

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ
З КУРСУ “БІОХІМІЯ”
для студентів заочного відділення

Затверджено на засіданні
кафедри біохімії,
протокол № ____
від “__” _____ 2009

Упорядники:

к.б.н., асист. ГРЕБІНИК Д.М.,
асист. МОРГАСНКО О.О.
к.б.н., доц. СКОПЕНКО О.В.

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ СТУДЕНТІВ В УЧБОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

1. При роботі у лабораторії виконуйте тільки ту роботу, яку вам доручено. Категорично забороняється робити інші роботи.
2. Під час виконання роботи не ходіть без діла по лабораторії, цим Ви відволікаєте увагу товаришів і залишаєте без нагляду свою роботу.
3. На робочому місці не повинно бути непотрібних для роботи речей (сумок, портфелів і т.п.).
4. Не заходьте у лабораторію, де не працює ваша група.
5. При використанні речовин для досліду звертайте увагу на етикетку, в разі сумніву, звертайтеся до викладача або лаборанта.
6. Перед тим як приступити до роботи, уважно ознайомтесь із завданням та правилами техніки безпеки, обладнанням, матеріалами.
7. Хімічні реакції необхідно виконувати в такій кількості та концентрації, в такому посуду і приладах, в тих умовах, що вказані у методичній літературі.
8. Нагрівати рідину в пробірці треба поступово, спрямовуючи отвір пробірки в напрямку від себе і свого товариша тому, що внаслідок перегріву може відбутися викид рідини.
9. Не нахилятися над пробіркою, в якій кипить рідина.
10. Нюхати речовини у лабораторії треба спрямовуючи до себе пари рухом руки.
11. Ніяких речовин у лабораторії не пробувати на смак, а також не пити з хімічного посуду.
12. Досліди з леткими речовинами проводити у витяжній шафі.
13. Роботи з бензолом, ефіром та спиртом треба проводити на відстані від полум'я, у витяжній шафі.
14. Розчиняти сірчану кислоту у воді треба шляхом додавання кислоти до води по краплинах, весь час перемішуючи розчин. Майте на увазі, що при розчиненні сірчаної кислоти відбувається розігрів розчину.
15. Виливати у раковину кислоти та лужні розчини треба після їх нейтралізації лугом чи кислотою відповідно
16. Розлиті кислоти та лужні розчини треба засипати піском або нейтралізувати і тільки після цього проводити прибирання.
17. Відразу ж повідомляйте викладача або лаборанта про помічені недоліки і порушення правил безпеки.
18. По закінченню роботи треба привести в порядок своє робоче місце, вимити посуд. Після приведення робочого місця в належний порядок треба заявити лаборанту або викладачу про закінчення роботи, підписати зошит і тільки після цього залишити лабораторію.

СУВОРО ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ

1. Вмикати силові та освітлювальні рубильники без дозволу.
2. Проводити роботи з хімічними речовинами у лабораторіях без загальної приточно-витяжної вентиляції.

3. Тримати у приміщенні особистий одяг та інші речі.
 4. Їсти у приміщенні.
 5. Залишати без догляду запалені горілки та нагрівальні прилади.
 6. Проводити роботу без наявності спецодягу (халатів).
 7. При роботі з ртуттю наливати її в прилад без дозволу керівника, брати ртуть руками.
 8. Набирати рідини піпеткою ротом.
 9. Працювати з незаземленим обладнанням.
 10. Залишатися працювати в лабораторії одному. Обов'язкова присутність другої особи для надання допомоги.
- НЕАКУРАТНІСТЬ, НЕУВАЖНІСТЬ, НЕДОСТАТНЄ ЗНАННЯ РОБОТИ ПРИЛАДІВ ТА ВЛАСТИВОСТЕЙ РЕЧОВИН, ПРАВИЛ БЕЗПЕКИ МОЖЕ ПРИВЕСТИ ДО НЕЩАСНИХ ВИПАДКІВ !!!**

РЕЧОВИНИ, ЯКІ ВИМАГАЮТЬ ОБЕРЕЖНОГО ПОВЕДІННЯ:

1. **АЗОТНА КИСЛОТА.** Концентрована кислота викликає опіки шкіри. Пари азотної кислоти здійснюють подразнюючу дію на дихальні шляхи та очі. Азотна кислота може вибухати при взаємодії зі скипидаром та спиртом. Також з солями пікринової кислоти, карбідами та порошками металів.
2. **АЦЕТОН.** Летка речовина. Зберігати у склянках з притертою пробкою. При пожежі краще використовувати воду у розпиленому стані.
3. **ЛУГИ.** При попаданні на шкіру та слизові оболонки викликають сильні опіки. Їх треба зберігати у сухому місці, ізолювано від води та обігріву.
4. **КАЛІЙ МАРГАНЦЕВОКИСЛИЙ.** Вибухає при обробці концентрованою сірчаною кислотою, спиртом, ефіром та горючими речовинами.
5. **КАЛІЙ ТА НАТРІЙ АЗОТНОКИСЛИЙ.** Можуть викликати подразнення шкіри. Легко запалюються. Зберігати треба у сухому місці, у скляному посуді.
6. **СІРЧАНА КИСЛОТА.** При попаданні на шкіру викликає тяжкі опіки. Пари сірчаної кислоти можуть викликати подразнення слизових оболонок. Гасити треба піском або золою, застосовувати воду не можна.
7. **СОЛЯНА КИСЛОТА.** Викликає опіки шкіри. Пари викликають сильні опіки слизових оболонок. При пожежі застосовують воду, або нейтралізуючи речовини (сода).
8. **ОЦТОВА КИСЛОТА.** Може викликати тяжкі опіки шкіри. Їх пари викликають подразнення слизових оболонок. При взаємодії з азотною кислотою та пероксидом натрію може виникнути спалах. Гасити водою.

ПЕРША ДОПОМОГА ЗА НЕЩАСНИХ ВИПАДКІВ

1. При опіках кислотами та лужними розчинами слід промивати пошкоджене місце сильним струмом води. Потім нейтралізувати кислоту — 1% розчином бікарбонату натрію, а луг — 1% розчином оцтової кислоти.

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

2. При отруєннях отруйними газами людину слід негайно вивести на свіже повітря. При послабленому диханні проводять штучне дихання. Потерпілому слід дати велику кількість молока та забезпечити спокій.

3. Після надання першої допомоги викликати швидку медичну допомогу в разі необхідності.

Тема 1. Вітаміни

Заняття № 1. Якісні реакції на водорозчинні вітаміни

Вітаміни – органічні біологічно-активні сполуки, що не синтезуються у організмі більшості ссавців та людини, але є критично необхідними для нормальної життєдіяльності організму. Тому вітаміни обов'язково повинні бути присутні в раціоні у певних, як правило, незначних, кількостях. Основна біологічна роль більшості вітамінів полягає у їх коферментній функції (їх активовані форми виступають кофакторами ферментів – оксидоредуктаз, трансфераз, ліаз, ізомераз, лігаз), а також - антиоксидантних властивостях, забезпеченні зорових процесів, згортання крові, тощо.

