

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ В.О. СУХОМЛИНСЬКОГО
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ХІМІЇ ТА БІОХІМІЇ**

Ларичева О.М., Цвях О.О.

**ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ З БІОЛОГІЧНОЇ ХІМІЇ
ЧАСТИНА II**

**для студентів
біологічного факультету
галузі знань 0401 Природничі науки
напряму підготовки 6.040102 Біологія, 6.040102 Біологія*
освітньо-кваліфікаційного рівня «бакалавр»**

Миколаїв – 2016 р.

Навчально-методичний посібник ухвалений
вченою радою біологічного факультету
Миколаївського національного університету
імені В.О. Сухомлинського
протокол № 5 від «16» листопада 2016 р.

Рецензенти:

Ющишина Г.М. – кандидат хімічних наук, доцент, доцент кафедри хімії та біохімії Миколаївського національного університету імені В.О. Сухомлинського

Укладачі:

Ларичева О.М. – старший викладач кафедри хімії та біохімії (Миколаївський національний університет імені В.О. Сухомлинського).

Цвях О.О. – викладач кафедри хімії та біохімії (Миколаївський національний університет імені В.О. Сухомлинського).

Навчально-методичний посібник «Лабораторний практикум з біологічної хімії. Частина II» для студентів біологічного факультету. – Миколаїв: 2016. – 47 с.

Ó Кафедра хімії та біохімії Миколаївського національного університету імені В.О. Сухомлинського

ВСТУП

Цей посібник включає лабораторні роботи з основних тем курсу біохімії. Основною метою розробників посібника є закріплення теоретичних знань, формування практичних вмінь та навичок та розуміння цілісної картини щодо складу, будови, властивостей сполук, що входять до складу живих організмів та їх обміну.

Лабораторні заняття охоплюють такі теми статичної біохімії: «Вуглеводи», «Ліпіди», «Амінокислоти. Білки», «Нуклеїнові кислоти», «Вітаміни», «Ферменти» та «Гормони», а також теми динамічної біохімії: «Обмін вуглеводів», «Обмін ліпідів», «Обмін білків та окремих амінокислот», «Обмін нуклеїнових кислот», «Обмін біоелементів».

Кожна лабораторна робота включає перелік обладнання, матеріалів і реактивів, що необхідні для виконання дослідів. Також включає принцип методу, та алгоритм виконання дослідів. Наприкінці кожної лабораторної роботи наведений перелік питань, які дають змогу зробити висновки по кожній роботі, узагальнити пройдений матеріал. В посібнику приділяється увага основним методам біохімічних досліджень: седиментації, оптичним та електрохімічним методам, різним видам хроматографії, радіоімунним методам, ПЛР.

ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ РОБОЧОГО ЖУРНАЛУ

1. На титульному листі журналу мають бути написані назва дисципліни, прізвище та ім'я студента, номер групи.
2. На початку кожного протоколу записується тема заняття і дата його проведення.
3. Усі спостереження і висновки з експериментальних робіт оформляються у вигляді таблиці на розвороті аркуша і містять такі графи: назва роботи, перелік застосованих реактивів; результати експериментальної роботи; хімізм реакцій; висновки і практичне значення роботи.
4. Наприкінці заняття робочий журнал здається викладачеві на підпис.

ФЕРМЕНТИ

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ № 1

ТЕМА: Хімічна природа ферментів. Механізм дії ферментів

А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Ферменти, як біологічні каталізатори, загальна характеристика.
2. Хімічна природа ферментів. Прості і складні ферменти.
3. Класифікація коферментів і простетичних груп.
4. Активний центр ферментів: будова, властивості функції.
5. Механізм дії ферментів.
6. Кінетика ферментативних реакцій.
7. Основні властивості ферментів: термолабільність, залежність активності ферментів від рН середовища, специфічність.
8. Активність ферментів і фактори, які впливають на активність ферментів. Вплив концентрації субстрату і ферменту на швидкість ферментативних реакцій.
9. Активація й інгібування ферментів.
10. Регуляція активності ферментів.

Б. Лабораторний практикум

Дослід 1. Відкриття амілази в слині. Гідроліз крохмалю під дією амілази слини

Обладнання, матеріали і реактиви: водяна баня, пластинка порцелянова, лійка скляна, колба конічна на 100 мл: циліндр мірний з носиком на 50 мл; склянки лабораторні на 100 мл (2 шт.), клейстер крохмальний (1%-ний), йод (1%-ний) у йодиді калію (3%-ному), фелінгова рідина.

Приготування розведеної слини. Рот обполіскують 2–3 рази водою для видалення залишків їжі. Відміряють циліндром 50 мл дистильованої води й обполіскують нею рот протягом 3–5 хв. у кілька прийомів. Зібрану рідину (приблизно 50–60 мл) фільтрують через вату і фільтрат використовують для роботи.

У дві пробірки наливають по 5 мл крохмального клейстеру й в одну з них – 5 мл води, а в іншу – 5 мл розчину слини. Обидві пробірки зі скляними паличками, зануреними в них, одночасно поміщають у водяну баню при 40°C. Через 1 хв. від кожної суміші відбирають за допомогою скляної палички по краплі рідини і змішують їх окремо з краплею йоду, задалегідь нанесеної на пластинку. Повторюють узяття проб через 2, 4, 6 і 8 хв. Забарвлення з йодом проб із пробірки, що містить слину, змінюється від синього до синьо-фіолетового, буро-червоного, червоного і, нарешті, жовтого.

До вмісту пробірки зі слиною додають 1–2 мл фелінгової рідини і суміш нагрівають до початку кипіння. Утворюється червоний осад оксиду міді (I) за рахунок відновлення гідроксиду міді (II) мальтозою і низькомолекулярними декстринами, що утворилися. Контрольна проба в тих же умовах не відновлює гідроксид міді (II) в оксид міді (I).

Дослід 2. Вплив температури на активність амілази слини

Обладнання, матеріали і реактиви: водяна баня, термометр лабораторний, піпетки 1 мл, 2 мл, палички скляні, пластинка порцелянова, слина розведена (пригот. див. вище), крохмаль (1%-ний), йод (0,3%-ний) у йодиді калію (3%-ному), гідроксид натрію (10%-ний), сульфат міді (1%-ний).

У чотири пронумеровані пробірки наливають по 2 мл 1%-ного розчину крохмалю. Пробірку 1 поміщають у киплячу водяну баню, пробірку 2 – у водяну баню при 40°C, пробірку 3 залишають при кімнатній температурі і пробірку 4 поміщають у лід. Через 10 хв., коли вміст пробірок набуде заданої температури, в усі пробірки додають по 0,5 мл розведеної в 10 разів слини, перемішують за допомогою скляної палички і залишають у тих же умовах. Спостереження за ходом гідролізу крохмалю ведуть по реакції з йодом. Для цього наносять на порцелянову пластинку кілька крапель розчину йоду в йодиді калію і змішують їх із краплями суміші з кожної пробірки, беручи проби через 1, 2, 4, 6, 8, 10 і 12 хв. За зміною забарвлення крохмалю з йодом судять про ступінь гідролізу крохмалю в кожній пробірці. Результати спостережень заносять у таблицю, позначаючи буквою “с” (синє забарвлення) позитивну пробу з йодом на крохмаль, буквою “ч” – позитивну пробу на декстрини (забарвлення червоних тонів) і буквою “ж” – негативну пробу (жовте забарвлення йоду). На підставі отриманих даних зробіть висновок про величину температурного оптимуму для амілази слини.

№ пробірки	t, °C	Реакція з йодом після закінчення часу (хв.)						
		1	2	4	6	8	10	12
1	100							
2	40							
3	15 – 20							
4	0							

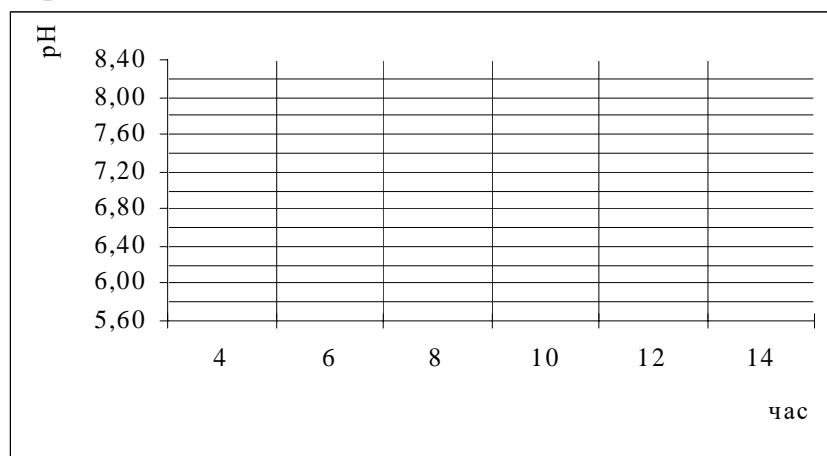
Дослід 3. Вплив рН середовища на активність ферментів

Обладнання, матеріали і реактиви: водяна баня, термометр лабораторний, пластинка порцелянова, бюретки прямі з краном на 50 мл (2 шт.), піпетки з однією міткою на 1 мл (2 шт.), палички скляні (4 шт.), слина розведена, дигідрофосфат калію $1/15M$ і гідрофосфат натрію $1/15M$, крохмаль (0,5%-ний), йод (0,3%-ний) у йодиді калію (3%-ному).

Серії розчинів з визначеними значеннями рН одержують, використовуючи фосфатний буфер. Дві бюретки заповнюють $1/15M$ розчином дигідрофосфату натрію і $1/15M$ розчином гідрофосфату калію. Розчини змішують у визначених співвідношеннях таким чином, що в кожній пробірці одержують по 5 мл буферної суміші з величинами рН: 5,59; 6,98; 7,38; 8,04. У кожному з чотирьох пробірок додають по 1 мл 0,5%-ного розчину крохмалю, 1 мл розведеної в 10 разів слини і ретельно перемішують вміст за допомогою скляної палички. Далі всі пробірки, не виймаючи з них скляних паличок, поміщають у водяну баню, нагріту до 40°C. Через 3–5 хв. із усіх пробірок паличками наносять на порцелянову пластинку по краплі суміші, поруч з попередньо вже нанесеними на неї краплями розчину йоду. Краплі з'єднують і, якщо спостерігається розходження у забарвленні з йодом у дослідних

пробах, пробірки виймають з бані, охолоджують і додають у кожну по 3–4 краплі розчину йоду в йодиді калію. При відсутності помітного розходження у забарвленні проб з йодом на порцеляновій пластинці продовжують нагрівання пробірок у водяній бані ще кілька хвилин, а потім знову випробують на пластинці проби на ступінь розщеплення крохмалю. Цю операцію повторюють доти, поки не відбудеться помітних зрушень у забарвленні проб з йодом.

Продовжують інкубацію всіх проб у присутності доданого йоду і для кожної з них відзначають час, коли зникне синє забарвлення (закінчення амілолітичного розщеплення). Отримані результати виражають графічно: по осі абсцис наносять значення рН дослідів, а по осі ордината – час розщеплення крохмалю при відповідних значеннях рН. З'єднуючи крапки лінією, одержують криву, яка характеризує залежність активності ферменту від значення рН середовища.



САМОСТІЙНА РОБОТА № 1 Будова ферментів

Заповнити таблицю:

Назва кофактору	Будова кофактору	Біологічна роль	До складу яких ферментів входить	Приклади ферментативних реакцій

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ № 2

ТЕМА: Класифікація ферментів

А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Ізоферменти.
2. Мультимолекулярні ферментні системи.
3. Визначення активності ферментів.
4. Внутрішньоклітинна локалізація ферментів.
5. Класифікація ферментів.
6. Номенклатура ферментів.
7. Імобілізовані ферменти.

8. Використання ферментів і ферментних препаратів.

Б. Лабораторний практикум

Дослід 1. Відкриття пероксидази (донор: H_2O_2 –оксидоредуктаза; КФ 1.11.1.7) у картоплі

Обладнання, матеріали і реактиви: терка, сира картопля, пірогалол (1%-ний); пероксид водню (2%-ний).

Картоплю натирають на терці. Невелику її кількість, не віджимаючи, переносять у пробірку, додають 1–2 мл 1 %-ного розчину пірогалолу і 1–2 краплі 2%-ного розчину пероксиду водню. При стоянні випадає жовто-бурий осад пурпурогаліну. Багаторазове дегідрування (окислення) пірогалолу і ряду проміжних продуктів на шляху до пурпурогаліну здійснюється за участю пероксидази, яка щоразу передає зняті атоми водню на пероксид водню.

Дослід 2. Відкриття тирозинази (о-дифенол: O_2 –оксидоредуктаза; КФ 1.10.3.1) у картоплі

Обладнання, матеріали і реактиви: водяна баня, терка, воронка Бюхнера з зовнішнім діаметром 100 мм, піпетка з однією міткою на 1 мл, марля, картопля сира, тирозин (насич.).

Картоплю натирають на терці, віджимають через кілька шарів марлі й отриманий екстракт негайно фільтрують на воронці Бюхнера. У пробірку наливають 1 мл екстракту, 2–3 краплі розчину тирозину, перемішують і поміщають пробірку у водяну баню, нагріту до 40°C. Час від часу пробірку струшують для кращого зіткнення рідини в пробірці з повітрям. Забарвлення суміші стає рожево-червоним, потім бурим і через 1–2 години чорним, тому що під дією тирозинази (монофенолоксидази) тирозин перетворюється через забарвлені в червоний колір проміжні продукти в чорний азотовмісний пігмент – меланін.

САМОСТІЙНА РОБОТА № 2

Класифікація ферментів

Користуючись підручником Я.І. Гонського «Біохімія людини», заповнити таблицю:

№	Клас	Загальна характеристика	Схеми реакцій, що каталізуються
1.	Оксидоредуктази		
2.	Трансферази		
3.	Гідролази		
4.	Ліази		
5.	Ізомерази		
6.	Лігази (синтетази)		

**ОБМІН РЕЧОВИН І ЕНЕРГІЇ. БІОЛОГІЧНЕ ОКИСЛЕННЯ.
ОКИСЛЮВАЛЬНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ.
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3**

ТЕМА: Загальні уявлення про обмін речовин. Біологічне окиснення

А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Поняття про обмін речовин і енергії. Загальні шляхи катаболізму біомолекул.
2. Метаболічні шляхи.
3. Катаболізм і анаболізм.
4. Регуляція обміну речовин.
5. Енергетичний баланс організму. Вільна енергія.
6. Основні етапи вивільнення енергії.
7. Амфіболічні шляхи метаболізму.
8. Макроергічні сполуки. Будова АТФ та її значення.
9. Історія розвитку вчення про біологічне окиснення (роботи М.О. Баха, В.І. Палладіна та ін.).
10. Сучасні уявлення про біологічне окиснення. Основні поняття: окисно-відновні реакції, окиснення, відновлення, окисник, відновник, відновлювальні еквіваленти, біологічне окиснення, тканинне дихання, дихальний ланцюг, окисно-відновний потенціал.

