, а в дослідну – 2 мл 0,3%-го пероксиду водню з піпетки з широким отвором. Після цього фіксують зміну оптичної густини через кожні 10 с протягом 60 с. Активність пероксидази визначають в одиницях оптичної густини на 1 г сирої маси досліджуваного матеріалу за хвилину.

2.9. Лабораторна робота № 8 «Визначення активності аланінамінотрансферази (АлТ) методом Райтмана-Френкеля»

Принцип методу: Внаслідок переамінування, яке відбувається під дією аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2), утворюється глютамінова та піровіноградна кислоти. При додаванні 2,4-динітрофенілгідразину ензиматичний процес зупиняється і в лужному середовищі утворюються забарвлений гідразон піровиноградної кислоти. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна активності ферменту.

Матеріали та реактиви: використовують стандартний набір реагентів до якого входить субстратно-буферний розчин pH 7,4; розчин 2,4-динітрофенілгідразину; 0,04 н NaOH.

Обладнання: пробірки лабораторні, піпетки 0,1; 1,0 та 5,0 мл, мірний циліндр ємністю 50 мл, мірна колба ємністю 500 мл, скляна банка ємністю не менше 500 мл, термостат для підтримання температури 37°С, фотометричне обладнання, довжина хвилі 505 (500-540 нм).

Хід роботи:

Компоненти реакційної суміші відбирають у кількостях, що наведені у таблиці.

Компонент суміші	Холоста проба, мл	Дослідна проба, мл
Субстратно-буферний розчин, pH 7,4±0,2	0,5	0,5
Інкубують 5 хвилин за 37°С		
Сироватка	-	0,1
Інкубують 60 хвилин за 37°С		
2,4-динітрофенілгідразин (2,4-ДНФГ)	0,5	0,5
Сироватка	0,1	-
Витримують 20 хвилин за кімнатної температури		
Гідроксид натрію	5,0	5,0
Витримують 10 хвилин за кімнатної температури. Після додавання 2,4-ДНФГ у деяких пробах можливо утворення осаду, який розчиниться при наступному додаванні гідроксиду натрію. Вимірюють оптичну густину дослідної проби проти холостої проби. Забарвлення стійке 1 годину.		

Для розрахунку активності ферменту використовують калібрувальний графік.

Нормальні величини: Активність АлТ у сироватці крові 0,10-0,68 мкмоль/год.мл

2.10. Тестові завдання та задачі.

Рівень А. У наведених нижче тестових завданнях знайти одну правильну відповідь.

1. За хімічною природою ферменти це:

а) вуглеводи б) ліпіди

в) карбонові кислоти г) білки

2. Холоферментами називають структуру, що містить:

а) білкову частину та небілковий компонент

б) лише білкову частину

в) вуглеводний та ліпідний компоненти

г) білкову частину та нуклеотидні компоненти

3. Ділянка молекули ферменту, що відповідає за з'єднання з речовиною, яка піддається каталізу та за здійснення ферментативного каталізу носить назву:

а) алостеричний центр ферменту

б) активний центр ферменту

в) субстратний центр ферменту

г) каталітичний центр ферменту

4. Під дією якого ферменту розщеплюються білки у шлунку:

а) пепсиногену б) хімотрипсину

в) карбоксипептидази г) пепсину.

5. Під дією якого ферменту розщеплюються білки та поліпептиди в кишківнику:

а) пепсиногену б) трипсину

в) холестеролестерази г) α-амілази

6. Який фермент не міститься у слині:

а) β-амілаза б) лізоцим

в) γ-амілаза г) α-амілаза

7. До класу оксидоредуктаз належить:

а) пепсин б) аланін-тРНК синтетаза

в) алкогольдегідрогеназа г) аденілатциклаза

8. До класу гідролаз належить:

а) сахараза б) аланін-тРНК синтетаза

в) алкогольдегідрогеназа г) аланінамінотрансфераза

9. Простетичною групою ферментів аланінамінотрансферази (АлТ) та аспартамамінотрансферази (АсТ) є:

а) тіамінпірофосфат б) рибофлавін фосфат

в) піридоксальфосфат г) піримідин

10. Пантотенова кислота є складовою:

а) ліпоєвої кислоти б) глутатіона

в) тіамінпірофосфата г) Со-А

11. Вітамін B_2 є частиною коферменту:

а) Со-А б) біотину

в) НАД г) ФМН

12. Вітамін нікотинамід є частиною коферменту:

а) Со-А б) біотину

в) НАД г) ФМН

13. Пепсин проявляє оптимальну активність за pH:

а) 1,5-2,5 б) 4-5

в) 6-7 г) 8-9

14. Абсолютну специфічність до субстрату виявляє:

а) карбоксипептидаза б) алкогольдегідрогеназа

в) уреаза г) лізоцим

15. У хворих на пелагру порушуються певні реакції обміну речовин внаслідок зниження синтезу коферментів. Синтез якого коферменту, необхідного для біосинтезу ліпідів, порушений при цьому захворюванні?