Водорозчинні вітаміни – група органічних сполук різної структури, які розчиняються у воді, сюди належать вітаміни групи В – В1 (тіамін), В2 (рибофлавін), В3 (пантотенова кислота), В6 (піридоксаль), В7 (фолієва кислота), В12 (кобаламін); також до цієї групи належать вітаміни РР (нікотинова кислота та нікотинамід), С (аскорбінова кислота), Н (біотин).

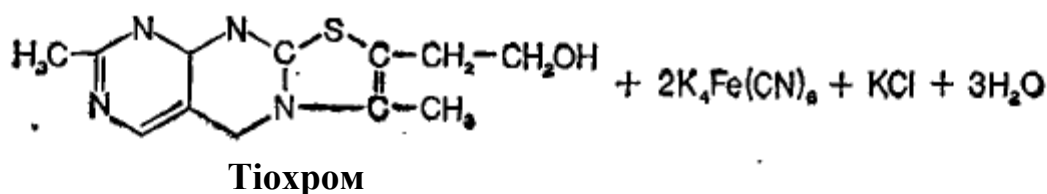
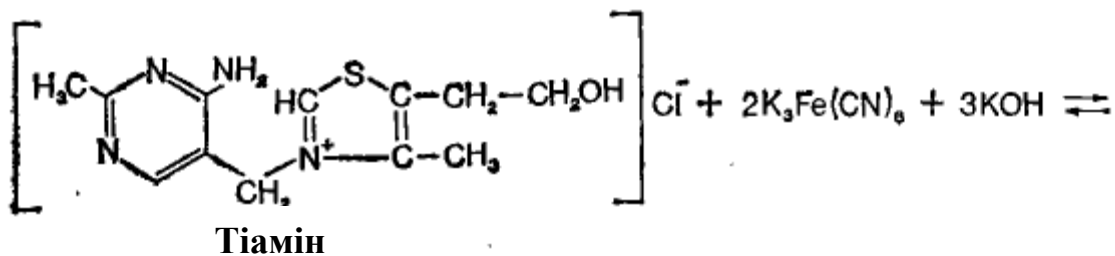
Жиророзчинні вітаміни – група органічних сполук, що містять ізопренові одиниці і мають ліпофільну природу. Серед них виділяють вітаміни А (ретинол, ретиналь, ретиноева кислота), D (кальциферолі), Е (токоферолі), К (філо- та менахінон).

Вітаміноподібні сполуки – до них належать вітаміни групи F (незамінні жирні кислоти), а також вітаміни Q (убіхінон), Р (рутин) та U (метилметіонін).

Дослід 1. Якісна реакція на вітамін В1 (тіамін)

Принцип методу.

Вітамін В1 у лужному середовищі під дією гексаціано-VI-ферату калію окислюється в тіохром - пігмент жовтого кольору, який у ізобутиловому спирті зумовлює інтенсивно синю флуоресценцію.



Матеріали та реактиви.

Розчин тіаміну (5 мкг у 1 мл – одна ампула),
 1 %-й розчин $K_3Fe(CN)_6$,
 30 %-й розчин NaOH,
 ізобутиловий спирт.

Обладнання.

Джерело ультрафіолетового випромінювання (флуороскоп), штатив із пробірками, піпетки.

Хід роботи.

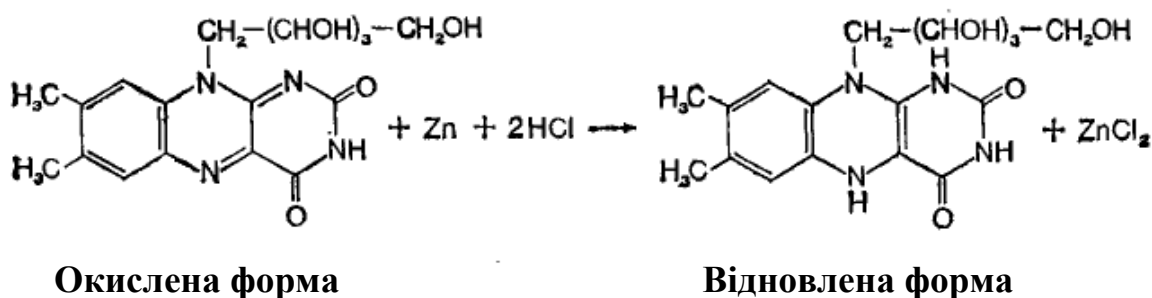
До 1 мл розчину вітаміну B1, додають 2 мл суміші (1 мл розчину $K_3Fe(CN)_6$ і 1 мл розчину NaOH), інтенсивно перемішують і залишають на 3 хв. Потім додають 5 мл ізобутилового спирту та інтенсивно струшують протягом 2 хв.

Очікуваний результат.

Інтенсивна синя флуоресценція отриманого розчину, видима під флуороскопом (в ультрафіолетовому промінні).

Дослід 2. Якісна реакція на вітамін B2 (рибофлавін)**Принцип методу.**

Під час змішування металічного цинку з концентрованою соляною кислотою утворюється водень, який відновлює жовтий рибофлавін спочатку на родофлавін (проміжна сполука) червоного кольору, а потім на безбарвний лейкофлавін.

**Матеріали та реактиви.**

Концентрована соляна кислота,
 металічний цинк,
 0,025 %-й розчин вітаміну B2 (суспензія рибофлавіну у воді, одна ампула).

Обладнання.

Штатив із пробірками, піпетка.

Хід роботи.

В пробірку вливають **1 мл розчину вітаміну В2, 0,5 мл концентрованої соляної кислоти** й кидають **грудочку металічного цинку**.

Очікуваний результат.

Рідина у пробірці поступово забарвлюється в рожевий колір, а потім знебарвлюється. Під час збовтування знебарвлений розчин лейкофалівну знову окислюється киснем повітря до рибофлавіну.

Дослід 3. Якісна реакція на вітамін РР (антипелагричний вітамін)**Принцип методу.**

Під час нагрівання вітаміну РР із розчином ацетату міді утворюється погано розчинний осад мідної солі вітаміну РР синього кольору.

Матеріали та реактиви.

Порошок вітаміну РР (або одна ампула),
10 %-й розчин оцтової кислоти,
5 %-й розчин ацетату міді.

Обладнання.

Штатив із пробірками, піпетки.

Хід роботи.

В пробірку вносять **5—10 мг вітаміну РР** і розчинюють під час нагрівання в 1 - 2 мл розчину оцтової кислоти, або **вміст однієї ампули вітаміну (1 мл)**. До нагрітого до кипіння розчину додають **такий же об'єм розчину ацетату міді**.

Очікуваний результат.

Рідина стає каламутною й набуває блакитного кольору, а через деякий час випадає синій осад.

Дослід 4. Якісна реакція на вітамін В6 (піридоксин)**Принцип методу.**

Під час взаємодії піридоксину з розчином хлориду заліза рідина забарвлюється в червоний колір завдяки утворенню комплексної солі типу феноляту заліза.

