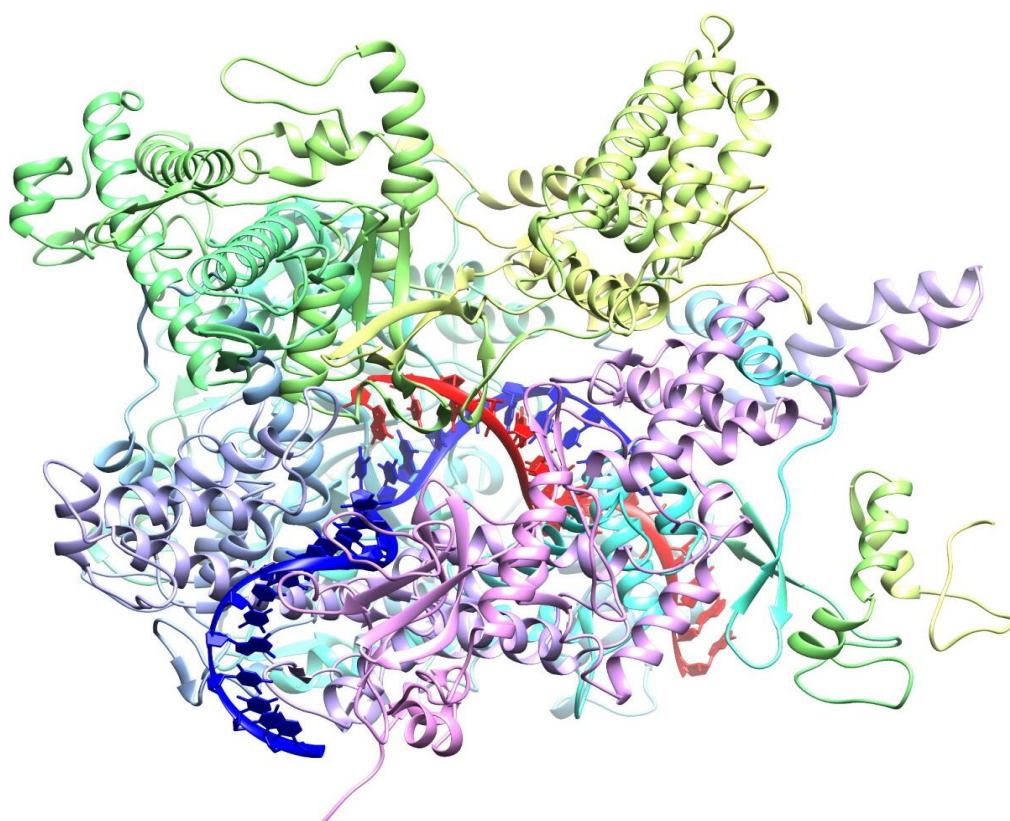


МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ



Тамбов
Издательский центр ФГБОУ ВО «ТГТУ»
2023

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Тамбовский государственный технический университет»

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Методические указания к лабораторным работам
для студентов 2 курса направления подготовки 19.03.01 «Биотехнология»
очной формы обучения

Учебное электронное издание



Тамбов
Издательский центр ФГБОУ ВО «ТГТУ»
2023

УДК 577.29
ББК 28.070.202
М75

Рекомендовано Методическим советом университета

Рецензент:

Доктор технических наук, доцент кафедры «Технологические процессы, аппараты и техносферная безопасность» ФГБОУ ВО «ТГТУ»

А. Н. Пахомов

М75 **Молекулярная биология** [Электронный ресурс] : методические указания / сост. : Я. В. Устинская, М. А. Еськова. – Тамбов : Издательский центр ФГБОУ ВО «ТГТУ», 2023. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – Системные требования : ПК не ниже класса Pentium II ; CD-ROM-дисковод ; 1,76 Mb ; RAM ; Windows 95/98/XP ; мышь. – Загл. с экрана.

Содержат методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Основы молекулярной биологии». Направлены на формирование у студентов ключевых компетенций, связанных с умением применять стандартные методы исследований. Охватывают основные разделы дисциплины: свойства углеводов, липидов, белков.

Предназначены для студентов 2 курса направления подготовки 19.03.01 «Биотехнология» очной формы обучения.