а) Со-А б) ФМН

в) ФАД г) НАДФ

16. Частина реакцій перетворення амінокислот (реакції трансамінування, декарбоксилювання) пов'язані із коферментом:

а) тіамінпірофосфатом б) біотином

в) нікотинаміддинуклеотидом г) піридоксальфосфатом

17. Реакцію, що відбувається згідно даного (спрощеного) рівняння

$$2H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$ каталізує:

а) каталаза б) пероксидаза

в) оксидаза г) монооксигеназа

18. Яку назву мають сполуки, що каталізують одні і ті ж самі реакції, але мають різні фізико-хімічні властивості:

а) холоферменти б) апоферменти

в) ізоферменти г) коферменти

19. Простетичною групою родопсину – рецепторного білку сітківки ока є:

а) рибофлавін б) кальциферол

в) токоферол г) ретиналь

20. Що з перерахованого не приймає участі у окислювальному декарбоксилуванні піровиноградної кислоти:

а) рибофлавін б) пантотенова кислота

в) тіамінпірофосфат г) ретиналь

21. Активність ферменту визначають в:

а) км/год б) мкмоль/хв в) г/л г) кг/моль

22. Число обертів ферменту це:

а) число молекул субстрату, що перетворюються в одиницю часу в розрахунку на 1 молекулу ферменту

б) така маса субстрату, що перетворюються в одиницю часу в розрахунку на 1 молекулу ферменту

в) число молекул субстрату, що перетворюються в одиницю часу 1 молем ферменту

г) така маса субстрату, що перетворюються в одиницю часу 1 молем ферменту.

23. Ферменти лігази синтезують реакції:

а) гідролізу

б) окиснення-відновлення

в) перенесення функціональних груп з одного субстрата на інший

г) синтезу

24. Ферменти трансферази синтезують реакції:

а) гідролізу,

б) окиснення-відновлення

в) перенесення функціональних груп з одного субстрата на інший

г) синтезу.

25. Константа Міхаеліса ($К_М$) це:

а) максимальна швидкість ферментативної реакції

б) максимальна концентрація субстрату

в) концентрація субстрату за якої швидкість ферментативної реакції дорівнює половині максимальної

г) концентрація субстрату за якої швидкість ферментативної реакції є максимальною.

26. Тромбін здійснює специфічний протеоліз за місцем розташування пептидного зв'язку між:

а) аргініном−гліцином б) агрініном−валіном

в) гліцином−аргініном г) валіном−аргініном

27. Трипсин здійснює специфічний протеоліз за місцем розташування пептидного зв'язку з боку карбоксильної групи:

а) Phe,Tyr б) Arg, Ala

в) Lis, Trp г) Arg, Lis

28. Гальмування ферментів може бути:

а) оборотним та кінцевим

б) прямим та необоротним

в) оборотним та необоротним

г) легким та важким

29. Оборотне гальмування ферментів поділяється на:

а) конкурентне і неконкурентне

б) прибуткове та неприбуткове

в) повне та неповне

г) легке та важке.

30. Класифікація ферментів здійснюється за:

а) бажанням дослідника

б) типами хімічних реакцій, що вони каталізують

в) типами продуктів, що утворюються

г) за абеткою

Рівень В. Розв'язати задачу.

1. Розрахуйте молекулярну масу дигідрооротатдегідрогенази до складу якої входить 2 атоми заліза, якщо відомо, що вміст останнього становить 0,18%.

2. До складу сукцинатдегідрогенази входить 8 атомів заліза, що становить 0,22%. Розрахуйте молекулярну масу ферменту.