Матеріали та реактиви.

Водний розчин (1 %-й) вітаміну B₆,
1 %-й розчин FeCl₃.

Обладнання.

Штатив із пробірками, піпетки.

Хід роботи.

У пробірці перемішують 1 мл водного розчину піридоксину та дві краплі розчину хлориду заліза.

Очікуваний результат.

Рідина забарвлюється в червоний колір.

Дослід 5. Якісні реакції на вітамін С (аскорбінову кислоту)

Принцип методу.

Аскорбінова кислота може легко вступати в окисно-відновні реакції й відновлювати 2,6-дихлорфеноліндофенол, гексоціано-(III)-ферат калію, нітрат срібла, метиленовий синій. При цьому окислена форма 2,6-дихлорфеноліндофенолу (синього кольору) та метиленовий синій відновлюється на безбарвні лейкосполуки, а K₃Fe(CN)₆ - на K₄Fe(CN)₆, який з йонами валентного заліза утворює сіль Fe₄[Fe(CN)₆]₃ синього або зеленого кольору.

Матеріали та реактиви.

Розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу (0,1 %-й),
10 %-й розчин соляної кислоти,
0,1 %-й розчин аскорбінової кислоти,
0,01 %-й розчин метиленового синього,
10 %-й розчин Na₂CO₃,
1 %-й розчин K₃Fe(CN)₆,
1 %-й розчин FeCl₃.

Обладнання.

Штатив із пробірками, крапельниця, піпетки, термостат.

Хід роботи.

А. Реакція з 2,6-дихлорфеноліндофенолом. У пробірку вносять **0,5 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу**, одну-дві краплини розчину HCl і по краплях розчин аскорбінової кислоти.

Б. Реакція з метиленовим синім. У дві пробірки вносять по краплині розчину метиленового синього та по краплині розчину бікарбонату натрію. У першу додають п'ять краплин розчину аскорбінової кислоти, в другу - п'ять краплин води й залишають у термостаті ($37\text{—}40^\circ\text{C}$).

В. Реакція з гексаціано-(III)-фератом калію. До **1 мл розчину аскорбінової кислоти** додають **1 мл розчину $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$** і **0,5 мл розчину FeCl_3** .

Очікувані результати.

А. Розчин знебарвлюється.

Б. Через деякий час у пробірці з розчином аскорбінової кислоти рідина знебарвлюється.

В. Спостерігають утворення синьо-зеленого забарвлення.

Заняття № 2. Кількісне визначення водорозчинних вітамінів.

Дослід 1. Кількісне визначення вітаміну Р (рутину) у чаї за методом Левенталю.

Принцип методу.

Метод ґрунтується на здатності рутину окислюватися перманганатом калію. Індикатором є індигокармін, який вступає в реакцію з KMnO_4 після того, як окислиться весь рутин. Встановлено, що 1 мл 0,02 моль/л розчину перманганату калію окислює 6,4 мкг рутину.

Матеріали та реактиви.

Чай або готовий екстракт,
0,01 моль/л - розчин перманганату калію,
розчин індигокарміну.

Обладнання.

Мікро піпетка (або бюретка), піпетки, склянки або колбочки.

Хід роботи.

Чай (100 мг) заливають **50 мл гарячої дистильованої води** й кип'ятять протягом **5 хв.** Одержаний екстракт охолоджують, відбирають **10 мл** і

переносять у колбу або склянку, куди наливають **ще 10 мл дистильованої води** та п'ять крапель індигокарміну (з'являється синє забарвлення). Рідину у колбі титрують розчином KMnO_4 , інтенсивно помішуючи, до появи стійкого жовтого забарвлення.

Обробка результатів.

Різниця кількості розчину KMnO_4 , витраченого на титрування дослідної проби - це об'єм 0,01 моль/л розчину KMnO_4 , який потрібен для окислення рутину.

Для підрахунку **вмісту вітаміну Р, мкг**, використовують таку **формулу**:

$$x = \frac{AV_1k}{V_2P},$$

де:

k - стандартний коефіцієнт титрування (3,2),

A - кількість 0,01 моль/л розчину KMnO_4 , використана для титрування, **мл**,

V₁ - об'єм, у якому розчинена проба для аналізу, **мл**,

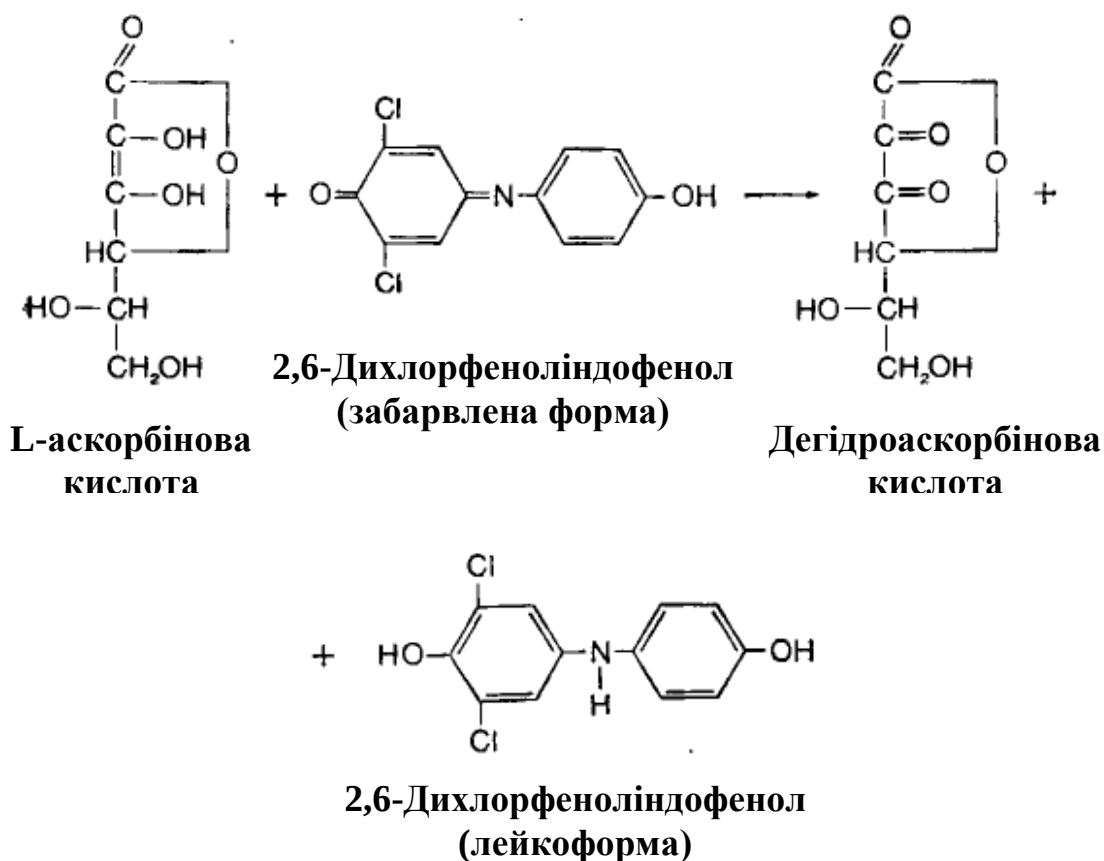
V₂ - об'єм розчину, взятого для титрування, **мл**,

P - кількість сухої речовини, **г**, взятої для аналізу.

