

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Учебно-методическое пособие

Издательско-полиграфический центр
Воронежского государственного университета
2012

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
БЕЛКИ И ИХ СВОЙСТВА	5
Работа 1. Цветные реакции на белки	7
Работа 2. Осаждение белков	8
Работа 3. Определение изоэлектрической точки белков	9
Работа 4. Определение содержания общего белка в сыворотке крови	11
Работа 5. Очистка растворов высокомолекулярных веществ от солей методом гель-фильтрации на сефадексе G-25	15
ФЕРМЕНТЫ	16
Работа 6. Влияние температуры, активаторов и ингибиторов на скорость ферментативной биохимической реакции. Определение специфичности амилазы слюны	18
Работа 7. Определение константы Михаэлиса и максимальной скорости ферментативной реакции	20
Работа 8. Определение типа ингибирования.....	22
Работа 9. Ферменты поджелудочной железы. Определение активности амилазы в сыворотке крови.....	23
Работа 10. Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови	28
Работа 11. Определение активности МВ-креатинкиназы в сыворотке крови	34
УГЛЕВОДЫ.....	36
Работа 12. Метаболизм глюкозы в организме человека и его нарушения. Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови и моче.....	39
Работа 13. Количественное определение пировиноградной кислоты в крови колориметрическим методом (по Умбрайту).....	45
Работа 14. Определение концентрации лактата в сыворотке крови.....	46
ЛИПИДЫ	48
Работа 15. Идентификация непредельных жирных кислот в жире	50
Работа 16. Качественные реакции на кетоновые тела в моче	51
Работа 17. Обмен холестерина в организме человека и его нарушения. Определение концентрации холестерина в сыворотке крови	52
Работа 18. Определение концентрации холестерина липопротеидов высокой плотности в сыворотке (плазме) крови	59
Работа 19. Определение концентрации холестерина липопротеидов низкой плотности в сыворотке (плазме) крови.....	60
НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ	62
Работа 20. Выделение и изучение химического состава дезоксирибонуклео- протеина из ткани селезенки.....	63

Белки обладают разнообразной структурой. Различают четыре уровня структурной организации белков: первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры. К первичной структуре белка относится аминокислотный состав, т.е. количество аминокислотных остатков, характер их связи и последовательность их расположения, характерная для данного белка. Первичная структура обеспечивается ковалентными пептидными связями.

Вторичная структура – регулярное размещение сегментов остова полипептидной цепи без учета конформации боковых цепей аминокислотных остатков. Известны три типа вторичной структуры: α -спираль, β -складчатый слой и беспорядочный клубок. α -Спираль – это спиральное строение в виде винтовой лестницы, где каждая ступень – определенная аминокислота. Витки спирали соединены между собой непрочными водородными связями $-\text{CO}\cdots\text{HN}-$, возникающими между карбонильным кислородом и иминным азотом, принадлежащим той же самой полипептидной цепи.

В β -складчатом слое две или более полипептидные цепи сложены зигзагом так, что их сегменты находятся вблизи друг от друга в параллельной или антипараллельной ориентации, причем соседние сегменты соединены водородными связями. Беспорядочный клубок – участки, которые нельзя отнести ни к α -спирали, ни к β -складчатому слою.

Третичная структура – расположение всех ковалентно связанных атомов данной полипептидной цепи в пространстве без учета взаимодействия с другими субъединицами. В формировании третичной структуры участвуют дисульфидные, псевдопептидные, ионные, водородные, вандерваальсовы и гидрофобные взаимодействия, обусловленные неполярными боковыми группами пептидных цепей.

Аминокислотная последовательность во внешних α -спиралях часто характеризуется периодичностью. Каждое третье или четвертое положение в них занимает аминокислота с неполярными боковыми группами, направленными внутрь глобулы, а остальные, как правило, полярны и обращены в сторону водной среды.

У крупных белков (более 200 аминокислотных остатков) может быть промежуточный уровень организации – домены. Домены – фрагменты полипептидной цепи, сходные по своим свойствам с самостоятельными глобулярными белками.

Четвертичная структура имеется только у белков, содержащих две или более пептидные цепи, которые образуют за счет слабых взаимодействий единую функционально активную белковую молекулу. Поэтому под четвертичной структурой подразумевают размещение субъединиц в пространстве со всей совокупностью контактов между ними. При возникновении этого уровня организации сохраняется потенциальная возможность разъединения субъединиц.

Для обнаружения белков существует две группы реакций: цветные реакции и реакции осаждения.

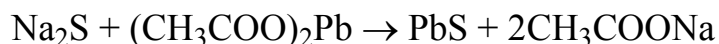
Работа 1. Цветные реакции на белки

1. *Биуретовая реакция*: обусловлена наличием пептидных связей в белках и полипептидах, благодаря которым в щелочной среде с солями меди образуют Cu-Na-комплексную соль полипептидов и белков сине-фиолетового цвета. К 1 мл раствора белка добавляют 1 мл 10%-го раствора NaOH и 1–2 капли 1%-го раствора CuSO₄. Появляется фиолетовое окрашивание.