УДК 577.29
ББК 28.070.202

Все права на размножение и распространение в любой форме остаются за разработчиком. Нелегальное копирование и использование данного продукта запрещено.

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тамбовский государственный технический университет» (ФГБОУ ВО «ТГТУ»), 2023

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярная биология изучает явления жизни на уровне внутриклеточных структур, вирусов и макромолекул внутри клеток. Целью молекулярной биологии является установление роли и механизмов функционирования этих макромолекул на основе знания их структуры и свойств. Исторически молекулярная биология возникла в процессе развития области биохимии, которая изучает белки и нуклеиновые кислоты. Биохимия, с другой стороны, изучает метаболизм и биоэнергетику процессов, происходящих внутри живых клеток.

Данные методические указания составлены в соответствии с требованиями государственных образовательных стандартов и предназначены для студентов третьего курса, обучающихся по направлению 19.03.01 «Биотехнология», для развития навыков в изучении макромолекул, особенно белков, липидов и углеводов, их свойств, качественных реакций и количественного анализа.

Методические указания к лабораторным работам по молекулярной биологии представляют собой практикум к лабораторным работам, посвященный основам молекулярной биологии. Практикум охватывает основные разделы данной области и предлагает разнообразные задания. Студенты, заинтересованные в исследовательской деятельности, могут более глубоко изучить тот или иной материал. Структура методических рекомендаций построена по принципу усложнения материала и возможности освоения новых приемов и методов работы.

Студенты, участвующие в лабораторных занятиях, должны строго придерживаться установленных правил работы в лаборатории, в том числе носить спецодежду и сменную обувь, соблюдать правила техники безопасности и приходить вовремя. Студенты без присмотра преподавателя не допускаются в лабораторию. Протоколы экспериментов следует записывать в отдельную тетрадь и аккуратно хранить, ссылаясь на рекомендации к каждому экспериментальному протоколу.

Лабораторная работа № 1

УГЛЕВОДЫ

Цель работы: продемонстрировать структуру альдоз и кетоз – провести качественные реакции, изучить кислотный гидролиз ди- и полисахаридов и приобрести основные навыки определения массовой доли сахаров в продуктах питания.

Методические указания

Углеводы – это природные соединения, обладающие биологической активностью и поэтому играющие важную роль в жизни растений, животных и человека. На долю углеводов приходится 80% сухого вещества растений и около 20% животных. Данные соединения широко распространены в живой природе. Название «углеводы» сохранилось с тех времен, когда строение их было неизвестно, но был установлен их состав, отвечающий общей формуле $C_n(H_2O)_m$. По этой формуле углеводы рассматривались как гидраты углерода, т.е. соединения углерода с водой: углеводы. Общепринятое название этого класса соединений – сахара.

Углеводы – это полиоксиальдегиды и полиоксикетоны с общей формулой $C_n(H_2O)_m$, а также их производные. В организме человека и животных углеводы выполняют различные функции, в том числе являются источником энергии, клеточным материалом и исходным материалом для синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот. Углеводы классифицируются как моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Моносахариды – это сахара с одной единицей полиоксиальдегида или полиоксикетона. Олигосахариды – это 2 – 10 моносахаридных остатков, связанных гликозидными связями. Полисахариды имеют более 10 моносахаридных остатков и делятся на гомополисахариды и гетерополисахариды.

1. Определение массовой доли редуцирующих сахаров и сахарозы.

В 1953 году Французским химиком Р. Лемье впервые в лабораторных условиях был осуществлен синтез сахарозы, который современники назвали «покорением Эвереста органической химии».

Гидролиз сахарозы происходит в организме пчел. Поэтому мед – смесь равных количеств глюкозы и фруктозы с примесью других веществ. Содержание сахара в меде характеризуется двумя показателями: массовой долей редуцирующих сахаров и массовой долей сахарозы.