Дослід 2. Кількісне визначення вітаміну С (аскорбінової кислоти) за методом Тильманса.

Принцип методу.

Метод ґрунтується на здатності аскорбінової кислоти окислюватися 2,6-дихлорфеноліндофенолом до дегідроаскорбінової кислоти. За кількістю 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витраченого для титрування, визначають кількість аскорбінової кислоти в досліджуваному матеріалі. Коли весь вітамін С окислиться, розчин, що титрується, набуде рожевого кольору за рахунок утворення недисоціюючих молекул 2,6-дихлорфеноліндофенолу (у кислому середовищі). У лужному середовищі 2,6-дихлорфеноліндофенол має синє забарвлення, у кислому — червоне, а після відновлення знебарвлюється.



Матеріали та реактиви.

Соляна кислота (2 %-й розчин),
натрієва сіль 2,6-дихлорфеноліндофенолу (0,0005 моль/л розчин, молекулярна маса — 290, грам-еквівалент—145),
дослідний біологічний матеріал (капуста, шипшина, картопля, хвоя).

Обладнання.

Фарфорова ступка з пестиком, колби, мікробюретка, склянка для титрування, піпетки, лійка, ваги.

Хід роботи.

У фарфоровій ступці ретельно розтирають 1 г дослідного матеріалу. До розтертої маси додають 9 мл розчину соляної кислоти, відстоюють і через 10 хв фільтрують. Для кількісного визначення беруть 3 мл фільтрату, вносять у колби й титрують розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке зберігається протягом 30 сек.

Обробка результатів.

1 мл 0,0005 моль/л розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти.

Масову концентрацію аскорбінової кислоти, мг, розраховують за формулою:

$$C = \frac{QAV_0}{V_1a},$$

де:

Q - кількість аскорбінової кислоти (**0,088 мг**), яка відповідає **1 мл 0,0005 моль/л розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу**,

A – кількість **0,0005 моль/л розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу**, витрачена на титрування, **мл**,

V₀ – загальна кількість екстракту, **мл**,

V₁ – об'єм екстракту, взятий для титрування, **мл**,

a – маса дослідного біологічного матеріалу, **г**.

Тема 2. Ферменти (ензими)

Заняття № 1. Дія ферментів.

Ферменти (ензими) – біологічні каталізатори білкової природи, що синтезуються у живому організмі, значно прискорюють реакції клітинного метаболізму та характеризуються складними механізмами регуляції власної дії.

Основними рисами, що відрізняють ферменти від звичайних каталізаторів є надзвичайне прискорення швидкості реакцій (до 1-10 млрд. каталітичних актів за секунду - супероксиддисмутаза), дія за м'яких умов живого організму, майже 100% ефективність та продуктивність каталізу, специфічність лише до певних видів субстрату (іноді до єдиного – **абсолютна специфічність**), наявність **ланцюжків або комплексів** з декількох ферментів, що приймають участь у **послідовному каталізі** реакцій певного біохімічного шляху, **складні механізми регуляції** активності ферментів.

Ферменти, як білкові сполуки, є **особливо чутливими до умов середовища** – кожен з ферментів характеризується певними чітко визначеними **оптимумами температури, рН, йонної сили** – параметрами, за яких активність ферменту є оптимальною.

Виділяють **шість основних класів ферментів** – **оксидоредуктази** (каталіз окисно-відновних реакцій), **трансферази** (міжмолекулярне перенесення груп), **гідролази** (гідролітичне розщеплення субстратів), **ліази** (не гідролітичне розщеплення, приєднання або від'єднання груп за місцем подвійного зв'язку), **ізомерази** (внутрішньомолекулярне перенесення груп), **лігази** (утворення ковалентних зв'язків – синтез речовин з використанням енергії нуклеозидфосфатів).

Дослід 1. Дія амілази.

Принцип методу.

Амілаза є ферментом, який каталізує гідроліз α -глюкозидного зв'язку α -1-4-крохмалю та глікогену до проміжних продуктів - декстринів. Крохмаль утворює з йодом сполуки синього кольору, амілодекстрин - фіолетового, еритродекстрин - червоно-бурого, ахродекстрин - жовтого.

Матеріали та реактиви.

Розчин крохмалю (0,2 %-й),
0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-му розчині йодиду калію,
студентська слина.

Обладнання.

Штатив із пробірками, піпетки, крапельниці.

Хід роботи.

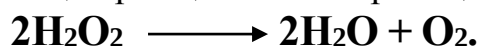
У дві пробірки наливають по 5 мл крохмального клейстеру, в одну з них додають 0,5 мл слини, яка містить амілазу, добре перемішують і залишають стояти за кімнатної температури. Через 15 хв у обидві пробірки додають по п'ять краплин розчину йоду.

Очікуваний результат.

В пробірці з амілазою слини розчин через 1 год знебарвлюється, а в пробірці без амілази колір розчину не змінюється, тобто залишається синьо-фіолетовим.

Дослід 2. Дія каталази.**Принцип методу.**

Каталаза прискорює реакцію розщеплення пероксиду водню на H_2O і O_2 :



У цій реакції одна молекула пероксиду водню окислюється і є донором електронів, а друга відновлюється і є акцептором електронів.

Матеріали та реактиви.

Препарат каталази з картоплі,
свіжоприготований розчин H_2O_2 (3%-й).

Обладнання.

Пробірки, крапельниці, піпетки.

Хід роботи.

В дві пробірки наливають по 5 мл розчину пероксиду водню. В одну з них додають 1 мл препарату каталази.

Очікуваний результат.

У пробірці з каталазою внаслідок утворення молекулярного кисню з'являється велика кількість бульбашок. У пробірці без каталази бульбашки газу не утворюються.

Дослід 3. Дія тирозинази.

Принцип методу.

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

Матеріали та реактиви.

Препарат тирозинази (10 г подрібненої картоплі розтирають у ступці з 30 мл води й фільтрують крізь два шари марлі),
насичений розчин тирозину.

Обладнання.

Фарфорова ступка з товкачиком, пробірки, піпетки, водяна баня, термостат (40 °C).

Хід роботи.