3. Активність аланін-амінотрансферази визначають колориметрично за кількістю динітрофенілгідразону піровиноградної кислоти, що утворюється в реакції переамінування α-кетоглутароваї кислоти та аланіну. Розрахуйте активність Е (аланін-амінотрансферази) у вихідному розчині, якщо відомо, що інкубацію проводили протягом 30 хвилин з 1 мл розведеного у 50 разів розчину Е. Отримали динітрофенілгідразону у кількості, що відповідає 44 мг піровіногадної кислоти.

4. Кількість перекису водню, що розпався під дією каталази відповідає 14,7 мл 0,1н. розчину калій перманганату. Витяжка каталази взята для досліду у кількості 20 мл і була виготовлена із 0,25 г моркви. Дослід тривав протягом 30 хвилин. Визначте активність ферменту, що міститься в 1 г моркви.

5. а) За якої концентрації субстрату [S] фермент, що має максимальну швидкість перетворення субстрату 30 мкмоль / хв · мг, а величина $К_м$ (константи Міхаеліса) дорівнює 0,008 М, буде працювати зі швидкістю ¼ максимальної? Визначте, яку частку V_{max} буде складати швидкість реакції, якщо концентрація субстрату буде дорівнювати: б) ½ $К_м$; в) 2 $К_м$; г) 10 $К_м$.

6. Велика кількість ферментів необоротно гальмуються йонами важких металів. Часто це відбувається за рахунок взаємодії важких металів з сульфгідрильними групами, що знаходяться в активному центрі ферменту, з утворенням меркаптидів.

$$E{-}SH + Ag^+ \rightarrow E{-}S{-}Ag + H^+$$

До 10 мл розчину, що містить 1мг/мл чистого ферменту, додали таку кількість $AgNO_3$, якої було достатньо для повної інактивації ферменту. Для цього знадобилося 0,342 мкмоля $AgNO_3$. Розрахуйте мінімальну молекулярну масу фермента. Чому отримане значення молекулярної маси, отримане таким шляхом буде мінімальним?

7. Карбоангідраза еритроцитів (з молекулярною масою 30 кДа) – один з активніших ферментів. Цей фермент каталізує оборотну реакцію гідратації CO_2:

$$H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3$$

Розрахуйте число оборотів карбоангібрази, якщо за оптимальних умов 10 мкг чистої карбоангідрази каталізують гідратацію 0,3 г CO_2 за 1 хвилину за 37°С.

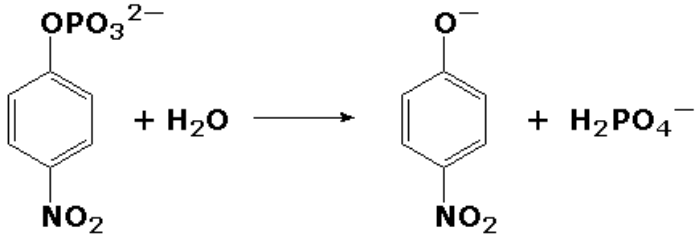
8. Цистеїндесульфгідразна реакція за допомогою Е, що був виділений з печінки, нирок та підшлункової залози ссавців можлива з цистином, цистеїном, гомоцистеїном та цистотіаніном. За даними дослідів з використанням ^{35}S в випадку цистеїна вона означається наступним рівнянням:

$$\text{Цистеїн} + H_2O \rightarrow \text{піруват} + H_2S + NH_3$$

Визначте, масу утвореного амоніаку та сірководню, якщо відомо, що розпаду зазнало 242 мг цистеїну, при цьому цистеїндесульфгідразна реакція зупинилась після виділення сірководню в об'ємі, що дорівнює 45% від теоретичного виходу.

9. Визначте питому активність а) піруваткінази (M_r =237 000), б) цитохрому с-редуктази (M_r =75 000), в) бутирил-СоА-дегідрогенази (M_r =200 000), якщо значення їхньої молекулярної активності становлять $6 \cdot 10^5$; $1{,}3 \cdot 10^4$; $2 \cdot 10^5$ відповідно.

10. Під час визначення активності кислої фосфатази вимірюють кількість п-нітрофенолу, що утворюється під час ферментативного гідролізу п-нітрофенілфосфату:



Розрахуйте активність кислої фосфатази у вихідному розчині, якщо відомо, що в результаті утворилося 214 мкмоль п-нітрофенолу, при цьому інкубацію вели з 1 мл розведеного в 100 разів екстракту ферменту протягом 30 хвилин за 37°С.