11. Ферменти та коферменти дихального ланцюга. Структура комплексів дихального ланцюга (I, II, III, IV), їх склад та значення.

Б. Лабораторний практикум

Дослід 1. Виділення препарату цитохромів та цитохромоксидази

Обладнання, матеріали і реактиви: свіжа м'язова тканина, дистильована вода, штатив з пробірками, ножиці, ступки, лійки, фільтри, скляний або кварцевий пісок, терези з набором різноважок.

Хід роботи. 5 г свіжої м'язової тканини звільнити від жиру і добре подрібнити ножицями. Подрібнену тканину гомогенізувати в фарфоровій ступці при поступовому додаванні чотирикратного об'єму дистильованої води до утворення гомогенної маси (для кращої гомогенізації можна використати кварцевий пісок).

Одержаний гомогенат профільтрувати через марлю складену вдвоє. Осад, що залишився на фільтрі, який містить цитохромоксидазу, комплекс цитохромів та інші дегідрогенази, промити водою до отримання прозорої рідини, після чого розділити його на три частини. Першу частину використати для відновлення цитохрому с, а дві інші – для проведення якісної реакції на цитохромоксидазу (для виявлення цитохромоксидазної активності).

Дати відповіді на запитання

1. Записати схему транспорту електронів по цитохромній системі.
2. Яку окисно-відновну реакцію забезпечує цитохром с?

Дослід 2. Відновлення цитохрому с.

Цитохром с – важливий компонент дихального ланцюга, який

забезпечує транспорт протонних еквівалентів (електронів) на ділянці дихального ланцюга між цитохромами в і а. За хімічною природою він є складним білком, до складу якого в вигляді простетичної групи входить похідне протопорфірину IX, що містить іони Феруму, здатні змінювати ступінь окиснення і переходити із окисненої у відновлену форму. Цим зумовлена участь цитохрому с у процесах біологічного окиснення.

Принцип методу. Аскорбінова кислота відновлює цитохром с, внаслідок чого окислюється до дегідроаскорбінової. Після відновлення цитохрому с колір розчину змінюється, що можна виявити візуально.

Матеріал для дослідження: препарат цитохрому с або 100 мг% розчин цитохрому с.

Реактиви: 0,5М розчин аскорбінової кислоти.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр.

Хід роботи. У пробірку, з одержаним у попередній роботі препаратом цитохрому с або 100 мг% розчином цитохрому с, додати 2 мл 0,5М розчину аскорбінової кислоти, спостерігати за зміною забарвлення.

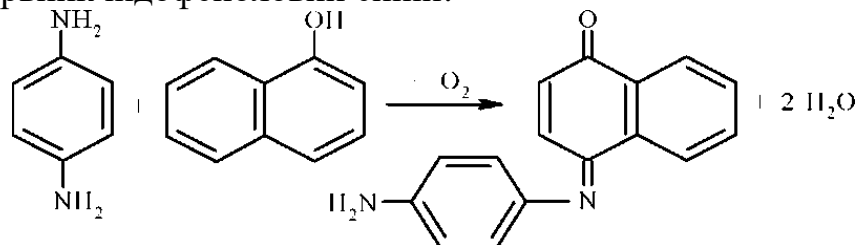
Дати відповіді на запитання

1. Яке значення має здатність цитохрому с переходити з окисненої у відновлену форму?
2. У чому подібність і відмінність у будові та функціях цитохромів і гемоглобіну?
3. Які компоненти цитохромної системи безпосередньо контактують з цитохромом с? Записати будову цитохромної системи.

Дослід 3. Якісна реакція на цитохромоксидазу

Цитохромоксидаза (цитохром аа₃) – фермент, який завершує дихальний ланцюг, переносить два електрони, зняті з цитохрому а, безпосередньо на кисень. За хімічною природою цитохромоксидаза – це складний білок, до складу простетичної групи якого, крім іонів Феруму, входять іони Купруму.

Принцип методу. Цитохромоксидаза здатна окиснювати не лише цитохроми, але і деякі органічні сполуки, зокрема, реактив НАДІ, що містить п-фенілендіамін та α-нафтол, при взаємодії яких за присутності кисню утворюється барвник індофеноловий синій:



p-Фенілендіамін

α-Нафтол

Індофеноловий синій

Обладнання, матеріали і реактиви: препарат цитохромоксидази (з досліді 1), дистильована вода, реактив НАДІ, штатив з пробірками, мірний циліндр, скляні палички, спиртівка

Хід роботи. У дві пробірки з препаратом цитохромоксидази додати по 1 мл води та добре перемішати. Вміст першої (контрольної) пробірки прокип'ятити на спиртівці протягом 2-3 хв. Після охолодження в кожну з них внести по 2 мл реактиву НАДІ та перемішати. Спостерігати за зміною

зabarвлення.

Дати відповіді на запитання

1. Записати хімізм реакцій, що відбуваються на завершальному етапі тканинного дихання, пояснити їх значення.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4

ТЕМА: Окислювальне фосфорилування. Мікросомальне окиснення

А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Фосфорилуюче окиснення, його види.
2. Основні положення хеміосмотичної теорії Мітчелла. Генерація $\Delta\mu_{H^+}$
3. Коефіцієнт окисного фосфорилування P/O, та його значення.
4. Роз'єднувачі окисного фосфорилування та тканинного дихання.
5. Мікросомальні електронотранспортні ланцюги. Характеристика та значення цитохрому P₄₅₀, індукція монооксигеназ.
6. Метаболізм супероксид-радикала.

Б. Лабораторний практикум

Дослід 1. Дослідження процесу фосфорилуючого окиснення

Обладнання, матеріали і реактиви: суспензія мітохондрій, інкубаційна суміш, АДФ, розчин субстрату (0,3М розчини ізоцитрату, малату, сукцинату, глутамінової кислоти (pH...7,4)), 10% розчин ТХА, 2,5% розчин амоній молібдату, 0,3М розчин аскорбінової кислоти в 0,1н розчині хлоридної кислоти, дистильована вода, штатив з пробірками, піпетки на 1 мл, мірний циліндр, лійки, фільтри, термостат.

Хід роботи. У дві пробірки внести по 1 мл інкубаційної суміші і 0,02 мл АДФ. У першу (дослідну) пробірку додати 0,5 мл субстрату та 0,5 мл суспензії мітохондрій, а у другу (контрольну) – 0,5 мл води і 0,5 мл суспензії мітохондрій. Вміст пробірок перемішати та поставити в термостат при 37°C на 15 хв. У кожен пробірку додати по 0,1 мл 10% розчину ТХА (для припинення реакції) і профільтрувати через складчастий фільтр.

У фільтратах визначити фосфатну кислоту: до фільтрату додати по 2 мл 2,5% розчину амоній молібдату і 0,5 мл розчину аскорбінової кислоти в 0,1н розчині хлоридної кислоти. Спостерігати за зміною забарвлення.

Дати відповіді на запитання

1. Яке визначення процесу фосфорилуючого окиснення?
2. Дати визначення понять: «фосфорилуюче окиснення на рівні субстрату», «фосфорилуюче окиснення на рівні електронно-транспортного ланцюга».
3. Вказати основні шляхи утворення АТФ у гетеротрофних організмів.

Вправи:

1. Записати хімізм реакцій окиснення субстратів за участю НАД⁺ та ФАД-залежних дегідрогеназ, цитохромної системи.
2. Записати схему перенесення протонних еквівалентів від субстрату,

що окиснюється, до кінцевого акцептора.

3. Записати будову універсального акумулятора, донора та трансформатора енергії в організмі. Пояснити участь сполуки в енергообміні.

4. Записати механізм окиснення субстрату за участю: а) піридин-протеїнів (ІДІ); б) флавінпротеїнів (ФП); в) убіхінонів (УХ); г) цитохромної системи.

5. Записати будову кофакторів, які входять до складу ферментних систем дихального ланцюга.

6. Записати будову кофакторів первинних і вторинних дегідрогеназ.

7. Записати кінцеві продукти біологічного окиснення субстрату:

а) при перенесенні гідрогену на кисень за участю усіх компонентів дихального ланцюга;

б) безпосередньо на кисень.

Вказати ферменти, що каталізують ці процеси.

8. Записати повну схему перенесення електронів і протонів від молочної кислоти до кінцевого акцептора (O_2).

9. Записати повну схему окиснення субстрату в системі дихального ланцюга. Вказати ділянки спряження окиснення і фосфорилювання, якщо в якості первинної дегідрогенази виступають: а) ЛК; б) ПП; в) ФП.

10. Навести приклади фосфорилюючого окиснення на рівні субстрату. Записати хімізм.

ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5

ТЕМА: Перетравлювання та всмоктування вуглеводів. Обмін глікогену

А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

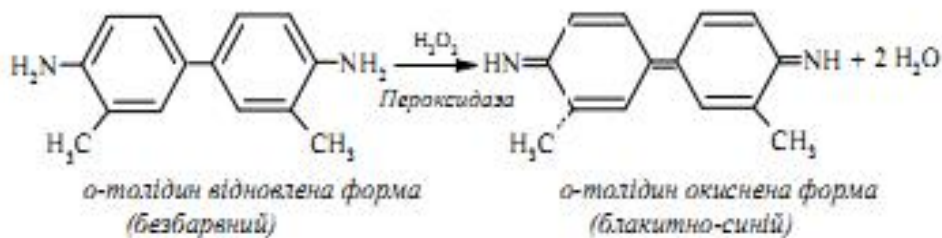
1. Вуглеводи, їх функції.
2. Вміст вуглеводів у продуктах харчування. Рекомендовані норми добової потреби організму в вуглеводах залежно від віку, виду діяльності людини, фізичного навантаження і кліматичних умов.
3. Перетравлювання, його види.
4. Перетравлювання вуглеводів в ротовій порожнині. Слина, її склад.
5. Перетравлювання вуглеводів у шлунку.
6. Перетравлювання вуглеводів в тонкій кишці.
7. Всмоктування вуглеводів.
8. Порушення перетравлювання та всмоктування вуглеводів.
9. Транспорт глюкози із крові в клітини.
10. Метаболізм моносахаридів в клітині (проміжний обмін). Роль реакції фосфорилювання в активації моносахаридів. Ферменти, які забезпечують проміжний обмін вуглеводів.
11. Особливості будови молекули глікогену. Резервування глікогену, фізіологічне значення цього процесу.

12. Біосинтез глікогену (глікогенез).
13. Гліконеогенез. Ланцюг, що починається з пірвіноградної кислоти.
14. Ланцюг, що починається з щавелевооцтової кислоти.
15. Ланцюг, що починається з глікогену.
16. Розпад глікогену (глікогеноліз).

Б. Лабораторний практикум

Дослід 1. Глюкозооксидазний метод визначення вмісту глюкози у крові, сироватці крові, спинальній рідині.

Принцип методу. Фермент глюкозооксидаза окиснює глюкозу з утворенням глюконової кислоти і гідроген пероксиду, який окиснює о-толідин, внаслідок чого утворюється сполука блакитно-синього кольору:



Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації глюкози в розчині та визначається колориметрично.

Метод високоспецифічний і чутливий. Дає змогу визначати вміст глюкози від 0,2 до 4,0 г/л.

Обладнання, матеріали і реактиви: кров, сироватка крові, спинальна рідина, стандартний розчин глюкози (1 г/л), ізотонічний розчин натрій хлориду, 5% розчин цинк сульфату, 0,3М розчин натрій гідроксиду, ензимохромогенний реактив, дистильована вода, штатив з пробірками, центрифужні пробірки, піпетки на 1 і 5 мл, центрифуга, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи. У центрифужну пробірку внести 0,1 мл крові (сироватки крові, спинальної рідини) і 1,1 мл ізотонічного розчину натрій хлориду, перемішати. Додати 0,4 мл 5% розчину цинк сульфату та 0,4 мл 0,3М розчину натрій гідроксиду. Суміш ретельно перемішати і через 10 хв. відцентрифугувати при 2500 об./хв. протягом 10 хв.

Взяти три пробірки: в першу (дослідну) внести 1 мл центрифугату, у другу (стандартну) - 1 мл стандартного розчину глюкози, у третю (контрольну) - 1 мл води. В кожен пробірку додати по 3 мл ензимохромогенного реактиву, перемішати.

Через 20 хв. (!) визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту глюкози в біоматеріалі провести за формулою:

$$C_{\text{д.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{д.}}}{E_{\text{ст.}}}, \text{ де}$$

$C_{\text{д}}$ – вміст глюкози в дослідній пробі (ммоль/л);

$C_{ст}$ – вміст глюкози у стандартній пробі (мМоль/л);

E_d – екстинкція дослідної проби;

$E_{ст}$ – екстинкція стандартної проби;

У цільній крові практично здорових людей вміст глюкози складає 3,32-5,55 мМоль/л, а у плазмі – 3,32-6,10 мМоль/л. Сеча практично здорових людей містить сліди глюкози. В добовому об'ємі сечі може міститися до 125-130 мг глюкози.

Дати відповіді на запитання

1. Дати визначення поняття «цукор крові» та «істинна глюкоза крові».
2. Назвати основні шляхи поповнення вмісту глюкози у крові.
3. Записати схему циклу Корі.
4. Роль печінки в регуляції вмісту цукру у крові.

Зауваження

1. Цільну кров необхідно досліджувати відразу після відбирання. При зберіганні крові концентрація глюкози в ній швидко зменшується внаслідок гліколізу (швидкість зниження 7% за годину). Запобігти цьому можна внесенням у пробу натрій фториду.

2. Не слід залишати кров невідцентрифугованою більше ніж на 30 хв.

3. Сироватку, яку зберігали тривалий час, не бажано використовувати для аналізу.

4. У сироватці крові чи плазмі концентрація глюкози стабільна при температурі 2-8 °С протягом 3 діб (72 год.).

5. Концентрація глюкози не знижується при стабілізації ТХА.

6. За 3 доби до проведення аналізу необхідно виключити вживання аскорбінової кислоти та антибіотиків тетрациклінового ряду.