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

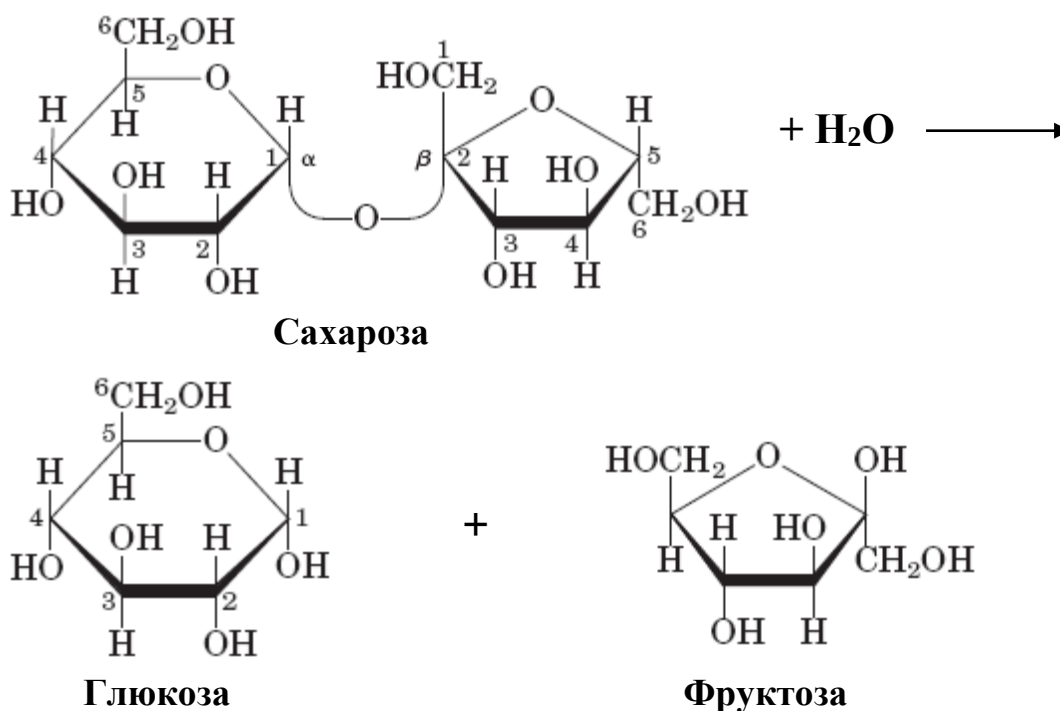
Очікуваний результат.

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

Дослід 4. Дія сахарази.

Принцип методу.

Сахараза каталізує гідроліз сахарози до глюкози та фруктози.



Моносахариди, які утворюються, визначають реакцією Фелінга. Сахароза не містить вільної альдегідної групи і тому не має відновних властивостей.

Матеріали та реактиви.

Препарат сахарози (5 г пивних дріжджів розтирають у фарфоровій ступці з 2 - 3 мл дистильованої води та невеликою кількістю скляного піску, додають 8 - 10 мл води та фільтрують через вату),

2 %-й розчин сахарози,

реактив Фелінга, який складається з двох розчинів - перед використанням змішують рівні об'єми цих розчинів.

Обладнання.

Пробірки, піпетки, фарфорова ступка з товкачиком, лійки, термостат, водяна баня, газовий пальник.

Хід роботи.

У дві пробірки наливають по 1 мл препарату ферменту. Вміст однієї з них (контроль) кип'ятять протягом 3 хв для руйнування сахарози, після чого в обидві пробірки додають (охолоджені) по 3 мл розчину сахарози, добре перемішують і ставлять у термостат за температури 38 °С. Через 15

хв у пробірки вносять по 2 мл реактиву Фелінга, перемішують і нагрівають до кипіння.

Очікуваний результат.

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

Заняття № 2. Властивості ферментів.

Дослід 1. Термолабільність ферментів. Вплив температури на активність амілази слини.

Принцип методу.

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

Матеріали та реактиви.

Розчин крохмалю (1 %-й),
студентська слина,
0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-му розчині йодиду калію,
лід.

Обладнання.

Штатив із пробірками, піпетки, водяна баня, термостат, скляні палички, скляні або фарфорові пластинки.

Хід роботи.

У чотири пронумеровані пробірки наливають по 5 мл розчину крохмалю. Пробірку 1 вміщують у киплячу водяну баню, пробірку 2 - у водяну баню за температури 40 °С, пробірку 3 залишають за кімнатної температури, а пробірку 4 ставлять у лід. Через 10—15 хв у всі пробірки, залишаючи їх за тих же умов, додають по 1 мл розчину слини та перемішують скляною паличкою. За гідролізом крохмалю стежать за реакцією з йодом. Для цього на скляну або фарфорову пластинку наносять кілька краплин розчину йоду й змішують їх із краплинами суміші, яку беруть з кожної пробірки через 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 хв.

Очікуваний результат.

За зміною забарвлення розчину крохмалю з йодом судять про гідроліз у кожній пробірці. У пробірці 1, що містилася на водяній бані за температури 100 °С, суміш забарвлюється в синій колір. Фермент у ній інактивований, і

гідроліз крохмалю не відбувається. В інших пробірках забарвлення залежить від ступеня гідролізу крохмалю: в пробірці 2 за оптимальної температури (40 °C) — жовте, в пробірках 3 і 4 колір розчинів може бути червоним чи фіолетово-червоним.

Дослід 2. Дія активаторів та інгібіторів на активність амілази слини.

Принцип методу.

Активатором амілази є NaCl, а інгібітором — CuSO₄. Вплив цих речовин на активність амілази визначають за ступенем гідролізу крохмалю під впливом ферменту за наявності NaCl і CuSO₄.

Матеріали та реактиви.

Препарат слини,
0,5 %-й розчин крохмалю,
0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-му розчині йодиду калію,
1 %-й розчин NaCl,
1 %-й розчин CuSO₄.

Обладнання.

Штатив із пробірками, піпетки, крапельниці, термостат.

Хід роботи.

Готують три пробірки. В першу наливають 2,5 мл води, в другу - 2 мл води та 0,5 мл розчину NaCl, у третю — 2 мл води та 0,5 мл розчину CuSO₄. У всі пробірки додають по 2,5 мл слини, перемішують, вносять по 2,5 мл розчину крохмалю, потім знову перемішують і ставлять у термостат за температури 38 °C. Через 5 хв додають по п'ять краплин розчину йоду.

Очікуваний результат.

Рідина в першій пробірці забарвлюється в фіолетовий або червоний колір, у другій — у червоний або жовтий, у третій — у синій. Одержані результати свідчать, що активатором амілази є NaCl (друга пробірка), а інгібітором — CuSO₄ (третя пробірка).

Дослід 3. Специфічність дії амілази та сахарози.

Принцип методу.

Амілаза розщеплює полісахарид крохмаль і не діє на дисахариди (мальтозу або сахарозу). Сахараза розщеплює тільки сахарозу й не розщеплює крохмаль та інші дисахариди.

Матеріали та реактиви.

Студентська слина,
0,5 %-й розчин крохмалю,
0,5 %-й розчин сахарози,
0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-му розчині йодиду калію,
реактив Фелінга,
препарат сахарози.