ЛІТЕРАТУРА

1. Albert L. Lehninger, Devid L. Nelson. Principles of biochemistry. Cox. – 2005. – 1119 p.

2. György Hegyi, József Kardos, Mihály Kovács, András Málnási-Csizmadia, László Nyitray. Introduction to Practical Biochemistry. Eötvös Loránd University. – 2013. – 211 p.

3. Robert K. Delong, Qiongqiong Zhou. Introductory Experiments on Biomolecules and their Interactions. – 2016. – 110 p.

4. Павлоцька Л., Дуденко Н., Димитриевич Л. Біологічна хімія. К.: Університетська книга. – 2021. – 379 с.

5. Столяр О.Б. Біологічна хімія. К.: КНТ. – 2020. – 369 с.

6. Явоненко О. Біохімія. К.: Університетська книга. – 2019. – 380 с.

7. Зіменковський Б., Музиченко В., Ніженковська І. Біологічна і біоорганічна хімія. К.: Медицина. – 2017. – 272 с.

8. Лабораторний практикум з курсу «Біохімія». – К: КНУ ім. Шевченка. – 2009. – 28 с.

9. Біохімія. Методичні вказівки з виконання лабораторних робіт. – Чернігів: ЧНТУ. – 2013. – 113 с.

10. Practical Manual of Biochemistry G. Sattanathan, S.S. Padmapriya, B. Balamuralikrishnan. Skyfox Publishing Group. Skyfox Press. – 2020. – 117 p.

ВІДПОВІДІ ДО ТЕСТІВ ТА ЗАДАЧ РОЗДІЛУ І

Рівень А:

1) **в**; 2) **а**; 3) **б**; 4) **б**; 5) **а**; 6) **б**; 7) **г**; 8) **в**; 9) **а**; 10) **б**; 11) **б**; 12) **а**; 13) **г**; 14) **б**; 15) **г**; 16) **в**; 17) **г**; 18) **а**; 19) **г**; 20) **а**; 21) **б**; 22) **а**; 23) **а**; 24) **в**; 25) **а**; 26) **а**; 27) **в**; 28) **а**; 29) **г**; 30) **б**.

Рівень В:

1) Leu-Asn-Lis-Met-Pro-Gly-Ser-Met- Arg-Gly-Val-Pro;

2) Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu;

3) а) – 5 окремих амінокислот та 3 пептиди, разом 8 фрагментів; б) 2 окремі пептиди; в) 0;

4) а) до катоду; б) до катоду; в) залишиться на старті;

5) а) до катоду; б) до катоду; в) до аноду.

6) близько 3 гр заліза;

7) у людини $1{,}44 \cdot 10^{-2}$ г/O_2 на кг м’язів; у кашалота 0,144 г/O_2 на кг м’язів;

8) ≈38,58 пептидних зав’язків за секунду;

9) 8,6 мг у здорових та 516 мг у хворих;

10) а) 32 100 г/моль; б) 2

ВІДПОВІДІ ДО ТЕСТІВ ТА ЗАДАЧ РОЗДІЛУ ІІ

Рівень А:

1) **г**; 2) **а**; 3) **б**; 4) **г**; 5) **б**; 6) **а**; 7) **в**; 8) **а**; 9) **в**; 10) **г**; 11) **г**; 12) **в**; 13) **а**; 14) **в**; 15) **а**; 16) **г**; 17) **а**; 18) **в**; 19) **г**; 20) **г**; 21) **б**; 22) **а**; 23) **г**; 24) **в**; 25) **в**; 26) **а**; 27) **г**; 28) **в**; 29) **а**; 30) **б**.

Рівень В:

1) 62 200;

2) ~ 200 000 Д;

3) 833 мкмоль/хв. на 1 мл;

4) Витяжка каталази з 1 гр моркви здатна перетворити 99,96 мг (≈ 100 мг) H_2O_2, що відповідає активності каталази 1,225 мкмоль/хв мл;

5) а) $2{,}7 \cdot 10^3$ М; б) 0,33; в) 0,67; г) 0,91.

6) 29000 Д; Припускаємо, що кожна молекула ферменту містить одну сульфгідрильну групу, що здатна титруватися.

7) 2,0 х 10^7 обертів/хв;

8) 15,3 мг амоніаку та 30,6 мг сірководню;

9) а) $1{,}25 \cdot 10^6$; б) $0{,}925 \cdot 10^4$; в) $1{,}35 \cdot 10^4$;

10) $713 \cdot 10^{-6}$ мкмоль/хв мл