7. Якщо після кип'ятіння вміст пробірок став непрозорим, проби слід відцентрифугувати протягом 10 хв. і визначити екстинкцію центрифугату.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №6

ТЕМА: Анаеробне розщеплення вуглеводів

А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Основні шляхи перетворення вуглеводів до кінцевих продуктів. Анаеробний шлях обміну вуглеводів.

2. Гліколіз і глікогеноліз, характеристика ферментів. Енергетичний ефект та баланс цих процесів.

3. Стадії гліколізу (глікогенолізу).

4. Хімізм спиртового бродіння, характеристика ферментів, енергетичний ефект.

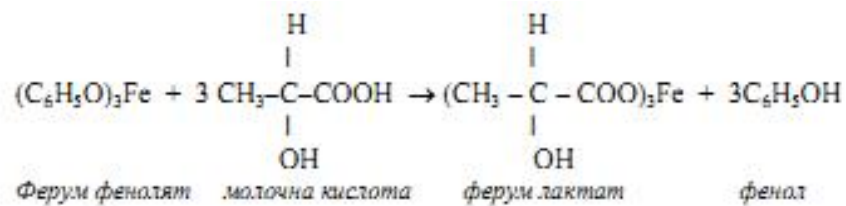
5. Апотомічний (пентозний) цикл перетворення вуглеводів, характеристика ферментів. Енергетичний ефект.

Б. Лабораторний практикум.

Дослід 1. Визначення вмісту молочної кислоти в м'язовій тканині методом Уффельмана

Принцип методу. Ферум фенолят (реактив Уффельмана) при взаємодії

з молочною кислотою утворює ферум лактат жовто-зеленого кольору, інтенсивність якого пропорційна вмісту молочної кислоти і визначається колориметрично:



Обладнання, матеріали і реактиви: свіжа м'язова тканина, 1% розчин фенолу, 1% розчин ферум (III) хлориду, стандартний розчин літій лактату (100 мг%), дистильована вода, фарфорова ступка, ножиці, марля, штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, конічні колби, водяна баня, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм, терези з набором різноважок.

Хід роботи. 2 г подрібнених м'язів гомогенізувати з 5 мл дистильованої води і профільтрувати через марлю, складену вдвоє. Фільтрат поставити на киплячу водяну баню на 1 хв. та повторно профільтрувати.

У три пробірки внести по 5 мл 1% розчину фенолу і по краплях 1% розчин ферум (III) хлориду до утворення фіолетового забарвлення. Після цього в першу (дослідну) пробірку додати 1 мл фільтрату, у другу (стандартну) - 1 мл стандартного розчину літій лактату, у третю (контрольну) - 1 мл води.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (синій світлофільтр, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту молочної кислоти провести за формулою:

$$C_{\text{д.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{д.}}}{E_{\text{ст.}}}, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – вміст молочної кислоти в дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст молочної кислоти у стандартній пробі (мг%);

$E_{\text{д.}}$ – екстинкція дослідної проби;

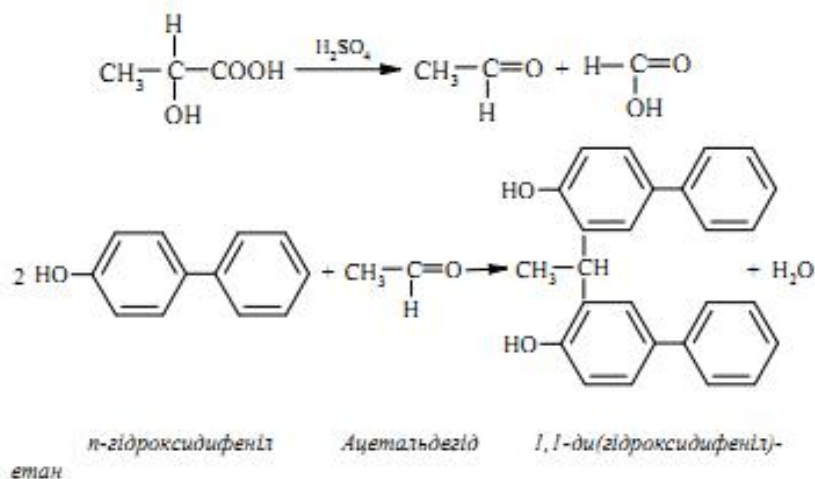
$E_{\text{ст.}}$ – екстинкція стандартної проби.

Дати відповіді на запитання

1. Записати схему утворення молочної кислоти з глюкози.
2. За який умов вміст молочної кислоти в м'язовій тканині значно зростає?
3. Розрахувати енергетичний ефект перетворення за схемою: глюкозо-6-фосфат → молочна кислота.

Дослід 2. Визначення вмісту молочної кислоти у крові (за Баркером і Саммерсоном)

Принцип методу. Молочна кислота при кип'ятінні з концентрованою сульфатною кислотою розкладається з утворенням мурашиної кислоти і ацетальдегіду, який з *n*-гідроксидифенілом утворює продукт конденсації фіолетового кольору, інтенсивність якого пропорційна вмісту молочної кислоти і визначається колориметрично:



Обладнання, матеріали і реактиви: кров, 10% розчин ТХА, 20% розчин купрум (II) сульфату, кальцій гідроксид, стандартний розчин літій лактату (100 мг%), концентрована сульфатна кислота, лужний розчин *n*-гідрокси-дифенілу, дистильована вода, штатив з пробірками, піпетки на 1 і 5 мл, центрифужні пробірки, водяна і крижана бані, термостат, центрифуга, терези з набором різноважок, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи. У центрифужну пробірку внести 0,5 мл дистильованої води, 0,1 мл крові і 1 мл 10% розчину ТХА та відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 5 хв.

Центрифугат перенести в чисту центрифужну пробірку, додати 0,5 мл насиченого розчину купрум (II) сульфату і 0,5 г кальцій гідроксиду, перемішати до появи блакитного забарвлення (якщо забарвлення зеленувате, то пробу далі не обробляти), залишити на 30 хв. для осадження вуглеводів, осад відцентрифугувати.

Приготувати три чисті пробірки: в першу (дослідну) внести 1 мл центрифугату, у другу (стандартну) - 1 мл стандартного розчину літій лактату, у третю – 1 мл води. В кожену пробірку при охолодженні обережно, по стінках, додати по 3 мл концентрованої сульфатної кислоти, перемішати і поставити на киплячу водяну баню на 5 хв. Після цього пробірки охолодити, додати по 1 краплі лужного розчину *n*-гідрокси-дифенілу та поставити в термостат при 30°C на 30 хв., помішуючи суміш до розчинення осаду, що утворився.

Після появи блакитного забарвлення пробірки поставити на киплячу водяну баню на 90 с. (!).

Після охолодження визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно сульфатної кислоти.

Розрахунок вмісту молочної кислоти у крові провести за формулою:

$$C_{\text{д.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{д.}}}{E_{\text{ст.}}}, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – вміст молочної кислоти в дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст молочної кислоти у стандартній пробі (мг%);

$E_{\text{д.}}$ – екстинкція дослідної проби;

$E_{\text{ст.}}$ – екстинкція стандартної проби.

Дати відповіді на запитання

1. Яку назву має процес перетворення глюкози до молочної кислоти? Які його особливості та енергетичний баланс і ефект?
2. Записати схему циклу Корі. Пояснити його значення.
3. Пояснити принцип методу визначення вмісту молочної кислоти.

Дослід 3. Визначення вмісту молочної кислоти у крові з гідрохіноном (за Бюхнером)

Принцип методу. Молочна кислота при кип'ятінні з концентрованою сульфатною кислотою розкладається з утворенням ацетангідриду, який з гідрохіноном утворює продукт конденсації червоно-коричневого кольору, інтенсивність якого пропорційна вмісту молочної кислоти і визначається колориметрично.

Обладнання, матеріали і реактиви: кров, 5% розчин метафосфатної кислоти, 25% розчин купрум (II) сульфату, кальцій гідроксид (порошок), стандартний розчин літій лактату (100 мг%), концентрована сульфатна кислота, 20% спиртовий розчин гідрохінону, центрифужні пробірки, пробірки з притертими пробками, піпетки на 1 і 5 мл, скляні палички, водяна баня, центрифуга, терези з набором різноважок, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи. У центрифужну пробірку внести 1 мл крові і 6 мл води та додати 1 мл 5% розчину метафосфатної кислоти, перемішати і через кілька хвилин відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 5 хв.

Центрифугат перенести у чисту центрифужну пробірку, додати 1 мл 25% розчину купрум (II) сульфату та 0,5 г кальцій гідроксиду, ретельно перемішати скляною паличкою до появи синього забарвлення і залишити на 30 хв. для осадження вуглеводів, осад відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 3 хв.

Взяти дві пробірки з притертими пробками: в одну (дослідну) внести 1 мл прозорого центрифугату, у другу (стандартну) - 1 мл стандартного розчину літій лактату. В кожну пробірку додати по 0,1 мл 25% розчину купрум (II) сульфату і 4 мл концентрованої сульфатної кислоти. Поставити на киплячу водяну баню на 1,5 хв. Після охолодження додати по 0,1 мл 20% спиртового розчину гідрохінону, ретельно перемішати та поставити на киплячу водяну баню на 15 хв.

Після охолодження визначити екстинкцію дослідної і стандартної проби на ФЕК (синій світлофільтр, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно сульфатної кислоти.

Розрахунок вмісту молочної кислоти провести за формулою:

$$C_{д.} = \frac{C_{ст.} \cdot E_{д.}}{E_{ст.}}, \text{ де}$$

$C_{д.}$ – вміст молочної кислоти в дослідній пробі (мг%);

$C_{ст.}$ – вміст молочної кислоти у стандартній пробі (мг%);

$E_{д.}$ – екстинкція дослідної проби;

$E_{ст.}$ – екстинкція стандартної проби.

Вміст молочної кислоти у крові практично здорових людей складає:

0,56-1,67 мМоль/л в венозній крові, 0,33-0,78 мМоль/л в артеріальній.

Дати відповіді на запитання

1. Записати схему перетворень: глікоген → молочна кислота.
2. Пояснити значення глікогенолізу для організму.
3. Записати хімізм реакцій фосфоролізу глікогену, охарактеризувати ферменти.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №7

ТЕМА: Аеробне перетворення вуглеводів

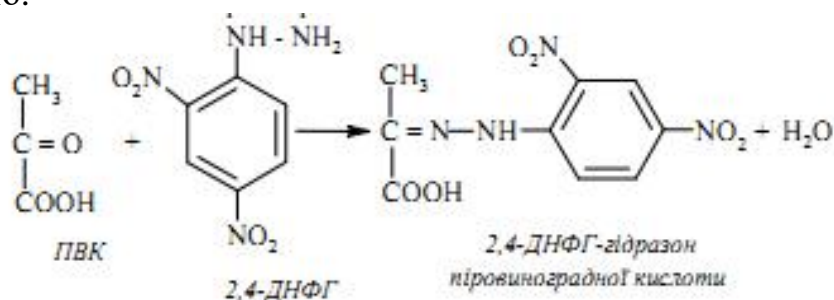
А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Дихотомічний та апотомічний шляхи розкладу, їх співвідношення в організмі.
2. Аеробний шлях обміну вуглеводів, характеристика ферментів.
3. Хімізм окиснення пірвіноградної кислоти до кінцевих продуктів (окиснювальне декарбоксілювання ПВК).
4. Цикл трикарбонових кислот, характеристика ферментів, енергетичний ефект.
5. Співвідношення між анаеробним та аеробним процесами перетворення вуглеводів в організмі (ефект Кребтрі і Пастера).
6. Кінцевий обмін вуглеводів.

Б. Лабораторний практикум.

Дослід 1. Визначення вмісту пірвіноградної кислоти у крові та сечі (модифікований метод Умбрайта)

Принцип методу. Пірвіноградна кислота в кислому середовищі при дії 2,4-динітрофенілгідразину осаджується в вигляді 2,4-динітрофенілгідразону пірвіноградної кислоти, який з лугом утворює сполуку червоно-коричневого кольору. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації пірвіноградної кислоти і визначається колориметрично.



Обладнання, матеріали і реактиви: сеча, кров, стандартний розчин натрій пірвату (5 мг%), 0,1% розчин ДНФГ, 12% розчин натрій гідроксиду, 10% ТХА (термін зберігання не більше 1 міс.), дистильована вода, штатив з пробірками, піпетки на 1 мл, центрифужні пробірки, центрифуги, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи. Визначення ПВК у крові. В центрифужну пробірку внести 0,3 мл крові та 0,7 мл води і після перемішування додати 1 мл 10% розчину ТХА та відцентрифугувати при 1500 об./хв. Протягом 15 хв.

Взяти три пробірки: в першу (дослідну) внести 0,3 мл надосадової рідини, у другу (стандартну) - 0,3 мл стандартного розчину натрій пірувату, у третю (контрольну) - 0,3 мл води. В кожну пробірку додати по 0,4 мл 0,1% розчину ДНФГ, перемішати та поставити в темне місце на 20 хв., після чого додати по 1 мл 12% розчину натрій гідроксиду.

Через 5 хв. визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (синій світлофільтр, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Визначення ПВК у сечі. Взяти три пробірки: в першу (дослідну) внести 0,3 мл розведеної у 3 рази сечі, у другу (стандартну) – 0,3 мл стандартного розчину натрій пірувату, у третю (контрольну) – 0,3 мл води. В кожну пробірку додати по 0,5 мл 0,1% розчину ДНФГ, перемішати і поставити в темне місце на 20 хв. Після цього додати по 1 мл 12% розчину натрій гідроксиду.

Через 5 хв. визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (синій світлофільтр, кювета з довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту піровиноградної кислоти провести:

1. За формулою:

$$C_{д.} = \frac{C_{ст.} \cdot E_{д.}}{E_{ст.}}, \text{ де}$$

$C_{д.}$ – вміст ПВК у дослідній пробі (мг%);

$C_{ст.}$ – вміст ПВК у стандартній пробі (мг%);

$E_{д.}$ – екстинкція дослідної проби;

$E_{ст.}$ – екстинкція стандартної проби.

У випадку визначення вмісту ПВК сечі необхідно врахувати її розведення.

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої з основного стандартного розчину (200 мг/л) піровиноградної кислоти приготувати серію розведень.

Взяти шість пробірок, в які внести відповідно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 та 0,6 мл основного стандартного розчину ПВК і загальний об'єм розчину довести дистильованою водою до 10 мл.