Обладнання.

Штатив із пробірками, піпетки, водяна баня, крапельниці, термостат.

Хід роботи.

У дві пробірки наливають по 3 мл розчину крохмалю. У першу додають 1 мл розчину слини (амілази), в другу — 1 мл препарату сахарози, потім перемішують і ставлять у термостат (38 °С).

У дві інші пробірки наливають по 3 мл розчину сахарози. У першу додають 1 мл препарату сахарози, а другу — 1 мл розчину слини й залишають за тих самих умов.

Через 5 хв у перші дві пробірки з крохмалем додають по п'ять краплин розчину йоду й спостерігають за забарвленням.

У двох інших пробірках дія ферменту виявляється за позитивною реакцією з реактивом Фелінга на наявність моносахаридів. Для цього в пробірки додають по 1 мл реактиву Фелінга та нагрівають до кипіння.

Очікуваний результат.

У пробірці з амілазою синє забарвлення розчину зникає внаслідок розщеплення крохмалю амілазою. У другій пробірці розчин має синій колір, тому що сахараза не діє на крохмаль.

Сахароза відновних властивостей не має, тому в пробірці, де під впливом сахарози сахароза розщепилася на глюкозу та фруктозу, спостерігається червоне забарвлення внаслідок утворення геміоксиду міді.

Заняття № 3. Визначення активності ферментів.

Дослід 1. Визначення активності амілази слини за методом Вольгемута.

Принцип методу.

Метод Вольгемута ґрунтується на визначенні мінімальної кількості ферменту, яка здатна за певних умов повністю гідролізувати 1 мл 0,1 %-го розчину крохмалю. Амілазна активність слини визначається кількістю 0,1 %-го розчину крохмалю, мл, яку може гідролізувати 1 мл нерозбавленої слини за температури 38 °С протягом 30 хв. У нормі амілазна активність становить 160 - 320. Метод Вольгемута широко застосовується в клінічній практиці для визначення амілазної активності крові та сечі, в пивоварінні - солоду. Різке підвищення амілазної активності крові та сечі (в 10 - 30 раз) спостерігається при гострих панкреатитах, пухлинах підшлункової залози.

Матеріали та реактиви.

Студентська слина,
0,1 %-й розчин крохмалю,
0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-му розчині йодиду калію.

Обладнання.

Штатив із пробірками, піпетки, крапельниці, термостат.

Хід роботи.

У десять пробірок наливають по **1 мл** дистильованої води. У першу додають **1 мл слини**, **перемішують** і **1 мл суміші** переносять у **другу пробірку**. Вміст цієї пробірки знову **перемішують**, **1 мл суміші** переносять у **третю пробірку** і так повторюють до десятої. З **останньої пробірки** відбирають **1 мл суміші** і **виливають** у раковину. Таким чином, у кожній наступній пробірці вміст ферменту вдвічі менший, ніж у попередній, і розведення слини в пробірках становитиме:

1 : 1,
1 : 2,
1 : 4,
1 : 8,
1 : 16,
1 : 32,
1 : 64,
1 : 128,
1 : 256,
1 : 512,
1 : 1024.

Далі в **усі пробірки** додають по **1 мл води** та по **2 мл розчину крохмалю**, **перемішують** і ставлять у термостат за температури **38 °С** на **30 хв**. Після інкубації пробірки **охолоджують водопровідною водою** для припинення дії ферменту, додають по **дві краплини розчину йоду**, добре збовтують і спостерігають за зміною забарвлення.

Обробка результатів.

Під час реакції з йодом рідина забарвлюється в жовтий, рожевий та фіолетовий кольори.

Зазначають, за якого розведення відбувся повний гідроліз крохмалю з мінімальним вмістом ферменту (пробірка з жовтуватим забарвленням рідини). За кількістю нерозведеної слини (A) в цій пробірці розраховують амілазну активність слини (A мл слини розщеплює x мл 0,1 %-го розчину крохмалю). Наприклад, жовтуватий колір з'явився в четвертій пробірці, де слина розведена в 16 разів. Ця кількість слини може гідролізувати 2 мл 0,1 %-го розчину крохмалю, а 1 мл нерозведеної слини за подібних умов гідролізує 32 мл :

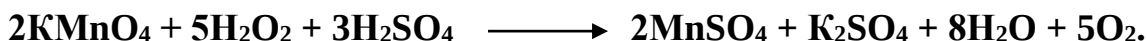
$$x = 2 \times \frac{16}{1},$$

Отже, амілазна активність слини дорівнює 32.

Дослід 2. Визначення активності каталази за методом Баха.

Принцип методу.

Метод ґрунтується на визначенні кількості перексиду водню, що залишилася після дії на нього каталази, титруванням розчином KMnO_4 у кислому середовищі. Ця реакція відбувається за рівнянням:



Матеріали та реактиви.

Препарат каталази - 20 г картоплі, нарізаної на шматки, розтирають у фарфоровій ступці з невеликою кількістю кварцового піску, настоюють у 100 мл води протягом 30 хв і фільтрують,

10 %-й розчин H_2SO_4 ,

0,1 %-й розчин H_2O_2 на фосфатному буфері, рН 7,0 (35,0 мл 0,2 моль/л Na_2HPO_4 і 13,6 мл 0,2 моль/л NaH_2PO_4),

0,002 моль/л розчин KMnO_4 .

Обладнання.

Колби об'ємом 100 мл, піпетки, бюретки, термостат.

Хід роботи.

В дві колби наливають по 5 мл препарату каталази, в одну з них (контрольна проба) додають 3 мл розчину H_2SO_4 . Потім в обидві колби вносять по 10 мл розчину перексиду водню та ставлять у термостат за температури 37 °С. Через 30 хв у другу колбу (досліджувана проба) додають 3 мл H_2SO_4 і титрують вміст обох колб (спочатку контрольної) розчином KMnO_4 до появи стійкого рожевого забарвлення від надлишку KMnO_4 .

Обробка результатів.

Зазначимо, що 1 мл 0,002 моль/л розчину KMnO_4 відповідає 1,7 мг H_2O_2 . Активність каталази визначають за кількістю H_2O_2 , що розклався, і розраховують за формулою:

$$C = (B - A) f Q,$$

де:

$(B - A)$ - різниця результатів титрування контрольного та досліджуваного зразків 0,002 моль/л розчином KMnO_4 , мл,

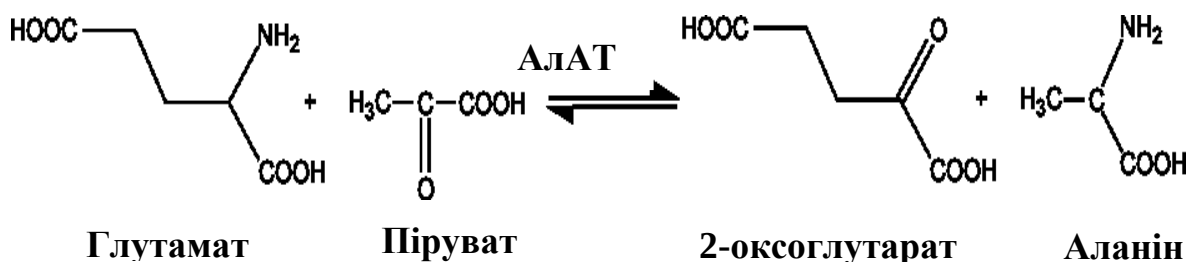
f - коефіцієнт поправки на титр 0,002 моль/л розчину KMnO_4 ,

Q - кількість пероксиду водню (1,7 мг), яка відповідає 1 мл 0,002 моль/л KMnO_4 .