Редуцирующий сахар или предварительно восстановленный сахар – это сумма всех сахаров (инвертный сахар, глюкоза, фруктоза, мальтоза и лактоза), которые восстанавливаются щелочным раствором меди. Реакция восстановления обусловлена наличием в этих сахарах альдегидных и кетонных (карбонильных) групп. Сукроза не имеет свободных карбонильных групп, т.е. не является вос-

становливающим сахаром. Из-за такой структуры большинство методов позволяют определить сахарозу только после гидролиза равного количества глюкозы и фруктозы. Эти сахара имеют карбонильные группы и проявляют редуцирующую способность. В результате сахарозу определяют как разницу между двумя результатами редуцирующих и общих сахаров, то есть до и после гидролиза сахарозы.

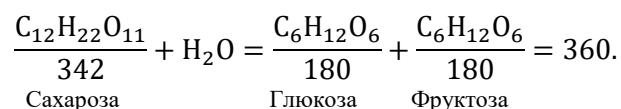
Глюкоза была открыта в 1811 году русским химиком Кирхгофом. Он получил ее при гидролизе крахмала. Она встречается почти во всех органах растений. Особенно много глюкозы в соке винограда и спелых фруктах, ягодах, овощах.

В крови человека ее содержится 0,12%. Содержание глюкозы в крови контролируется с помощью гормона поджелудочной железы – инсулина. При повышении содержания глюкозы в крови она посредством инсулина превращается в гликоген и откладывается в печени. При понижении – гликоген гидролизуется в глюкозу. При повышенном содержании глюкозы в крови и недостатке инсулина развивается сахарный диабет. Глюкоза разносится кровью по всему организму и служит в нем источником энергии. Иногда ее называют «виноградным сахаром».

Изомером глюкозы является фруктоза – плодовый сахар (входит в состав многих плодов). Вместе с глюкозой составляет 80% пчелиного меда. Сладше чем глюкоза и сахар.

Искусство изменения угла вращения под влиянием гидролиза называется инверсией. Смесь имеет левое вращение, так как угол вращения фруктозы 92°, а глюкозы – 52,5°.

Общая масса фруктозы и глюкозы, полученная в результате инверсии, немного больше массы сахарозы, подвергшейся гидролизу. Это видно из реакции гидролиза.



В связи с этим при расчетах используют коэффициент 0,95.

Существует множество методов измерения редуцирующих сахаров и сахарозы. Настоящий национальный стандарт устанавливает использование, в частности, фотоэлектроколориметрического метода. Для осуществления данного метода используется специальный прибор – фотоэлектроколориметр (ФЭК). Данный метод используется в частности для определения массовой доли восстанавливающих (редуцирующих) сахаров и сахарозы (см. количественное определение углеводов).

Так же еще одним фотометрическим методом является спектрофотометрия. Для осуществления данного метода используется специальный прибор – спектрофотометр, позволяющий регистрировать световой поток в широком интервале изменения длин волн (185...1100 нм). Спектрофотометр состоит из источника излучения, монохроматора, кюветного отделения, фотоэлементов, усилителя, регистратора. Свет от источника излучения попадает на монохроматор, где он разлагается на спектр. Далее световой поток попадает в кюветное отделение, где установлены кюветы с контрольным и исследуемым растворами. Пройдя через кюветы, свет попадает на фотоэлементы, преобразуется там в фототок, усиливается в блоке усилителя и далее регистрируется в блоке регистратора. При работе в УФ-диапазоне длин волн (200...400 нм) используют кварцевые кюветы, так как стекло поглощает УФ-лучи. Концентрацию определенного вещества в растворе определяют либо с помощью основного закона светопоглощения, либо при построении калибровочной кривой. Относительные ошибки при использовании спектрофотометрического метода составляют ±2%.

2. Определение массовой доли лактозы. Определение проводят одним из двух методов: йодометрическим или поляриметрическим.

Йодометрический метод. В этом методе ионы Cu^{2+} , находящиеся в избытке в реактиве Фелинга, восстанавливаются лактозой, а восстановленный остаток фиксируют йодометрически, а йод, выделяющийся из йодистого калия, титруют раствором тиосульфата натрия в кислой среде. Аналитические результаты получают по специальной формуле, полученной экспериментально. Для получения правильных результатов необходимо точно соблюдать все условия реакции, такие как концентрация реагентов, температура и время нагревания.