2. *Ксантопротеиновая реакция* основана на способности присутствующих в молекуле белка ароматических аминокислот (тирозина, триптофана и фенилаланина) образовывать с концентрированной азотной кислотой при подогревании желтоокрашенные нитросоединения. К 1 мл раствора белка приливают 0,5 мл концентрированной HNO₃. Выпадает осадок, который при подогревании частично растворяется, при этом раствор приобретает желтую окраску. Если после охлаждения в пробирку добавить 1 мл концентрированного раствора аммиака, то желтое окрашивание переходит в оранжевое вследствие превращения нитропроизводных циклических аминокислот в соли хиноидной структуры. Фенилаланин лучше нитруется при добавлении смеси концентрированных HNO₃ и H₂SO₄.

3. *Реакция на триптофан*. К 1 мл раствора белка приливают 2 мл концентрированной HCl и нагревают, не доводя до кипения, чтобы не улетучился хлористый водород. Осадок, выпавший при добавлении кислоты, при подогревании растворяется, и жидкость окрашивается в фиолетовый цвет. Эта реакция указывает на наличие в яичном белке не только триптофана, но и углеводов: триптофан реагирует с оксиметилфурфуролом, образующимся из моносахаридов, в результате чего возникает фиолетово-красное соединение.

4. *Реакция с ацетатом свинца*. Положительная реакция указывает на наличие в белковой молекуле атомов серы цистеина и цистина. К 1 мл раствора белка добавляют 2 мл 1%-го NaOH, перемешивают, кипятят 2–3 мин, затем прибавляют 1–2 капли 5%-го (CH₃COO)₂Pb и продолжают нагревать до выпадения черного осадка PbS. Реакция идет по следующему уравнению:



5. *Нингидриновая реакция* указывает на присутствие в аминокислотах α-аминогрупп. При этом происходит выделение CO₂. К 0,2–0,5 мл раствора аминокислот прибавляют 2–3 капли 0,1%-го ацетонового раствора нингидрина, кипятят 2 мин. Появляется сине-фиолетовое окрашенное соединение вследствие взаимодействия двух молекул нингидрина с аминокислотой.

6. *Реакция Шульце – Распайля* обусловлена наличием в белке остатков триптофана. Эта аминокислота, взаимодействуя с оксиметилфурфуролом, дает продукты конденсации, окрашенные в вишнево-красный цвет. Оксиметилфурфурол в этой реакции образуется из гексоз (быстрее из

фруктозы), получающихся при гидролизе сахарозы под влиянием концентрированной H_2SO_4 . К 1 капле неразбавленного яичного белка добавляют 1–2 капли 10%-го раствора сахарозы и пипеткой осторожно подслаивают около 1 мл концентрированной H_2SO_4 . Легким встряхиванием пробирки смешивают обе жидкости, появляется вишнево-красное окрашивание. Реакция идет с выделением тепла.

Работа 2. Осаждение белков

Характерным свойством белковых веществ является их способность осаждаться из растворов под воздействием различных факторов среды. Осаждение белков нейтральными солями («высаливание»), например $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , Na_2SO_4 , нашло широкое применение в их очистке, поскольку после удаления соли белки восстанавливают свои биологические функции. Осаждение белков при высаливании происходит вследствие дегидратации молекул белков в присутствии ионов соли, конкурирующих с белками за молекулы воды. Сильной гидратационной способностью обладают также некоторые органические растворители. При нагревании белков, добавлении солей тяжелых металлов, экстремальных значениях pH и действии других факторов белки выпадают в осадок вследствие денатурации. Под денатурацией понимают негидролитическое разрушение белковой молекулы с деградацией ее вторичной и третичной структур. При этом ковалентная структура не претерпевает изменений, но биологическая функция у большинства белков утрачивается. Реакции осаждения белков используют в биохимической практике для удаления белковых веществ и для определения их содержания в биологическом материале (например, моче).

1. Осаждение белков кипячением. В пробирку наливают 1 мл раствора белка и нагревают до кипения. Происходит денатурация белка. Более полное осаждение белка достигается слабым подкислением его уксусной кислотой или добавлением других электролитов: в 1 мл раствора белка добавляют 1–2 капли 1%-го раствора уксусной кислоты и нагревают. Выпадает осадок белка. Явление денатурации (потеря нативных свойств) вызывается глубокими нарушениями структуры белка.

2. Осаждение белков солями тяжелых металлов. Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов адсорбируют их, образуя нерастворимые солеобразные и комплексные соединения.

К 1 мл раствора белка приливают по каплям 5%-й раствор CuSO_4 . Появляется осадок, растворяющийся в избытке реактива.

К 1 мл белка приливают по каплям 5%-й раствор ацетата свинца. Появляется осадок, растворяющийся в избытке реактива.

3. Осаждение белков реактивами на алкалоиды. К группе реактивов на алкалоиды принадлежит таннин, пикриновая кислота, железисто-синеро-