Дослід 3. Визначення активності аланінамінотрансферази у сироватці крові щурів за методом Райтмана-Френкеля.

Принцип методу.

Внаслідок амінування 2-оксоглутарової кислоти через її реакцію з L-аланіном, що каталізована ферментом аланін амінотрансферазою (АлАТ), утворюються продукти реакції: L-глутамінова та піровиноградна кислоти:



Визначення активності АлАТ, таким чином, ґрунтується на результатах вимірювання оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразонів, які формуються з 2-оксоглутарової та піровиноградної кислот у лужному середовищі. Оскільки гідразон піровиноградної кислоти має найбільший коефіцієнт молярної екстинції, можливо виявити прямо пропорційну залежність екстинції розчину від кількості гідразону, а, отже, і активності АлАТ.

Матеріали та реактиви.

На побудову калібрувальної кривої: 0,4 н NaOH , субстратно-буферний розчин, калібрувальний розчин, дистильована вода або фізіологічний розчин, стоп-реагент.

На визначення: 0,4 н NaOH, субстратно-буферний розчин, фізіологічний розчин, сироватка крові, стоп-реагент.

Обладнання.

Штатив із пробірками, піпетки, крапельниці, термостат, кювети, КФК.

Хід роботи.

Перший етап – побудова калібрувальної кривої для визначення активності АЛАТ. У шість пробірок відміряють реактиви у необхідних об'ємах, користуючись наступною таблицею:

Відміряти у пробірку, мл	Калібрувальні проби					Контрольна проба
	1	2	3	4	5	
1. Субстратно–буферний розчин	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,5
2. Калібрувальний розчин	0,05	0,10	0,15	0,2	0,25	-
3. Дистильована вода або фіз. розчин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
4. Стоп-реагент	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Далі проби витримують 20 хв за кімнатної температури, потім додають у кожен з них (включаючи контроль) по 5 мл 0,4 н гідроксиду натрію. Після цього інкубують проби з лугом впродовж 10 хв. Оптичну щільність проб вимірюють проти контрольної на фотоелектроколориметрі у діапазоні довжин хвиль 540-640 нм. Згідно отриманих результатів вимірів будують калібрувальну криву, відкладаючи на осі абсцис величину активності АЛАТ, виражену у мікромолях пірувату у перерахунку на 1 мл сироватки за 1 годину інкубації, або у мікрокаталах на 1 л реакційної суміші.

З метою співвідношення активності АЛАТ з відповідним вмістом пірувату, визначеним фотокалориметрично, користуються наступною таблицею перерахунку:

	Калібрувальні проби					Контрольна проба
	1	2	3	4	5	
Вміст пірувату у пробі						
МКМОЛЬ	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,0
МКГ	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	0,0
Активність АЛАТ						
МКМОЛЬ/ГОД * МЛ	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	0,0
МККАТ/Л	0,278	0,556	0,833	1,11	1,39	0,0

Власне визначення активності АлАТ у сироватці крові щурів проводиться за двома методами аналізу згідно з таблицею, наведеною нижче:

Відміряти у пробірку, мл	Макро-аналіз		Мікро-аналіз	
	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль
Субстратно-буферний розчин	0,4	0,4	0,1	0,1
Фізіологічний розчин	-	0,08	-	0,02
Інкубація 3 хв у термостаті, 37° С				
Сироватка крові	0,08	-	0,02	-
Інкубація 30 хв у термостаті, 37° С				
Стоп-реагент	0,4	0,4	0,1	0,1
Інкубація 10 хв за кімнатної температури				
0,4 н NaOH	4,0	4,0	1,0	1,0

Далі проводять **фотоколориметричне визначення активності**, аналогічно до умов побудови калібрувальної кривої, дослідну пробу вимірюють проти контрольної.

Обробка результатів.

Значення активності АлАТ у дослідних пробах визначають за калібрувальною кривою і виражають у мікромолях пірувату у перерахунку на 1 мл сироватки за 1 годину інкубації.

Тема 4. Визначення вмісту метаболітів у біологічному матеріалі.

Дослід 1. Кількісне визначення молочної кислоти за методом Бюхнера.

У крові здорової людини міститься 1-2 ммоль/л молочної кислоти. Вміст лактату збільшується за умов інтенсивної роботи м'язів (фізична праця, тетанія), гіпоксії (легенева та серцева недостатність), утворення та росту злоякісних пухлин, розвитку печінкових захворювань.

Принцип методу.

Молочна кислота під час нагрівання з сірчаною кислотою перетворюється на оцтовий альдегід, взаємодіючи з гідрохіноном, утворює сполуку червоно-коричневого кольору, кількість якої піддається спектрофотометричному визначенню.

Матеріали та реактиви.

Стандартний розчин молочної кислоти,
гомогенат або сироватка крові,
концентрована метафосфорна кислота,
концентрована сірчана кислота,
10%-вий розчин сульфату міді
25%-вий розчин сульфату міді,
сухий гідроксид кальцію,
20%-вий спиртовий розчин гідрохінону,
дистильована вода.

Обладнання.

Штатив із пробірками, гумові корки, піпетки, скляні палички, фільтрувальний папір або вата, лійки, водяна баня, кювети, КФК.

Хід роботи.

У дві сухі пробірки наливають по 6 мл дистильованої води. У першу з пробірок (контрольну) додають 1 мл стандартного розчину лактату, у другу (дослідну) – 1 мг гомогенату тканини або 1 мл сироватки крові. Далі, для осадження білків у дослідній пробі у кожен з пробірок вносять по 1 мл метафосфornoї кислоти, струшують та залишають на 2-3 хв за кімнатної температури, після чого відфільтровують. До фільтрату в кожен з пробірок додають 1 мл 25%-вого розчину сульфату міді та 0,5 г сухого гідроксиду кальцію. Потім проби перемішують скляною паличкою, а через 5 хв фільтрують. У пробірки з притертими корками відміряють по 1 мл отриманого фільтрату, далі туди додають по 0,1 мл 10%-вого розчину сульфату міді та по 4 мл концентрованої сірчаної кислоти. Проби ставлять у киплячу водяну баню на 1,5 хв. Потім пробірки охолоджують та додають по 0,1 мл 20%-вого спиртового розчину гідрохінону, добре перемішують і кип'ятять на відкритому вогні протягом 15 хв. Далі проби фотоколіметрують з використанням червоного світлофільтра (за довжини хвилі 490-540 нм).