Открытие углеводов в растворах

Работа 1. Реакция Подобедова–Молиша

Реакция с α-нафтолом или тимолом чувствительна к сахару. Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, полученные из углеводов с помощью серной кислоты, конденсируются с двумя молями сульфатированного α-нафтола или тимола и окисляются серной кислотой до хромогенного хиноидного соединения. Все углеводы (кроме глюкозамина) демонстрируют аналогичные реакции.

Реактивы: раствор $C_{12}H_{22}O_{11}$, α-нафтол, тимол, концентрированная H_2SO_4 .

Ход работы. Добавьте по 0,5 мл раствора сахарозы в две пробирки. Добавьте 1–2 капли раствора α -нафтола в первую пробирку и 1–2 капли раствора тимола во вторую пробирку. В обе пробирки осторожно наливают концентрированную серную кислоту. Серная кислота опускается на дно пробирок, образуя фиолетовое кольцо на границе двух жидкостей в случае α -нафтола и красноватое кольцо – в случае тимола.

Работа 2. Открытие фруктозы (реакция Селиванова)

Реактивы: раствор фруктозы, раствор глюкозы, реактив Селиванова.

Ход работы. Добавьте 0,5 мл раствора фруктозы в первую пробирку и 0,5 мл раствора глюкозы во вторую пробирку. Добавьте 0,5 мл реактива Селиванова в обе пробирки. Пробирки осторожно нагревают над пламенем горелки. В пробирке с фруктозой наблюдается постепенное окрашивание в красный цвет. Оксиметилфурфурол образуется на первом этапе и конденсируется с резорцином на втором этапе, давая красное окрашивание.

Работа 3. Реакция крахмала и гликогена с йодом

Реактивы: раствор крахмала, раствор Люголя, 10%-ный раствор NaOH, этиловый спирт.

Ход работы. Добавьте 1–2 капли раствора Люголя к 2 мл раствора крахмала. Раствор становится синим. Разделите содержимое пробирки на три части, добавьте к одной части 1 мл раствора NaOH, ко второй – 2 мл этилового спирта, а содержимое третьей части нагрейте. В обоих случаях цвет исчезает, но в третьем образце цвет воспроизводится при охлаждении. Эта реакция основана на образовании нестабильного адсорбированного соединения йод–амилоза.

Протокол работы

1.1. Результаты опытов

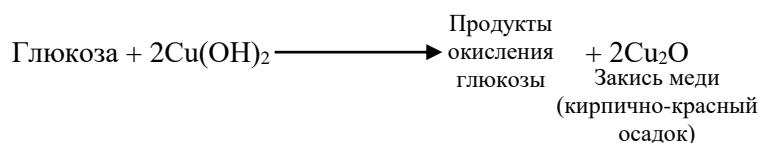
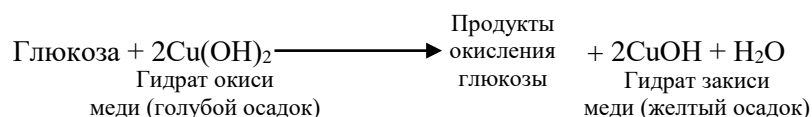
| Реакция | Результат реакции | Вывод о наличии вещества или функциональной группы |
|---------------------------|-------------------|--|
| Реакция Подобедова–Молиша | | |
| Реакция Селиванова | | |
| Реакция крахмала с йодом | | |

Восстанавливающие свойства углеводов

Гликоконъюгаты со свободными карбонильными группами вызывают ряд реакций, основанных на окислительной природе этих карбонильных групп.

Работа 4. Реакция Троммера

Реакция Троммера основана на окислительно-восстановительной реакции, в которой альдегидная группа сахара окисляется и восстанавливается до гидрата оксида меди (синий осадок) при нагревании в щелочной среде, в результате чего образуется гидрат оксида меди (кирпичный осадок). Углеводы производят разнообразные продукты окисления. В отличие от окисления обычных альдегидов, кислоты с тем же числом углеродов, что и у исходного сахара, не могут быть выделены из продуктов окисления. Сахара без свободных альдегидных групп не дают троммерных проб.



Реактивы: 0,5%-ные растворы глюкозы, фруктозы, сахарозы, мальтозы и крахмала, 2 н. раствор NaOH, 0,2 н. раствор CuSO₄.