Після цього з кожної пробірки відібрати по 0,3 мл розчину і перенести в інші пронумеровані пробірки із врахуванням концентрації в них ПВК. Проби обробити як дослідні.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації ПВК, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

У крові практично здорових людей вміст ПВК складає 0,114 мМоль/л (10 мг/л). Концентрація ПВК у крові немовлят у тричі вища. За добу з сечею практично здорових людей виділяється 200 мг піровиноградної кислоти.

Підвищення екскреції відмічають при нестачі вітаміну B_1 та гіпоксіях різного походження.

Дати відповіді на запитання

1. Записати схему утворення ПВК з глюкози.
2. Які шляхи перетворення ПВК в організмі?
3. Пояснити принцип методу визначення ПВК в біоматеріалі.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №8

ТЕМА: Біосинтез вуглеводів. Регуляція вуглеводного обміну

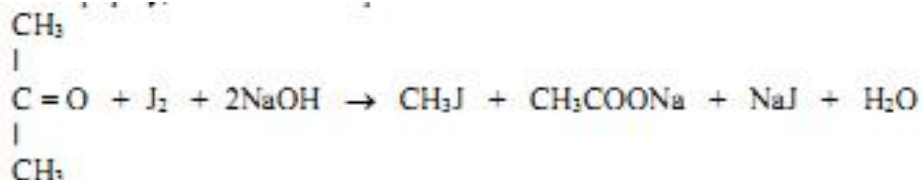
А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Біосинтез вуглеводів. Механізм первинного біосинтезу вуглеводів у процесі фотосинтезу і хемосинтезу.
2. Трансглікозилування та його роль у біосинтезі оліго- і поліцукрів.
3. Роль нуклеозиддифосфатцукрів у глікозилтрансферазних реакціях, забезпечення специфічного біосинтезу оліго- та полісахаридів.
4. Поняття про глюконеогенез і його регуляцію.
5. Синтез моно-, ди- та поліцукрів. Характеристика ферментів.
6. Загальний енергетичний баланс та ефект обміну вуглеводів. Значення вуглеводного обміну.
7. Обмін глюкозо-6-фосфату: шляхи утворення та використання.
8. Механізми нейрогуморальної регуляції обміну вуглеводів.

Б. Лабораторний практикум

Взаємодія ацетону з йодом (Проба Лібена)

Принцип реакції. При додаванні розчину йоду до підлуженої сечі, яка містить ацетон, рідина мутніє внаслідок утворення йодоформу, що має специфічний запах:



Ця реакція неспецифічна оскільки при взаємодії йоду з ацетальдегідом і етанолом також утворюється йодоформ.

Обладнання, матеріали і реактиви: сеча, 10% розчин натрій гідроксиду, 10% розчин йоду в калій йодиді, штатив з пробірками, піпетки, мірний циліндр.

Хід роботи. У пробірку внести 5 мл сечі, додати 1 мл 10% розчину натрій гідроксиду і по краплях 10% розчин йоду в калій йодиді до появи жовтуватого забарвлення. Спостерігати за змінами у пробірці.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити поняття "ацетон сечі". Яке діагностичне значення проби на ацетон?
2. Записати хімізм реакції взаємодії ацетону з йодом.
3. Що означають назви "кетонемія" і "кетонурія"?

ОБМІН ЛІПІДІВ

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №9

ТЕМА: Перетравлювання та всмоктування ліпідів

А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Біологічна роль ліпідів в організмі.
2. Добова потреба організму людини в жирах в залежності від характеру трудової діяльності.
3. Травлення ліпідів в різних відділах шлунково-кишкового тракту.
4. Жовч, значення жовчі.
5. Жовчні кислоти.
6. Перетравлювання жирів в тонкій кишці. Емульгування жирів.
7. Гідролітичне розщеплення жирів: тригліцеридів, стеринів, фосфатидів.
8. Всмоктування ліпідів.
9. Ресинтез ліпідів.
10. Ліпіди крові: хіломікрони, ЛДНГ, ЛНГ, ЛВГ.
11. Обмін ліпідів у печінці.
12. Обмін ліпідів в жирових депо.
13. Обмін ліпідів в інших органах і тканинах.

Б. Лабораторний практикум

Дослід 1. Вивчення емульгування ліпідів.

Принцип реакції. Поверхнево-активні сполуки адсорбуються на поверхні краплини жиру, чим різко знижують її поверхневе натягування, внаслідок чого краплина жиру розпадається на дрібні краплинки, тобто відбувається емульгування.

Обладнання, матеріали і реактиви: пробірки хімічні(5 шт.), штатив, піпетки, рослинна олія, дист.вода, жовч, розчин курячого білку, розчин мила, розчин гідрокарбонату натрію.

Хід роботи. В 5 пробірок вносять по 5 крапель рослинної олії. Потім в пробірки додають по 1 мл: в першу – води, в другу – жовчі, в третю – розчину білку, в четверту – розчину мила, в п'яту – розчину гідрокарбонату натрію.

Вміст пробірок ретельно струшують і через 5 хвилин відмічають, в якій залишається емульсія.

Дати відповіді на запитання

1. Жовчні кислоти.
2. Жовч, її склад, значення.

Дослід 2. Кількісне визначення (β - і пре- β -ліпопротеїдів в сироватці крові за Бурштейном).

Принцип реакції. При взаємодії ліпопротеїдів з хлоридом кальцію та гепарином порушується колоїдна стійкість білків сироватки крові, внаслідок чого збільшується ступінь її помутніння.

Обладнання, матеріали і реактиви: пробірки хімічні(2 шт.), штатив, піпетки, сироватка крові, розчин CaCl_2 , розчину гепарину, ФЕК у 5 мм кюветі при червоному світлофільтрі ($\lambda=630\text{нм}$).

Хід роботи. В пробірку вносять 2 мл розчину CaCl_2 та 0,2 мл досліджуваної сироватки. Перемішують та визначають оптичну густину суміші (E_1) на ФЕК у 5 мм кюветі при червоному світлофільтрі ($\lambda=630\text{nm}$). Суміш переливають знову в пробірку додають мікропіпеткою 0,04 мл розчину гепарину, перемішують. Рівно через 4 хвилини знову визначають оптичну густину суміші (E_2) за тих же умов.

Розрахунок. Вміст β - і пре- β -ліпопротеїдів виражають в одиницях екстинкції, помножених на 100:

$$C = (E_2 - E_1) \times 100$$

В нормі вміст β - і пре- β -ліпопротеїдів складає 35-55 умовних одиниць оптичної густини, що відповідає 3,0-4,5 г/л (300-450 мг%).

Примітки.

1. Кров у пацієнта досліджують після 12-годинного голодування.
2. Сироватку потрібно досліджувати негайно після взяття.
3. На результати аналізу впливає якість гепарину.

Дати відповіді на запитання

1. Порівняти ліпіди крові (хіломікрони, ЛДНГ, ЛНГ, ЛВГ) за ознаками: склад, функції, місце утворення, апобілки).

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №10

ТЕМА: Катаболізм ліпідів

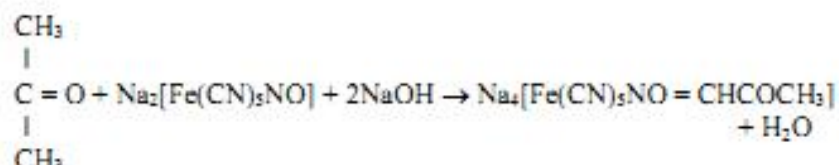
А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Внутрішньоклітинний ліполіз.
2. Обмін гліцерину.
3. Обмін вищих жирних кислот.
4. Енергетичний баланс окиснення жирних кислот.
5. Перетворення стеринів і стеринів.
6. Перетворення фосфатидів.
7. Перетворення решти ліпідів в тканинах.
8. Метаболізм кетонових тіл.

Б. Лабораторний практикум

Дослід 1. Реакція на ацетон і ацетоацетатну кислоту (Проба Ротера)

Принцип реакції. При взаємодії ацетону чи ацетоацетатної кислоти з натрій нітропрусидом у лужному середовищі утворюються комплексні сполуки оранжево-червоного кольору:



Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: амоній сульфат кристалічний, концентрований аміак, 5% розчин натрій нітропрусиду.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, мірний циліндр.

Хід роботи. У пробірку внести 5 мл сечі, додати амоній сульфат до

повного насичення, 1-2 краплі концентрованого аміаку і 2-3 краплі 5% розчину натрій нітропрусиду, перемішати. Спостерігати за появою забарвлення.

Дати відповіді на запитання

1. Що являє собою ацетон і за яких умов він утворюється в організмі?
2. Яке діагностичне значення має визначення ацетону та ацетоацетатної кислоти?
3. Записати схему утворення кетонів тіл.

Дослід 2. Реакція на ацетон і ацетоацетатну кислоту (Проба Легалья)

Принцип реакції. При взаємодії ацетону чи ацетоацетатної кислоти з натрій нітропрусидом в лужному середовищі утворюються комплексні сполуки оранжево-червоного кольору, які за присутності концентрованої ацетатної кислоти набувають темно-червоного забарвлення:



Ця реакція неспецифічна для ацетону та ацетоацетатної кислоти, оскільки креатинін сечі також взаємодіє з нітропрусидом з утворенням подібного забарвлення, однак при додаванні концентрованої ацетатної кислоти рідина не набуває темно-червоного кольору.

Обладнання, матеріали і реактиви: пробірки хімічні(2 шт.), штатив, піпетки, сеча, 10% розчин натрій гідроксиду, 10% розчин натрій нітропрусиду, концентрована ацетатна кислота.

Хід роботи. У пробірку внести 2,5 мл сечі, додати 0,5 мл 10% розчину натрій гідроксиду та 0,5 мл 10% розчину натрій нітропрусиду і перемішати. Спостерігати за розвитком забарвлення. Після цього у пробірку додати 1 мл концентрованої ацетатної кислоти та спостерігати за зміною забарвлення.

Дати відповіді на запитання

1. За яких умов вміст ацетону і ацетоацетатної кислоти в рідинах організму зростає?
2. Записати будову ацетоацетатної кислоти.
3. Вказати головні ознаки цукрового діабету

Дослід 3. Реакція на ацетон і ацетоацетатну кислоту (Проба Ланге)

Принцип реакції. При взаємодії ацетону чи ацетоацетатної кислоти з натрій нітропрусидом за присутності концентрованого аміаку утворюються комплексні сполуки пурпурово-фіолетового кольору.

Обладнання, матеріали і реактиви: пробірки хімічні(2 шт.), штатив, піпетки, сеча, 10% розчин натрій гідроксиду, 10% розчин натрій нітропрусиду, концентрована ацетатна кислота.

Хід роботи. У пробірку внести 1 мл сечі підкисленої ацетатною кислотою і додати по кілька крапель 10% розчину натрій нітропрусиду та концентрованого аміаку, перемішати. Спостерігати за появою забарвлення.

Дати відповіді на запитання

1. Що включає в себе поняття "кетонів тіл"?
2. Чим зумовлена поява кетонів тіл у сечі?

3. Який вміст кетонів у сечі при діабеті?

Дослід 4. Реакція на β -оксимасляну кислоту (Проба Гардта)

Принцип реакції. Продукти окиснення β -оксимасляної кислоти гідроген пероксидом взаємодіють з натрій нітропрусидом з утворенням комплексної сполуки червоного кольору. Ацетон і ацетоацетатну кислоту видаляють при нагріванні сечі.

Матеріал для дослідження: сеча.

Обладнання, матеріали і реактиви: пробірки хімічні (2 шт.), штатив, піпетки, сеча, концентрована ацетатна кислота, 3% розчин гідроген пероксиду, 10% розчин натрій нітропрусиду, 25% розчин аміаку, дистильована вода, водяна баня.

Хід роботи. До 10 мл сечі додати 10 мл води і 2-3 краплі концентрованої ацетатної кислоти, перемішати та випарити до половини об'єму.

У пробірку внести 5 мл отриманої сечі, додати 1 мл гідроген пероксиду, прокип'ятити протягом 1 хв. і охолодити. За цих умов β -оксимасляна кислота окиснюється.

До отриманої суміші додати 10-15 крапель 10% розчину натрій нітропрусиду, перемішати та додати 2 мл 25% розчину аміаку. Спостерігати за зміною забарвлення.

Дати відповіді на запитання

1. Записати будову β -оксимасляної кислоти.
2. Продуктом обміну яких сполук є кетонів тіла?
3. Який наслідок для організму може мати значне підвищення вмісту кетонів у крові?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №11

ТЕМА: Біосинтез ліпідів. Регуляція ліпідного обміну

А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Етапи синтезу ліпідів.
2. Синтез гліцерину.
3. Біосинтез вищих жирних кислот, його регуляція.
4. Біосинтез тригліцеридів.
5. Біосинтез стеринів і стеридів.
6. Біосинтез фосфатидів.
7. Біосинтез гліколіпідів.
8. Регуляція ліпідного обміну.

Б. Лабораторний практикум

Дослід 1. Кількісне визначення холестеролу в крові за Ільком.

Принцип реакції. Холестерол при взаємодії з оцтовим ангідридом в присутності концентрованих сірчаної та оцтової кислот утворює продукти реакції синьо-зеленого кольору. Густина забарвлення прямо пропорційна кількості холестеролу.

Обладнання, матеріали, реактиви: штатив з пробірками; сироватка

крові або кристалічний холестерин, реактив Ілька, ФЕК.

Хід роботи. Пробірки та мікропіпетки повинні бути сухими. В дві центрифужні мірні пробірки наливають по 2 мл реактиву Ілька (Обережно, концентровані кислоти!); потім в одну з них відміряють 0,1 мл стандартного розчину холестеролу, а в другу 0,1 мл досліджуваної сироватки.

Вміст пробірок обережно струшують для перемішування та залишають на 20 хвилин.

Потім розчини фотометрують на ФЕК при червоному світлофільтрі ($\lambda = 630-690$ нм).

За знайденими величинами оптичної густини (екстинкції), стандарту та сироватки складають пропорцію та розраховують концентрацію холестеролу в досліджуваній сироватці.

В нормі концентрація холестеролу (загального) в сироватці дорослої людини дорівнює 3,1-5,5 ммоль/л (120-250 мг%). Ефірозв'язаний холестерол сироватки складає 2/3 загального холестеролу.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити біологічну роль холестерину.
2. Похідним яких сполук є холестерин?
3. Які похідні холестерину утворюються в організмі та яка їх біологічна роль?

САМОСТІЙНА РОБОТА № 3

I. На кожну незакінчену фразу виберіть одне вірне завершення.

1. Ліпіди – природні органічні сполуки: а) добре розчинні у воді; б) нерозчинні в бензені; в) нерозчинні в сульфатному ефірі; г) розчинні в жиророзчинниках; д) розчинні в кислотах.