Обробка результатів.

Розрахунок концентрації молочної кислоти у біологічному матеріалі проводять за формулою:

$$C_{\text{досл}} = \frac{C_{\text{ст}} \times E_{\text{досл}}}{E_{\text{ст}}},$$

де:

$C_{\text{досл}}$ – концентрація молочної кислоти у дослідному біологічному матеріалі;

$C_{\text{ст}}$ – концентрація молочної кислоти у стандартному розчині;

$E_{\text{ст}}$ – оптична щільність стандартного розчину молочної кислоти;

$E_{\text{досл}}$ – оптична щільність дослідної проби.

Отриманий результат виражають у мг лактату на 1 мл розчину.

Дослід 2. Кількісне визначення кетонових тіл у сечі.

З сечею здорової людини виділяється 20-40 мг/добу кетонових тіл. Явища підвищення вмісту у крові (гіперкетонемія) та сечі (кетонурія) кетонових тіл спостерігається за умов розвитку цукрового діабету, дефіциту вуглеводів у харчуванні, надмірної продукції гормонів, що є антагоністами інсуліну (тироксин, глюкокортикоїди, гормони передньої долі гіпофізу, підшлункової залози, і т.д.). У ранньому дитячому віці тривалі розлади шлунково-кишкового тракту можуть призвести до кетонемії у результаті критичного голодування та виснаження. Зниження вмісту кетонових тіл у біологічних рідинах клінічного значення не має.

Принцип методу.

Ацетон має здатність утворювати фіолетове кільце у присутності нітропрусиду натрію та оцтової кислоти під час нашарування аміаку. Швидкість утворення такого кільця залежить від концентрації ацетону. Встановлено, зокрема, що поява кільця між 3-ю та 4-ю хвилинами інкубації відповідає концентрації ацетону 0,0085 г/л.

Матеріали та реактиви.

Препарат сечі,
50%-ий розчин сульфату амонію,
нітропрусид натрію,
концентрована оцтова кислота,
концентрований розчин аміаку,
дистильована вода.

Обладнання.

Штатив із пробірками, піпетки, гумові груші, крапельниці, витяжна шафа.

Хід роботи.

Для приготування розведення сечі беруть **вісім пробірок**. У **всі**, крім першої пробірки, наливають по **1 мл дистильованої води**, а у першу та другу по **1 мл сечі**. Потім методом стандартного подвійного розведення, послідовно переносячи по 1 мл суміші з 2-ої в 3-ю, з 3-ої в 4-у, і так далі до 8-ої пробірки, **обов'язково перемішуючи** після внесення, та **вливши з 8-ої пробірки 1 мл суміші у раковину**, щоб зрівняти об'єми, **готують розведення сечі**. Таким чином, **об'єм сечі у кожній пробірці** після першої буде **вдвічі менший**, ніж у попередній. Після цього у кожну з пробірок додають по **8 крапель 50%-го розчину сульфату амонію**, **8 крапель оцтової кислоти** та, знову ж таки, **8 крапель нітропрусиду натрію**. Вміст пробірок ретельно перемішують, і в кожну з них, послідовно, починаючи з останньої (8-ої), обережно, так, щоб рідини не змішувалися, **нашаровують по 1 мл концентрованого аміаку** (обов'язково під витяжкою і з використанням гумової груші!). Спостерігаючи за пробірками, **відмічають ту з них, де за максимального розведення сечі між 3-ою та 4-ою хвилинами ще помітне фіолетове кільце на межі розподілу двох рідин**.

Обробка результатів.

Розрахунок вмісту ацетону у сечі здійснюють за формулою:

$$X = 0,85 \cdot a \cdot 15,$$

де:

X – концентрація ацетону у сечі, мг/добу;

0,85 – емпіричне число;

a – ступінь розведення сечі у відповідній пробі;

15 – перерахунок на добову норму виділення сечі (приблизно 1,5 л).

Отриманий результат **виражають у мг ацетону на добу**.

Дослід 3. Кількісне визначення сечової кислоти у сечі.

Принцип методу.

Метод ґрунтується на здатності сечової кислоти відновлювати фосфорно-вольфрамовий реактив, внаслідок чого утворюються окисли вольфраму нижчої валентності синього кольору, інтенсивність забарвлення яких пропорційна до вмісту сечової кислоти і визначається шляхом титрування червоною кров'яною сіллю. Ця сіль окислює окисли вольфраму, тому синій колір розчину поступово зникає.

Матеріали та реактиви.

Фосфорно-вольфрамовий реактив (до 100 г вольфрамовокислого натрію додають 80 мл 85%-ої фосфорної кислоти, 900 мл води, кип'ятять протягом 2 год у колбі зі зворотнім холодильником і після охолодження доводять об'єм до 1 л),

розчин фериціаніду калію (до 3,292 г $K_3[(FeCN)_6]$ додають 2 г гідроксиду калію та розчиняють у 1 л води),

стандартний розчин сечової кислоти – 0,5 мг/мл (до 0,5 г висушеної сечової кислоти додають 0,5 г $LiCO_3$, 25 мл води, нагрівають за $t = 50-60^{\circ}C$ до розчинення, охолоджують та розбавляють водою до об'єму 1 л);

20%-ий розчин карбонату натрію,

препарат сечі,

дистильована вода.

Обладнання.

Штатив з пробірками, мікробюретки, піпетки, водяна баня.

Хід роботи.

До 1,5 мл сечі додають 1 мл фосфорно-вольфрамового реактиву, 1 мл розчину карбонату натрію, перемішують і титрують розчином фериціаніду калію до зникнення синього забарвлення.

Обробка результатів.

Для визначення вмісту сечової кислоти у сечі потрібно знати, яка кількість сечової кислоти відповідає 1 мл фериціаніду калію. Наприклад, для титрування стандартної проби, яка містить 0,25 мг сечової кислоти у об'ємі 0,5 мл, буде витрачено 0,34 мл розчину червоної кров'яної солі. У такому випадку 1 мл реактиву відповідає $(0,25 : 0,34)$ 0,73 мг сечової кислоти.

Масову концентрацію сечової кислоти у дослідній сечі за добу вираховують за такою формулою:

$$C = \frac{Q_{AB}}{V},$$

де:

A – кількість фериціаніду калію, яку було витрачено на титрування проби, мл;

B – кількість сечі за добу, мл;

V – об'єм сечі, взятий для дослідження, мл;

Q – кількість сечової кислоти, яка відповідає 1 мл фериціаніду калію.

Отриманий результат **виражають у мг сечової кислоти на добу.**

Рекомендована література:

М.Є.Кучеренко, Ю.Д.Бабенюк, О.М.Васильєв, Р.П.Виноградова, В.М.Войціцький, М. Д.Курський, В.К.Рибальченко, Б.О.Цудзевич. Біохімія: Підручник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр „Київський університет”, 2002. – 480 с.