2. Складні ефіри вищих жирних кислот із гліцерином, вищими або поліциклічними спиртами становлять групу: а) складних ліпідів; б) ліпоїдів; в) простих ліпідів; г) фосфатидів; д) гліколіпідів.

3. Складні ліпіди поряд із залишками багатоатомних спиртів і вищих жирних кислот включають також у свою молекулу залишки: а) поліамінополікарбонів кислот; б) поліізопреноїдів; в) поліциклічних спиртів; г) азотистих основ або вуглеводів і фосфорної кислоти; д) пептидів.

4. Ліпіди у вигляді комплексів з білками входять до складу: а) синтетази вищих жирних кислот; б) вірусу тютюнової мозаїки; в) рибонуклеопротейдних часток; г) мультиензимних комплексів; д) мембранного апарата клітини.

5. Фосфоліпідом є: а) ланолін; б) кефалін; в) пальмітохолестерид; г) спермацет; д) цереброзид.

6. Лінолева й ліноленова кислоти складають найбільшу фракцію вищих жирних кислот: а) кокосового масла; б) арахісового й соєвого масел; в) рапсового масла; г) лляного, конопляного й соняшникового масел; д) пальмового масла.

7. Охороняє волосся й шкіру тварин від дії води віск: а) спермацет; б) бджолиний; в) карнаубський; г) ланолін; д) монтанний.

8. У 1867 р. К.С. Дьяконовим уперше була встановлена наявність у

лецитинах азотистого інгредієнта: а) коламіну; б) холіну; в) серину; г) треоніну; д) спермідину.

9. При відділенні сфінголіпідів від інших фосфоліпідів використовують їх виборче відношення до розчинника: а) чотирьоххлористому вуглеці; б) бензені; в) сульфатному ефірі; г) бензину; д) сірковуглеці.

10. α -складноефірні зв'язки в молекулах тригліцеридів піддаються ферментативному гідролізу за участі: а) фосфоліпази; б) аліестерази; в) ліпази; г) неспецифічної естерази; д) ацетилхолінестерази.

11. Гліцерин, що утворюється при розкладі тригліцеридів, незалежно від шляху його подальшого перетворення в організмі насамперед: а) окислюється; б) фосфорилується; в) відновлюється; г) метилується; д) ацилюється.

12. Вищі жирні кислоти в процесі їхнього деструктивного обміну руйнуються переважно шляхом: а) відновлення; б) ω -окислення; в) β -окислення; г) α -окислення; д) декарбоксилування.

13. Мультиензим, здатний здійснити весь цикл реакцій біосинтезу вищої жирної кислоти, одержав назву: а) гідратази вищих жирних кислот; б) синтетази вищих жирних кислот; в) ацилтрансферази; г) трансацилази; д) ацетил-коА-карбоксилази.

14. При біосинтезі вищих жирних кислот у мембрані ендоплазматичного ретикулуму клітини вуглекислий газ використовується: а) для утворення пірувата; б) при перетворенні малоніл-КоА в β -кетобутирил-КоА; в) для синтезу $\text{CH}_3\text{CO}-\text{CoA}$ з одновуглецевих фрагментів; г) для АТФ – залежного синтезу малоніл-КоА з ацетил-КоА; д) при переході β -кетоацилпохідних у β -оксиацилпохідні.

15. Фосфатидна кислота синтезується в результаті: а) фосфорилування гліцерину; б) відновлення фосфодіоксиацетону; в) гідролізу складних ефірів; г) розщеплення фосфо-ангідридів вищих жирних кислот; д) трансацилування гліцерофосфату.

16. Серед продуктів деструкції холестеролу найбільш окисленими є: а) дигідрохолестероли; б) 7,12-діоксидигідрохолестероли; в) стероїдні гормони; г) холеві кислоти; д) 7-оксидигідрохолестероли.

17. У результаті дії пірофосфомевалонатдекарбоксилази (дегідратууючої) на пірофосфомевалонову кислоту утворюється: а) малоніл-КоА; б) диметилалілпірофосфат; в) β -метилглутарил-КоА; г) ізопентенілпірофосфат; д) геранілпірофосфат.

18. Лізолецитин утворюється з лецитину за участю: а) фосфоліпази С; б) фосфоліпази А; в) фосфоліпази В; г) фосфоліпази D; д) ліпази.

19. Донором фосфохоліну при біосинтезі фосфатидів є: а) уридиндифосфохолін; б) цитидиндифосфохолін; в) гуанозиндифосфохолін; г) аденозиндифосфохолін; д) тимідиндифосфохолін.

II. Зіставте два твердження або показника (позначені буквами А і Б), наведені в кожному пункті, і дайте відповідь у формі: $A > B$, $B > A$; $A = B$.

1. А. Точка плавлення тригліцеридів, які містять залишки ненасичених кислот і кислот з коротким вуглецевим ланцюгом. Б. Температура плавлення тригліцеридів, які містять залишки вищих насичених карбонових кислот.

2. А. Швидкість гідролізу α -складноєфірних зв'язків у тригліцеридах під дією панкреатичної ліпази. Б. Швидкість гідролізу β -складноєфірних зв'язків у тригліцеридах під дією специфічної ліпази.

3. А. Розчинність ліпідів за відсутності солей жовчних кислот у кишечнику. Б. Розчинність ліпідів за наявності солей жовчних кислот – таурохолату й глікохолату натрію.

4. А. Температура плавлення баранячого жиру. Б. Температура плавлення свинячого жиру.

5. А. Йодне число лінолевої кислоти. Б. Йодне число олеїнової кислоти.

6. А. Співвідношення стеролів і стероїдів у печінці тварин. Б. Співвідношення стеролів і стероїдів у жовчі.

7. А. Вміст холестеролу в сірій речовині мозку. Б. Вміст холестеролу в білій речовині мозку.

8. А. Вміст фосфатидилхолінів у природних об'єктах. Б. Вміст фосфатидилсеринів у природних об'єктах.

9. А. Вміст залишків фосфорної кислоти в молекулі фосфатидилхоліну. Б. Вміст залишків фосфорної кислоти в молекулі фосфатидилсерину.

10. А. Швидкість біологічного окислення жирних кислот з довгим вуглецевим ланцюгом за наявності карнітину. Б. Швидкість біологічного окислення вищих жирних кислот за відсутності карнітину.

11. А. Вплив гідрокарбонату на окислення вищих жирних кислот в організмі. Б. Вплив гідрокарбонату на синтез вищих жирних кислот в організмі.

12. А. Активність ацетил-КоА-карбоксилази за наявності цитрату й ізоцитрату. Б. Активність ацетил-КоА-карбоксилази за наявності пальмітил-КоА.

13. А. Число молекул малоніл-КоА, необхідних для синтезу пальмітинової кислоти. Б. Число молекул малоніл-КоА, необхідних для синтезу пальмітоолеїнової кислоти.

14. А. Інтенсивність синтезу ненасичених вищих кислот в аеробних умовах. Б. Інтенсивність синтезу ненасичених вищих кислот в анаеробних умовах.

15. А. Число ізопреноїдних груп у двох молекулах фарнезилпірофосфата. Б. Число ізопреноїдних груп у молекулі сквалену.

III. Виберіть із нижченаведених тверджень правильні.

1. а) Гідроліз 8-моногліцеридів відбувається за участю специфічних ліпаз; б) першою реакцією в обміні тригліцеридів є їх ферментативний гідроліз; в) при гідролізі тригліцеридів за наявності алієстерази спочатку розпадаються α -складноєфірні зв'язки; г) у результаті гідролізу β -моногліцериду утворюється гліцерин і дві молекули вищої жирної кислоти.

2. а) Продуктом окислення гліцерофосфату в організмі є фосфодіоксиацетон; б) гліцерофосфатдегідрогеназа як кофермент містить ФАД; в) вищі жирні кислоти в організмі руйнуються переважно шляхом β -окислення; г) ацил-КоА-дегідрогеназа містить як кофермент нікотинамідаденіндинуклеотид.

3. а) У реакціях β -окислення вищих жирних кислот КоА виконує каталітичну функцію; б) дві молекули ацетил-КоА конденсуються з утворенням вільної ацетооцтової кислоти й виділенням однієї молекули вільного КоА; в) одним зі шляхів обміну ацетил-КоА є взаємодія його з кето-формою щавелевооцтової кислоти й утворення цитрил-КоА; г) ацил-КоА є універсальним донором ацильних груп у реакціях ацилювання в організмі.

4. а) На біосинтез мевалонової кислоти затрачаються три молекули ацетил-КоА; б) мевалонова кислота є β,δ -діокси- β,β -диметилвалеріановою кислотою; в) пірофосфомевалонова кислота ферментативно декарбоксілується з утворенням ізопентенілпірофосфата; г) біосинтез поліізопреноїдів відбувається з ізопентенілпірофосфата й диметилалілпірофосфата.

5. а) Фосфатиди розпадаються при гідролізі на їх складові структурні одиниці – вищі жирні кислоти, фосфорну кислоту й гліцерин; б) при дії на лецитин фосфоліпази С утворюється лізолецитин; в) при дії гліцерофосфорилхолін-діестерази на α,L -гліцерилфосфорилхолін утворюються холін і α -фосфогліцерин; г) у нервовій тканині тварин ацетилхолін виконує роль макроергічної сполуки.

6. а) Синтез цитидиндифосфохоліну в організмі здійснюється без участі ферменту; б) при біосинтезі фосфатидів до вільної гідроксильної групи дигліцериду приєднується залишок холіну; в) бетаїн є донором метильних груп у реакціях трансметилування; г) у клітині фосфатиди зосереджені головним чином у мембранних структурах.

IV. Виберіть правильні парні сполучення ключових слів і фрагментів фраз (позначені буквами А, Б, В, Г, Д) і значеннєвих завершальних пропозицій (позначені буквами а, б, в, г, д).

1. А. Ліпіди. Б. Стериди. В. Фосфоліпіди. Г. Гліколіпіди. Д. Тригліцериди. а) У хімічному відношенні є збірною групою органічних сполук; б) є складними ефірами вищих жирних кислот і гліцерину; в) містять, окрім залишків вищих кислот, гліцерину (або інших багатоатомних спиртів), фосфорну кислоту й азотисті основи; г) представляють складні ефіри вищих жирних кислот і поліциклічних спиртів; д) містять поряд із залишками багатоатомного спирту й вищої жирної кислоти також вуглеводний залишок.

2. А. Йодне число. Б. Кислотне число. В. Ефірне число. Г. Число омилення. а) Дозволяє оцінити вміст вільних жирних кислот у жирі; б) свідчить про вміст у жирі суми вільних і зв'язаних (у формі тригліцеридів і ін.) жирних кислот; в) характеризує ступінь ненасиченості жирів; г) виявляє вміст у жирі зв'язаних складноефірних зв'язків залишків жирних кислот.

3. А. Ізовалеріанова кислота. Б. Каприлова кислота. В. Лауринова кислота. Г. Міристинова кислота. Д. Бегенова кислота. а) Виявлена вперше в арахісовому маслі; б) міститься у великій кількості в лавровому маслі; в) переважає в кокосовому маслі; г) має непарне число атомів вуглецю й виявлена у жирі печінки дельфіна; д) знайдена в маслі мускатного горіха.

4. А. Гідролітичне розщеплення. Б. Гідрогенізація. В. Акролеїнова проба. Г. Реакція утворення біхолестадиєну. Д. Реакція із хлоридом кадмію. а)

Проводиться для визначення в складі ліпідів гліцерину; б) є якісною реакцією на лецитин; в) представляє початкову реакцію в обміні жирів, стеридів і фосфатидів; г) полягає у відновленні ненасичених залишків вищих жирних кислот, що супроводжується переходом рідких жирів у тверді; д) є якісної пробою на холестерол.

5. А. Ліпаза. Б. Гліцерокіназа. В. Холестеролестераза. Г. Фосфоліпаза С. Д. Холінацетилтрансфераза. а) Прискорює гідроліз стериду на жирну кислоту й поліциклічний спирт; б) каталізує одну з найважливіших реакцій обміну холіну в нервовій тканині тварин; в) представляє гідролазу ефірів гліцерину; г) прискорює реакцію гідролізу фосфатидилхоліну на 1,2-дигліцерид і холінфосфат; д) прискорює реакцію фосфорилювання вільного гліцерину.

6. А. α -Гліцерофосфат. Б. Ацил-КоА. В. L, β -Оксистеарил-КоА. Г. Транс-дегідроацил-КоА. Д. Ацетил-КоА. а) Виникає як безпосередній продукт реакції β -окислення вищих жирних кислот; б) представляє субстрат дії стереоспецифічної еноіл-КоА-гідратази; в) утворюється в результаті активування вищих жирних кислот за наявності АТФ і ацил-КоА-синтетази; г) є кінцевим продуктом розпаду вищих жирних кислот у результаті їх β -окислення; д) окислюється в процесі обміну речовин за участі гліцерофосфатдегідрогенази до діоксиацетонфосфату.

7. А. Ацетоацетил-КоА. Б. Ацетил-КоА. В. Мевалонова кислота. Г. Цитрил-КоА. Д. Гліоксилова кислота. а) Утворюється як перший продукт при деструктивному обміні ацетил-КоА; б) перетворюється в метилглутарил-КоА, з'єднуючись із молекулою ацетил-КоА; в) синтезується з β -метилглутарил-КоА; г) шунтує більшу частину циклу три-і дикарбонових кислот, з'єднуючись із молекулою ацетил-КоА; д) є кінцевим продуктом β -окислення вищих жирних кислот.

8. А. Малоніл-КоА. Б. CO_2 . В. КоА. Г. Фосфатидна кислота. Д. α,β -дигліцерид. а) Є найважливішим коферментом ацилтрансфераз; б) синтезується в якості першого специфічного попередника при біосинтезі вищих жирних кислот; в) представляє безпосередньо етерифікований попередник тригліцериду; г) є ключовим метаболітом у синтезі ряду простих і складних ліпідів; д) акцептується ферментативно на циклічно повторюваних етапах біосинтезу вищих жирних кислот, але ніколи не виявляється в їх молекулі.

9. А. β -Метилглутарил-КоА. Б. Геранілпірофосфат. В. Фарнезилпірофосфат. Г. Ланостерол. Д. Сквален. а) Виникає в результаті реакції перенесення радикала геранілу з геранілпірофосфата на ізопентенілпірофосфат; б) є найважливішим безпосереднім попередником поліциклічних спиртів; в) утворюється в результаті циклізації сквалену, що супроводжується міграцією метильної групи з положення 8 у положення 13; г) відновлюється в мевалонову кислоту з вивільненням КоА; д) утворюється в результаті реакції конденсації ізопентенілпірофосфата й диметилалілпірофосфата.

10. А. Ліпопротеїди. Б. Фосфоліпіди. В. Тригліцериди. Г. Інозитфосфоліпіди. Д. Гангліозиди. а) Зосереджені в гіалоплазмі клітин й

використовуються для окислення в енергетичних цілях; б) містять нейрамінову кислоту й її похідні, що відіграють значну роль у здійсненні імунохімічних процесів в організмі; в) містяться у великій кількості в мієлінових оболонках нервових волокон спинного мозку; г) представляють найпоширенішу форму існування ліпідів у клітин; д) є переважним компонентом ліпопротеїдного комплексу мембран.

V. Проведіть відповідні перетворення й розв'яжіть розрахункові завдання.

1. До складу свинячого жиру входять тригліцериди: трипальмітин, триолеїн, пальмітодіолеїн, пальмітостеароолеїн. Напишіть формули перерахованих тригліцеридів.

2. У кокосовому й пальмовому маслах знайдені стеародипальмітин, оледипальмітин, міристоридипальмітин і пальмітодиміристин. Напишіть формули перерахованих тригліцеридів.

3. З деяких бактерій і рослин були виділені жирні кислоти, що містять циклопропенове кільце (стеркулова кислота) і циклопентенове кільце (хаульмугрова кислота). Напишіть формули названих кислот.

4. Напишіть формули лауринової, міристинової, пальмітоолеїнової, арахідонової і бегенової кислот.

5. Спермацет черепних порожнин кашалота представлений пальмітиновоцетиловим ефіром і олеїновоолеїловим ефіром. Напишіть хімічні формули цих ефірів.

6. Напишіть формули холестерану, холестеролу, холестеранолу, нолевої кислоти. Укажіть генетичний взаємозв'язок між перерахованими сполуками.

7. Напишіть формули холестеролпальмітату, ергостеролстеарату й стигмастерололеату.

8. Напишіть рівняння перших двох реакцій перетворення лінолевої кислоти перед її вступом на шлях β -окислення. Назвіть ферменти, що беруть участь у цих реакціях.

9. Напишіть рівняння реакції синтезу кефаліну з дипальмітина й ЦДФ-коламіну за наявності етаноламінфосфотрансферази.

10. Розрахуйте процентний вміст холіну в лецитині, цитидиндифосфохоліні й ацетилхоліні.

11. Розрахуйте процентний вміст фосфору у фосфатидилдипальмітині.

12. Для визначення загальної кількості ліпідів у насінні використовують метод екстракції їх хлороформ-метанольною сумішшю. Паралельно з екстракцією ліпідів у насінні визначають вміст води, тому що вона теж екстрагується цією сумішшю й може бути прийнята за жири. Розрахуйте вміст ліпідів (на абсолютно суху речовину) у насінні рапсу, якщо в аналіз взяли 3,75 г повітряно-сухого насіння з вмістом води в ньому 4,5%, а вихід абсолютно сухої речовини після екстракції склав 1,35 г.

13. Вміст ліпідів у насінні льону (вологість 7,5%) визначали за методом Сокслета. Маса пакетика з повітряно-сухою наважкою до екстракції склала 4,9644 г, після екстракції – 3,5882 г. Маса пакетика без насіння – 0,8315 г. Розрахуйте процентний вміст жиру в абсолютно сухому матеріалі.

14. На титрування в спиртовому розчині 10 мг невідомої монокарбонової кислоти було витрачено 3,5 мл 0,01 N спиртового розчину гідроксиду натрію. Розрахуйте молекулярну масу цієї кислоти.

15. Розрахуйте йодне число масла, знаючи, що наважка масла становила 0,375 г, а на титрування було витрачено 5,8 мл 0,1 N розчину гіпосульфїту в контролі й 3,8 мл – у досліді.

16. Розрахуйте кислотне число масла, якщо наважка його становила 0,2521 г, а на титрування було витрачено 1,2 мл 0,1 N розчину гідроксиду калію.

ОБМІН БІЛКІВ

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №12

ТЕМА: Катаболізм білків

А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Принципи нормування білку в харчуванні. Азотистий баланс.
2. Перетравлювання білків. Протеази.
3. Перетравлювання білків у шлунку. Шлунковий сік, його склад. Механізм утворення соляної кислоти, її функції.
4. Ферменти шлунка: пепсиноген, пепсин, гастриксин, хімозин, муцин.
5. Перетравлювання білків у кишечнику. Функції тонкої й товстої кишок.
6. Панкреатичний сік, ферменти.
7. Кишковий сік, ферменти.
8. Всмоктування амінокислот.
9. Перетворення амінокислот за аміногрупою: трансамінування, пряме дезамінування, непряме дезамінування.
10. Перетворення амінокислот за карбоксильною групою.
11. Перетворення амінокислот за радикалами.
12. Шляхи обміну безазотистого залишку амінокислот.
13. Обмін аміаку.
14. Орнітиновий цикл.
15. Перетворення інших продуктів кінцевого обміну білків.
16. Перетворення продуктів розпаду хромопротеїдів.

Б. Лабораторний практикум

Кількісне визначення кінцевих продуктів білкового обміну

Загальний азот сечі

Враховуючи те, що білки є азотовмісними сполуками, важливою характеристикою стану білкового обміну є азотистий баланс - показник, який дає уяву про відношення між вмістом азоту, що надходить до організму, та кількістю азоту, який виділяється у складі кінцевих продуктів обміну.

Сума всіх азотовмісних сполук, що виділяються з сечею у процесі обміну, складає загальний азот сечі. Цей показник включає: азот сечовини (80-90% загального азоту), аміаку (біля 5% загального азоту), креатиніну (2-7% загального азоту), сечової кислоти (1,6% загального азоту), гіпурової кислоти

(0,5% загального азоту), індикану, парних глюкуронових кислот (1-3% загального азоту). За добу з сечею виділяється 10-20 г загального азоту, основну частину якого складає азот сечовини.

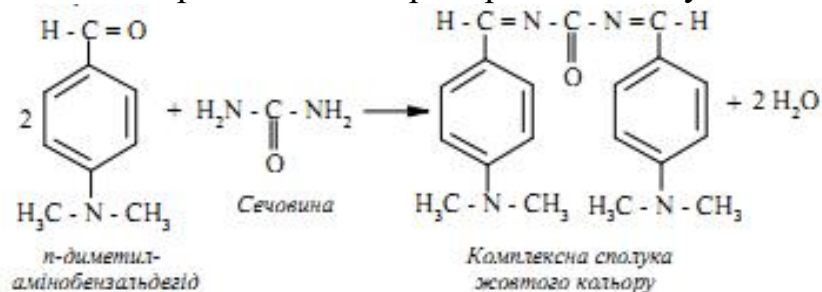
За вмістом загального азоту сечі можна визначити кількість білка, що надходить до організму, та розрахувати стан азотистого балансу. Для цього кількість визначеного азоту слід перемножити на коефіцієнт перерахунку 6,25, розрахованого виходячи з того, що в білках міститься в середньому 16% азоту.

Визначення вмісту загального азоту сечі та окремих його складових має важливе значення для оцінки стану білкового обміну в організмі, а також функціонування внутрішніх органів печінки, нирок та ін.

а. Азот сечовини

Дослід 1. Визначення вмісту азоту сечовини.

Принцип методу. Аміногрупи сечовини в кислому середовищі з п-диметиламінобензальдегідом утворюють комплексну сполуку жовтого кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту сечовини в сечі:



Обладнання, матеріали і реактиви: штатив з пробірками, піпетки на 1 і 2 мл, скляні палички **Піпетки і пробірки обов'язково повинні бути сухими!**, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 3 мм, сеча, стандартний розчин сечовини (10 мг%), дистильована вода, 2% розчин я-диметиламінобензальдегіду.

Хід роботи. Піпетки і пробірки обов'язково повинні бути сухими!

Взяти три пробірки: в одну (дослідну) внести 0,2 мл сечі, у другу (стандартну) – 0,2 мл стандартного розчину сечовини, у третю (контрольну) – 0,2 мл дистильованої води. В кожну пробірку додати по 1,2 мл 2% розчину п-диметиламінобензальдегіду, добре перемішати.

Через 15 хв. визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (синій світлофільтр, кювета довжиною оптичного шляху 3 мм) відносно контролю.

Кількість сечовини розрахувати у грамах на добу (коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (мМоль/доб.) складає 16,65).

Приклад розрахунку. Якщо екстинкція стандартного розчину -0,9, а дослідного - 0,6, то розрахунок проводимо за схемою:

1. Визначаємо вміст (в г%) сечовини сечі:

0,9 відповідає 1 г% сечовини

0,6 ----- X

X = 0,7 г%

2. Визначаємо вміст сечовини в добовій кількості сечі:

0,7 г сечовини міститься в 100 мл сечі

X г ----- в 1500 мл сечі

X = 10,5 г

3. Розраховуємо загальну кількість азоту, що виділяється з сечовиною:

10,5 г азоту відповідає 95%

X г ----- 100%

X = 11,05 г

4. Визначаємо кількість білка, що надходить до організму:

11,05 г • 6,25 = 69,07 г

5. Розраховуємо кількість білка, яка повинна надходити до організму теоретично, враховуючи масу тіла:

65 кг • 1,2 = 78 г.

Провести розрахунки і записати висновок про стан азотистого балансу та збалансованість раціону.

Дати відповіді на запитання

1. За яких умов при збалансованому харчуванні може спостерігатися негативний азотистий баланс? Відповідь обґрунтувати.

2. Пояснити поняття "азотистий баланс організму."

3. Які рекомендовані норми добової потреби в білку та критерії її визначення?

4. Яким чином за вмістом азоту сечовини можна визначити стан азотистого балансу?

б. Азот аміаку

Дослід 2. Визначення вмісту азоту аміаку сечі.

Принцип методу. При взаємодії амонійних солей з формальдегідом утворюється гексаметилентетраамін (уротропін) та звільняється еквівалентна кількість відповідних кислот, які відтитровують лугом.

Обладнання, матеріали і реактиви: конічна колба на 50 мл, бюретка для титрування, мірний циліндр, піпетки, сеча, 0,1% розчин фенолфталеїну, 0,1н розчин натрій гідроксиду, свіжонеутралізований 20% розчин формальдегіду.

Хід роботи. У конічну колбу на 50 мл внести 10 мл сечі, додати 1-2 краплі фенолфталеїну та нейтралізувати 0,1н розчином натрій гідроксиду до появи рожевого забарвлення. Після цього додати рівний об'єм свіжонеутралізованого розчину формальдегіду (реакція середовища змінюється і червоний колір індикатора зникає). Вміст колби відтитрувати 0,1н розчином натрій гідроксиду до появи стійкого рожевого забарвлення.

У добовій сечі здорової людини міститься 0,5-1 г аміаку або його екскреція з сечею складає 30-60 мМоль/доб.

Приклад розрахунку.

1. За кількістю натрій гідроксиду, використаного на титрування, можна визначити кількість аміаку в 10 мл сечі:

1 мл 0,1н NaOH еквівалентний вмісту 1,7 мг аміаку, на титрування використано 2,2 мл 0,1н NaOH - x мг аміаку x = 3,74 мг

2. Яка кількість аміаку виділяється з сечею за добу?

В 10 мл сечі ----- 3,74 мг аміаку

В 1500 мл сечі ----- x_1 мг аміаку

$x_1 = 561$ мг = 5,61 г Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. На чому ґрунтується принцип методу визначення вмісту аміаку в сечі?
2. У вигляді яких сполук аміак виділяється з сечею?
3. Записати хімізм утворення транспортних форм аміаку в організмі.

в. Азот амінокислот

Дослід 3. Визначення вмісту вільного амінного азоту в сироватці крові за методом Г.А. Узбекова

Принцип методу. Вміст амінного азоту визначають колориметрично за інтенсивністю забарвлення, яке утворюється внаслідок взаємодії амінокислот сироватки крові з нінгідриновим реактивом.

Обладнання, матеріали і реактиви: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл, водяна баня, скляні палички, мірні пробірки на 10 мл, фільтри, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм, сироватка крові, 1% водний розчин нінгідрину, 0,04н розчин ацетатної кислоти, дистильована вода.

Хід роботи. У пробірку внести 0,5 мл сироватки крові та 0,5 мл 0,04н розчину ацетатної кислоти, закрити пробкою, поставити на водяну баню і повільно довести до кипіння та прокип'ятити протягом 5 хв. (відлік часу вести з моменту закипання). Після охолодження до вмісту пробірки додати 1 мл дистильованої води, перемішати скляною паличкою і профільтрувати через паперовий фільтр. Пробірку та осад на фільтрі промити 2 рази водою (по 1 мл), після чого фільтрат і промивні води об'єднати.

До отриманого фільтрату додати 0,5 мл 1% водного розчину нінгідрину, перемішати та помістити на киплячу водяну баню на 20 хв. Після охолодження загальний об'єм суміші довести дистильованою водою до 10 мл і залишити на 5 хв. при кімнатній температурі.

Паралельно приготувати контрольну пробу: в мірну пробірку внести 3 мл води, 0,5 мл 0,04н розчину ацетатної кислоти, 0,5 мл 1% водного розчину нінгідрину. Після перемішування поставити на киплячу водяну баню на 20 хв., охолодити і довести водою до 10 мл.

Визначити екстинкцію дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю (можна брати звичайну дистильовану воду).

Розрахунок вмісту амінного азоту в сироватці крові провести:

1. За калібрувальною кривою, на якій слід знайти кількість мкг азоту, що відповідає отриманій екстинкції. Для переведення результатів у мг % використати формулу:

$$a \times 100$$

$$C = \frac{\quad}{\quad}, \text{ де}$$

$$b \times 1000$$

C – вміст азоту в дослідній пробі (мг%);

a – кількість азоту, знайдена за калібрувальною кривою (мкг);

b – об'єм сироватки крові, взятої для дослідження (0,5 мл);

1000 – коефіцієнт перерахунку мкг в мг.

2. Вміст амінного азоту можна визначити за градуальною таблицею залежно від значень екстинкції.

У нормі вміст амінного азоту в сироватці крові складає 2,04,3 мг%.

Дати відповіді на запитання

1. Чому для визначення вмісту амінного азоту використовують нінгідринову реакцію?

2. Пояснити поняття "амінний азот".

3. Яке діагностичне значення визначення вмісту амінного азоту в сироватці крові?

г. Залишковий азот

Дослід 4. Визначення залишкового азоту крові колориметричним методом з реактивом Несслера.

Принцип методу. Залишковий азот визначають у безбілковому фільтраті з використанням реактиву Несслера.

Обладнання, матеріали і реактиви: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл, мірний циліндр, водяна баня, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм, кров, основний стандартний розчин амоній сульфату (0,1 мг азоту в 1 мл), 10% розчин ТХА, концентрована сульфатна кислота, 0,5н розчин сульфатної кислоти, 30% розчин гідроген пероксиду, 50% розчин натрій гідроксиду, реактив Несслера.

Хід роботи. У пробірку внести 1,8 мл дистильованої води і 0,2 мл крові, додати 0,3 мл 10% розчину ТХА та 0,2 мл 0,5н розчину сульфатної кислоти. Суміш ретельно перемішати і через 15 хв. профільтрувати в суху пробірку.

1 мл безбілкового фільтрату перенести в термостійку пробірку і додати 3 краплі концентрованої сульфатної кислоти та 3 краплі 30% розчину гідроген пероксиду і обережно прогріти до отримання безбарвного мінералізату.

Після охолодження до мінералізату додати 10 мл води, 6 крапель 50% розчину натрій гідроксиду (для нейтралізації кислоти) та 0,5 мл реактиву Несслера.

Паралельно приготувати контроль і стандартну пробу. Для приготування контролю до 10 мл води додати 6 крапель 50% розчину натрій гідроксиду та 0,5 мл реактиву Несслера. Стандартну пробу готувати додаванням до 10 мл основного стандартного розчину амоній сульфату 6 крапель 50% розчину натрій гідроксиду і 0,5 мл реактиву Несслера.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (синій світлофільтр, 590 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту залишкового азоту у крові провести:

1. За формулами:

а) у безбілковому фільтраті:

$$C_{ст} \times E$$

$$C_d = \frac{\quad}{E} = \quad, \text{ де}$$

C_d – вміст залишкового азоту в дослідній пробі;

$C_{ст}$ – вміст азоту у стандартній пробі (0,1 мг/мл);

E_d – екстинкція дослідної проби;

$E_{ст}$ – екстинкція стандартної проби

б) у крові:

$$C = \frac{C_d \times V \times 100}{1 \times 0,2}, \text{ де}$$

C – вміст залишкового азоту крові (мг%);

C_d – вміст залишкового азоту в дослідній пробі (або знайдений за калібрувальною кривою);

V – загальний об'єм суміші, отриманий після осадження білків (2,5 мл);

0,2 – кількість крові, взятої для аналізу (мл).

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої приготувати серію розведень основного стандартного розчину амоній сульфату як вказано в таблиці:

№	Основний стандартний розчин амоній сульфату (0,1 мг азоту в 1 мл), мл	H ₂ O дист., мл	Концентрація азоту в розчині, мг/10мл	Реактиви на визначення азоту
1.	1	9	0,01	6 крапель 50% розчину натрій гідроксиду, 1 крапля концентрованої сульфатної кислоти і 0,5 мл реактиву Несслера
2.	2	8	0,02	
3.	3	7	0,03	
4.	4	6	0,04	
5.	5	5	0,05	
6.	6	4	0,06	
7.	7	3	0,07	
8.	8	2	0,08	
9.	9	1	0,09	

Визначити екстинкцію проб як вказано вище. На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації азоту, а на осі ординат -відповідні їм значення екстинкції.

Дати відповіді на запитання

1. Що означає поняття "залишковий азот крові"?

2. Чому визначення залишкового азоту проводять у безбілковому фільтраті?

3. Чому підвищення вмісту небезпечним для організму?

4. Перерахувати компоненти. Вказати їх значення.

Дослід 5. Визначення вмісту креатиніну в сечі за кольоровою реакцією Яффе (метод Поппера та співроб.)

Принцип методу. Креатинін при взаємодії з пікриновою кислотою в

лужному середовищі утворює креатинін пікрат оранжевого кольору.

У вигляді стандартного розчину замість 0,1% розчину креатиніну можна використовувати 0,5н розчин калій біхромату.

Обладнання, матеріали і реактиви: конічні колби на 50 і 100 мл, мірний циліндр, піпетки на 1 мл, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм, сеча, 0,5н розчин калій біхромату (забарвлення якого відповідає 0,01 мг креатиніну в 1 мл розчину) або основний стандартний розчин креатиніну (100 мг% або 8,8 мМоль/л), 10% розчин натрій гідроксиду (придатний протягом тижня), 2% (насичений) розчин пікринової кислоти, дистильована вода.

Хід роботи.

Дослід 1. Взяти три конічні колби на 100 мл: в першу (дослідну) внести 0,5 мл сечі, у другу (стандартну) - 0,5 мл основного стандартного розчину креатиніну. В кожну колбу додати по 3 мл насиченого розчину пікринової кислоти, ретельно перемішати, додати по 0,2 мл 10% розчину натрій гідроксиду і знову перемішати. У третю (контрольну) колбу внести 3 мл насиченого розчину пікринової кислоти та 0,2 мл 10% розчину натрій гідроксиду. Через 10 хв. загальний об'єм у колбах довести дистильованою водою до позначки.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту креатиніну в сечі провести за формулою:

$$C_d = \frac{C_{ст} \times E_d \times D}{E_{ст} \times a \times 1000}, \text{ де}$$

C_d – вміст креатиніну в добовому об'ємі сечі;

$C_{ст}$ – вміст креатиніну у стандартній пробі (100 мг% або 8,8 мМоль/л);

E_d – екстинкція дослідної проби;

$E_{ст}$ – екстинкція стандартної проби;

D – добовий об'єм сечі, мл;

a – об'єм сечі, взятої для аналізу (0,5 мл);

1000 – коефіцієнт перерахунку міліграм у грами.

Дослід 2. У колбу на 50 мл внести 0,4 мл сечі, додати 1 мл насиченого розчину пікринової кислоти та 0,4 мл 10% розчину натрій гідроксиду і ретельно перемішати. Через 10 хв. вміст колби довести водою до позначки та перемішати.

Визначити екстинкцію дослідної і стандартної (0,5 н розчин калій біхромату) проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 530 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту креатиніну в сечі провести за формулою:

$$C_d = \frac{C_{ст} \times E_d \times D}{E_{ст} \times 100}, \text{ де}$$

C_d – вміст креатиніну в добовому об'ємі сечі;

$C_{ст}$ – вміст креатиніну у стандарті;

E_d – екстинкція дослідної проби;
 $E_{ст}$ – екстинкція стандартної проби;
 D – добовий об'єм сечі (мл).

За вмістом креатиніну можна отримати інформацію про стан фізичного навантаження людини.

Дати відповіді на запитання

1. Яка біологічна роль креатиніну?
2. Записати схему утворення креатину і креатиніну.
3. Як проходить обмінна реакція між креатином та АТФ?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №13

ТЕМА: Анаболічні процеси обміну білків

А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Поняття про біосинтез білку.
2. Рекогніція, ферменти.
3. Трансляція, її етапи.
4. Ініціація синтезу поліпептидного ланцюга.
5. Елонгація поліпептидного ланцюга.
6. Термінація поліпептидного ланцюга.
7. Оновлення білків в організмі.
8. Біосинтез глутатіону.
9. Біосинтез карнозину і ансерину.
10. Біосинтез окремих амінокислот.
11. Молекулярні механізми специфічності біосинтезу білків.
12. Особливості генетичного коду.
13. Генна інженерія і біосинтез білка.
14. Регуляція синтезу білка.

Б. Лабораторний практикум

Дослід 1. Кількісне визначення білка біуретовим методом

Принцип методу. В основі лежить кольорова реакція з біуретовим реактивом:

білки в лужному середовищі реагують із купрум сульфатом, при цьому утворюються сполуки, забарвлені у фіолетовий колір.

Обладнання, матеріали і реактиви: пробірки, 0,9% розчин натрій хлориду, стандартного розчину білка (50 г/л), досліджуваної сироватки крові, біуретовий реактив, ФЕК (кювета 10 мм, червоний світлофільтр 750 нм)

Хід роботи. Для досліду беруть три пробірки. У першу (контрольну) пробірку вносять 1 мл 0,9% розчину натрій хлориду, у другу (дослідну) – 0,1 мл стандартного розчину білка (50 г/л), у третю (дослідну) пробірку – 0,1 мл досліджуваної сироватки крові. В усі пробірки додають по 5 мл біуретового реактиву, перемішують вміст пробірок. Через 30 хвилин визначають екстинкцію ФЕК дослідних пробірок (кювета 10 мм, червоний світлофільтр 750 нм) проти контрольної пробірки.

Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{a \cdot b}{c} \quad \text{де}$$

X – концентрація білка в досліджуваній сироватці крові, г/л;

a – концентрація білка стандартного розчину білка;

b – екстинкція досліджуваної сироватки крові ;

c – екстинкція стандартного розчину білка.

Кількісно загальний білок можна визначати в сироватці або плазмі крові за допомогою тестового набору реактивів напіваавтоматичними біохімічними аналізаторами.

Клініко-діагностичне значення

Вміст білка в сироватці крові практично здорових людей складає: в дорослих – 65-85 г/л (у віці після 60 років вміст білка у плазмі знижується); у новонароджених: доношених - 46-70 г/л, недоношених - 36-60 г/л (у крові з пуповини - 40-80 г/л); у дітей віком 1 тиждень – 44- 76 г/л, 7 міс. – 1 рік – 51-73 г/л, 1-2 роки – 56-75 г/л, 3-6 років – 56-85 г/л. Зменшення вмісту білків нижче 60 г/л – гіпопротеїнемія, а збільшення білків більше ніж 85 г/л – гіперпротеїнемія.

Гіпопротеїнемію спостерігають при нефротичному синдромі, ентериті, хронічному панкреатиті, опіках, екземі, масивних крововтратах, хронічних захворюваннях нирок, під час голодування, при серцевій декомпенсації.

Гіперпротеїнемію спостерігають при макроглобулінемії Вальденстрема, ревматоїдному артриті, колагенозах, цирозі печінки, згущенні крові (при діареї, блюванні, цукровому діабеті, важких травмах), гострих інфекційних захворюваннях.

Дати відповіді на питання

1. Які білки входять до складу рідин організму?
2. Чому сироватка крові, яку використовують для визначення вмісту білка, не повинна містити слідів гемолізу?
3. Чи однаковий білковий склад сироватки, плазми та цільної крові?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №14

ТЕМА: Катаболічні процеси обміну нуклеїнових кислот

А. Теоретичні питання:

1. Перетравлювання та всмоктування нуклеїнових кислот.
2. Розпад нуклеїнових кислот в тканинах.
3. Розпад пуринових основ.
4. Розпад піримідинових основ.
5. Регуляція нуклеїнового обміну.
6. Патологія нуклеїнового обміну.

Б. Лабораторний практикум

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КІНЦЕВИХ ПРОДУКТІВ ОБМІНУ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Дослід 1. Виділення сечової кислоти з сечі

У людини сечова кислота є кінцевим продуктом пуринового обміну. Джерелом сечової кислоти є нуклеопротейди їжі та тканин організму. При гідролізі нуклеопротейдів у тканинах організму утворюються амінопурини – аденін та гуанін, які зазнають гідролітичного дезамінування з утворенням гіпоксантину і ксантину. Під впливом ферменту оксидази гіпоксантин та ксантин окиснюються до сечової кислоти.

Принцип методу: сечову кислоту виділяють при підкисленні сечі з наступним фільтруванням або випаровуванням.

I спосіб

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: концентрована хлоридна кислота.

Обладнання: мірний циліндр, лійка, конічні колби на 50 мл, фільтри.

Хід роботи. До 20 мл сечі додати 2 мл концентрованої хлоридної кислоти і залишити в холодильнику протягом доби. На дні та стінках посудини утворюються кристали сечової кислоти, забарвлені пігментами сечі в темно-бурий колір. З отриманим осадом провести якісні реакції на сечову кислоту.

II спосіб

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 2% розчин хлоридної кислоти.

Обладнання: фарфорова чашка, мірний циліндр, водяна баня.

Хід роботи. У фарфорову чашку внести 5 мл сечі і випарити на водяній бані (при температурі не вище 70°C) до утворення сухого залишку, додати ще 5 мл сечі та повторно випарити. До сухого залишку додати 10 мл 2% розчину хлоридної кислоти і залишити на деякий час для кристалізації. Кристали сечової кислоти, що утворилися, використати для проведення якісних реакцій.

Дати відповіді на запитання

1. Які сполуки є попередниками утворення сечової кислоти?
2. Чому для виділення сечової кислоти необхідне кисле середовище?
3. Який вид патології пов'язаний з порушенням метаболізму пуринів?

Дослід 2. Якісні реакції на сечову кислоту

а. Дослідження відновних властивостей сечової кислоти

Принцип методу: сечова кислота при нагріванні в лужному середовищі відновлює купрум (II) гідроксид до купрум (I) оксиду, який має цегляно-червоне забарвлення.

Матеріал для дослідження: сечова кислота.

Реактиви: 10% розчин натрій гідроксиду, 1% розчин купрум (II) сульфату.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, спиртівка.

Хід роботи. Кристали сечової кислоти з попередньої роботи внести в чисту пробірку, додати 2 мл 10% розчину натрій гідроксиду і по краплях 1% розчин купрум (II) сульфату до утворення блакитного осаду купрум (II)

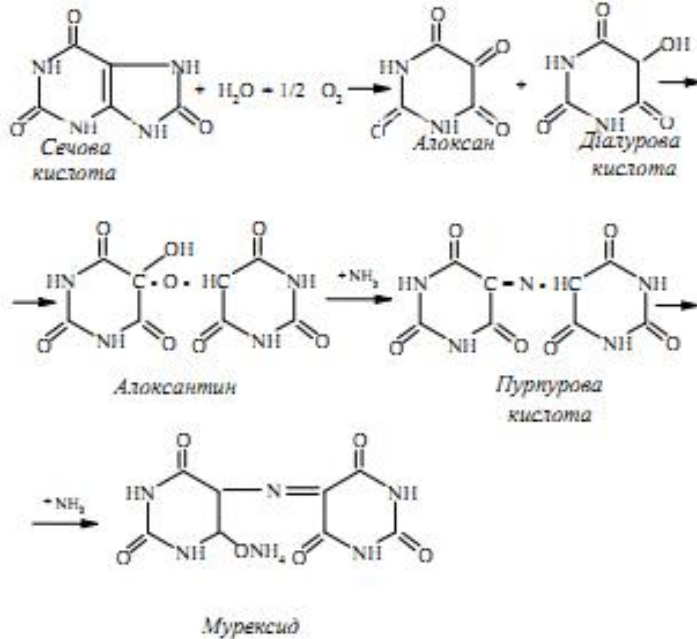
гідроксиду, який при перемішуванні не зникає. Пробірку прогріти на спиртівці та спостерігати за зміною забарвлення.

Дати відповіді на запитання

1. Чим зумовлені відновні властивості сечової кислоти?
2. Який фермент забезпечує перетворення ксантину в сечову кислоту?
3. Записати хімізм реакції за схемою: сечова кислота $1\text{Mn} + \text{CO}_2$.

б. Мурексидна проба

Принцип методу: сечова кислота за присутності нітратної кислоти розкладається з утворенням алоксану і діалурової кислоти, які далі утворюють комплекси пурпурно-червоного кольору:



Мурексидну пробу використовують для визначення сечової кислоти в сечових каменях.

Матеріал для дослідження: сечова кислота.

Реактиви: концентрована нітратна кислота, 25% розчин аміаку, 10% розчин натрій гідроксиду.

Обладнання: фарфорова чашка, водяна баня, піпетки.

Хід роботи. У фарфорову чашку внести кілька кристалів сечової кислоти, додати 2-3 краплі концентрованої нітратної кислоти і обережно випарити на водяній бані (при температурі не вище 70°C). Після охолодження до сухого коричнево-червоного залишку, який містить продукти окиснення і гідратації сечової кислоти, на один його бік додати 1 краплину 25% розчину аміаку, на інший – 1 краплину 10% розчину натрій гідроксиду. За цих умов з аміаком утворюється пурпурно-червоне забарвлення мурексиду, а з розчином луку – фіолетове забарвлення.

Дати відповіді на запитання

1. Які властивості сечової кислоти зумовлюють позитивну мурексидну пробу?
2. Яке клінічне значення мурексидної проби?
3. Пояснити принцип мурексидної проби.

Дослід 3. Кількісне визначення вмісту сечової кислоти в сечі

І спосіб

Принцип методу: сечова кислота відновлює фосфорно-вольфрамовий реактив, внаслідок чого утворюються оксиди вольфраму з нижчим ступенем окиснення, комплекси яких забарвлені в синій колір. Інтенсивність забарвлення пропорційна вмісту сечової кислоти.

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: насичений розчин натрій карбонату, реактив Фоліна, дистильована вода.

Обладнання: мірні пробірки на 10 мл, піпетки, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи. Взяти дві мірні пробірки на 10 мл: в першу (контрольну) внести 1,5 мл води, а у другу (дослідну) - 1,5 мл розведеної в 50 разів сечі. В кожену пробірку додати по 0,7 мл насиченого розчину натрій карбонату і 0,05 мл реактиву Фоліна, перемішати. Загальний об'єм рідини довести дистильованою водою до 10 мл.

Визначити екстинкцію дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту сечової кислоти, яка виділяється з сечею за добу, провести за формулою:

$$C = \frac{a \cdot b \cdot v}{1,5 \cdot 1000} \text{ мг, де}$$

а – вміст сечової кислоти у пробі, яку знаходять за калібрувальною кривою (мкг);

б – розведення сечі;

в – об'єм сечі, що виділяється за добу (мл);

1,5 – об'єм сечі, взятої для аналізу (мл);

1000 – коефіцієнт перерахунку мікрограмів у міліграми.

Для побудови калібрувальної кривої необхідно приготувати серію робочих розчинів сечової кислоти різної концентрації.

Для приготування робочого стандартного розчину, який в 1 мл містить 0,02 мг сечової кислоти, необхідно 5 мл основного стандартного розчину сечової кислоти (20 мг%) внести в мірну колбу на 50 мл і довести дистильованою водою до позначки.

У 7 пронумерованих пробірок на 10 мл внести: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 і 2 мл робочого стандартного розчину сечової кислоти, що відповідає 2, 4, 8, 12, 16, 20 і 40 мкг сечової кислоти. В кожену пробірку додати по 0,7 мл насиченого розчину натрій карбонату і 0,05 мл реактиву Фоліна. Об'єм у пробірках довести дистильованою водою до 10 мл.

Визначити екстинкцію стандартних проб на ФЕК за тих же умов, що і дослідної проби.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації сечової кислоти, а на осі ординат - відповідні їм значення екстинкції.

Дати відповіді на запитання

1. Чи залежить рівень екскреції сечової кислоти від характеру дієти?
2. Яке діагностичне значення має визначення вмісту сечової кислоти в біоматеріалі?
3. Який вплив на організм виявляє значне підвищення чи зниження рівня сечової кислоти у крові?
4. Пояснити вираз «гіперурикемія». Причини її розвитку.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №15

ТЕМА: Анаболічні процеси обміну нуклеїнових кислот

Теоретичний практикум

1. Біосинтез пуринових нуклеотидів (повторне використання, синтез de novo).
2. Біосинтез піримідинових нуклеотидів.
3. Синтез ДНК: механізм синтезу, ДНК-репліказна система, особливості реплікації.
4. Етапи синтезу ДНК.
5. Синтез РНК на матриці РНК.
6. Біосинтез РНК на матриці ДНК.
7. РНК-полімераза.
8. Етапи синтезу РНК.

Вправи:

1. Записати початкові реакції синтезу пуринових основ, вказати ферменти.
2. Які особливості синтезу нуклеозидмонофосфатів пуринового і піримідинового ряду.
3. Записати перетворення за схемою: УМФ — ЦМФ — ЦДФ — ЦТФ.
4. Пояснити роль 5-фосфорибозил-1-пірофосфату в біосинтезі пуринових та піримідинових нуклеозидмонофосфатів. Записати відповідні реакції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ

Основна:

1. Біохімія: Тестовий контроль знань: Навч. пос. / Кучеренко М.Є., Пащенко О.Ю. та ін. – К.: Либідь, 1995. – 344с.
2. Боечко Ф.Ф. Біологічна хімія: Навч. пос. 2-ге видання, перероб. і доповн. – К.: Вища школа., 1995. – 536с.
3. Кучеренко М.Є., та ін. Біохімія. Програмований контроль знань із застосуванням ЕОМ. – К.: Либідь, 1993. – 203с.
4. Кучеренко Н.Е. Деловые игры и ситуационные задачи. – К.: Лыбидь, 1992. – 190с.
5. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимова. – М.: Высш. школа, 1986. – 547с.
6. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. – М.: Высш. школа, 1985. – 503с.
7. Филиппович Ю.Б. и др. Практикум по общей биохимии. – М.: Просвещение, 1982. – 318с.
8. Филиппович Ю.Б., Севастьянова Г.А., Щеголева Л.И. Упражнения и задачи по биологической химии. – М.: Просвещение, 1986. – 151с.

Додаткова:

1. Агапов Ю.Я. Кислотно-щелочной баланс. – М.: Медицина, 1968. – 184с.
2. Алимова Е.К., Аствацатурьян А.Т., Жаров Л.В. Липиды и жирные кислоты в норме и при ряде патологических состояний. – М.: Медицина, 1975. – 280с.
3. Артюхов В.Г., Шмелева Т.А., Шмелев В.П. Биофизика. – Воронеж: Изд. Воронежского университета, 1994. – 336с.
4. Афонский С.И. Биохимия животных. – М.: Высшая школа, 1970. – 612с.
5. Ашмарин И.П. Молекулярная биология. – Ленинград: Медицина, 1974. – 360с.
6. Биофизика, книга 1. Учебное пособие для вузов. / Под ред. А.Б. Рубина. – М.: Высшая школа, 1987. – 365с.
7. Биохимия гормонов и гормональной регуляции / Под ред. Н.А. Юдаева. – М.: Наука, 1976. – 360с.
8. Бреслер С.Е. Молекулярная биология. – Ленинград: Наука, 1973. – 578с.
9. Буш Г. Гистоны и другие ядерные белки. – М.: Мир, 1967. – 286с.
10. Венкстерн Т.Б. Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1970. – 180с.
11. Витамины. Под общей редакцией М.И. Смирнова. – М.: Знание, 1984.
12. Вишняков С.И. Обмен макроэлементов у сельскохозяйственных животных. – Ленинград: Колос, 1967. – 256с.
13. Волькенштейн М.В. Биофизика. Учебное пособие для вузов. – М.: Наука, 1989. – 489с.
14. Волькенштейн М.В. Молекулярная биофизика. – М.: Наука, 1977. – 477с.
15. Гершкович А.А. Від структури до синтезу білка. – К.: Наукова думка, 1989. – 189с.

16. Гофман Э. Динамическая биохимия / Пер. с нем. А.И. Арчакова.. – М.: Медицина, 1971. – 310с.
17. Гутина В.Н. Биохимия анаэробного разложения углеводов. – М.: Наука, 1974. – 216с.
18. Джерард В. Химия органических соединений бора. – М.: Химия, 1966. – 318с.
19. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1985. – Т. 1, 2, 3.
20. Добрынина В.И. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1976. – 504с.
21. Дудкин М.С. Введение в химию углеводов. – Киев: Вища школа, 1976. – 176с.
22. Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1976. – 412с.
23. Дэгли С., Никольсон Д. Метаболические пути. – М.: Мир, 1973. – 312с.
24. Ермаков В.В., Ковальский В.В. Биологическое значение селена. – М.: Наука, 1974. – 298с.
25. Жеребцов П.И., Солнцев А.И., Вракин В.Ф. Обмен и биосинтез белков. – М.: Колос, 1968. – 160с.
26. Збарский Б.И., Иванов И.И., Мардашев С.Р. Биологическая химия. – Л.: Медицина, 1972. – 584с.
27. Ингрэм В. Биосинтез макромолекул. – М.: Мир, 1968. – 274с.
28. Ичас М. Биологический код. – М.: Мир, 1971. – 202с.
29. Клегг П., Клегг А. Гормоны, клетки, организм. – М.: Мир, 1971. – 280с.
30. Клотц И. Вода. Горизонты биохимии. – М.: Мир, 1964. – 456с.
31. Коломийцева М.Г., Габович Р.Д. Микроэлементы в медицине. – М.: Медицина, 1970. – 288с.
32. Кононський О.І. Біохімія тварин. – К.: Вища школа, 1994. – 439с.
33. Корнберг А. Синтез ДНК. – М.: Мир, 1977. – 360с.
34. Кравчинский Б.Д. Физиология водно-солевого обмена жидкостей тела. – Л.: Наука, 1963. – 311с.
35. Кретович В.Л. Введение в энзимологию. – М.: Знание, 1991.
36. Кретович В.Л. Основы биохимии растений. – М.: Высшая школа, 1973. – 464с.
37. Кучеренко М.Є. Біохімія нуклеїнових кислот. – К.: Вища школа, 1976. – 328с.
38. Кучеренко Н.Е., Войницкий В.М. Биоэнергетика. – К.: Вища школа, 1982. – 269с.
39. Ларский Э.Г. Методы зонального электрофореза. – М.: Медицина, 1971. – 112с.
40. Ленінджер А. Основи біохімії: В 3т. – М.: Мир, 1985. – Т. 1 – 3.
41. Мак Мюррей Обмен веществ у человека. – М.: Мир, 1985. – Т. 1 – 3.
42. Макаренченко А.Ф., Динабург А.Д., Лаута А.Д. Роль нейрогормональных систем гипоталамуса в физиологии и патологии. – Киев, Наукова думка, 1978. – 216с.
43. Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии. – М.: Мир, 1970. – 568с.
44. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: в 2

- томах (пер. с англ.). – М.: Мир, 1993. – 799с.
- 45.Меньшиков В.В. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований. – М.: Медицина, 1973. – 180с.
 - 46.Молекулярная биология клетки: в 5 т. / Альбертс Б., Хорст А., Моррей М. и др. – М.: Мир, 1986. – Т. 1 – 5.
 - 47.Молекулярные основы биосинтеза белков. – М.: Наука, 1989.
 - 48.Никольский Н.Н., Трошин А.С. Транспорт сахаров через клеточные мембраны. – Л.: Наука, 1973. – 222с.
 - 49.Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. – М.: Просвещение. 1987. – 815с.
 - 50.Певзнер Л. Основы биоэнергетики. – М.: Мир, 1990.
 - 51.Пронина Н.Н., Сулаквелидзе Т.С. Гормоны в регуляции водно-солевого обмена. – Л.: Наука, 1969. – 114с.
 - 52.Савронь Е.С. Биохимия животных. – М.: Высшая школа, 1966. – 504с.
 - 53.Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 392с.
 - 54.Сопін Є.Ф., Виноградова Р.П. Основи біохімічних методів дослідження. – К.: Вища школа, 1975. – 244с.
 - 55.Спирин А.С., Гаврилова Л.П. Рибосома. – М.: Наука, 1971. – 256с.
 - 56.Справочник биохимика (Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.) / Пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 544с.
 - 57.Степаненко Б.Н. Современные проблемы биохимии углеводов. – М.: Наука, 1979. – 55с.
 - 58.Степаненко Б.Н. Химия и биохимия углеводов (моносахариды). – М.: Высшая школа, 1977. – 224с.
 - 59.Строев В. Основы биохимии. – М.: Медицина, 1986. – С. 4 – 9.
 - 60.Тютюнников Б.Н. Химия жиров. – М.: Пищ. пром-сть, 1966. – 632с.
 - 61.Уильямс Б., Уилсон К. Методы практической биохимии. – М.: Мир, 1978. – 270с.
 - 62.Уильямс Д. Металлы жизни. – М.: Мир, 1975. – 236с.
 - 63.Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. – М.: Мир, 1978. – 720с.
 - 64.Файтельберг Р.О. Всасывание в желудочно-кишечном тракте. – М.: Медицина, 1976. – 264с.
 - 65.Фердман Д.Л. Биохимия. – М.: Высшая школа, 1966. – 644с.
 - 66.Философские вопросы естествознания. – М.: Просвещение, 1986. – С. 10 – 14.
 - 67.Чернявина И.А. Физиология и биохимия микроэлементов. – М.: Высшая школа, 1970. – 312с.
 - 68.Шамин А.Н. Химический синтез белка. – М.: Наука, 1969. – 116с.
 - 69.Шапвиль Ф., Энни А.Л. Биосинтез белка. – М.: Мир, 1977. – 316с.
 - 70.Шульц Г., Ширмер Т. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1980.