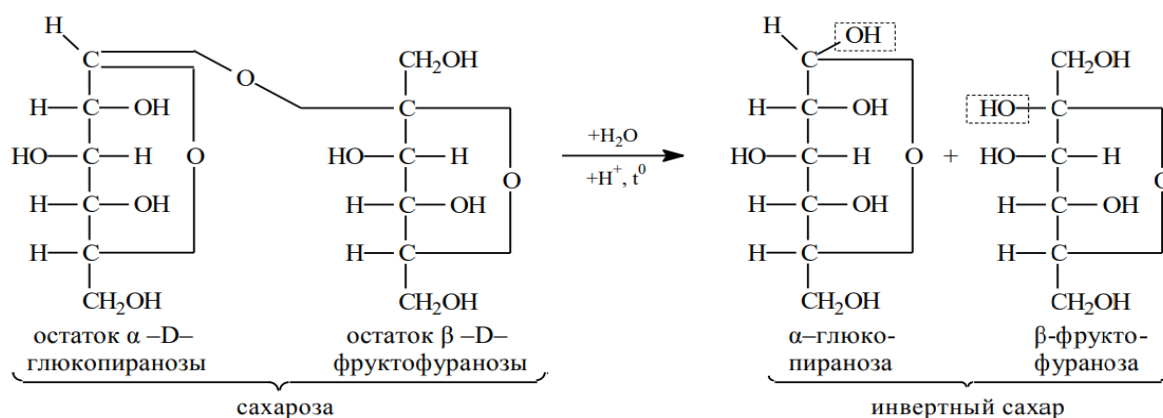
Ход работы. Налейте в пробирку 6 – 8 капель раствора глюкозы и 2 н. NaOH. Затем по каплям добавляют 0,2 н. раствор CuSO₄ до образования нерастворимого синего осадка. Пробирку осторожно нагревают над спиртовкой. Осадок синего, нерастворимого в воде гидрата оксида меди (II) постепенно становится желтым, а затем образуется красный осадок оксида меди (I). Это указывает на положительную реакцию Троммера.

Такой же эксперимент проводится с сахарозой, мальтозой, фруктозой и крахмалом. Можно сделать выводы о восстановительных свойствах этих углеводов.

Реакция маскируется избытком солей меди, поскольку гидроксид меди (II) теряет воду при нагревании, давая черный оксид меди (II).

Работа 5. Гидролиз сахарозы

Дисахариды гидролизуются в присутствии серной кислоты. При гидролизе сахарозы образуются глюкоза и фруктоза:



Реактивы: 0,5%-ный раствор сахарозы, 10%-ный раствор H₂SO₄, раствор NaOH, реактив Фелинга.

Ход работы. 3 мл раствора сахарозы нагрейте с двумя каплями 10%-ного раствора серной кислоты. После нагревания смесь охладите. 1,5 мл полученного гидролизата раствора сахарозы нейтрализуйте разбавленным раствором щелочи и добавьте 0,5 мл реактива Фелинга и нагрейте.

Работа 6. Проба на образование альдегидных смол

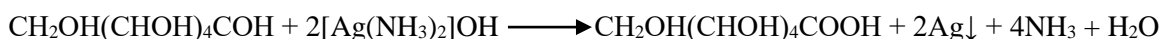
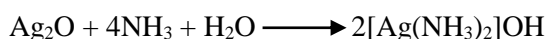
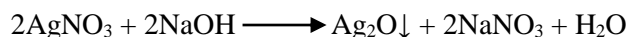
Реакция основана на общей склонности альдоз к образованию в щелочной среде продуктов конденсации (альдегидных смол).

Реактивы: 0,5%-ный раствор глюкозы, 10%-ный раствор NaOH.

Ход работы. 5 мл раствора глюкозы (лактозы, фруктозы, маннозы) (1...5%) смешайте с 2 мл 10%-ного раствора едкого натра и доведите до кипения, нагревая на спиртовке. Содержимое пробирки приобретает желтый цвет или даже становится темно-бурым. Появляется запах карамели, особенно заметный при подкислении.

Работа 7. Восстановление аммиачного раствора оксида серебра глюкозой

Реакция доказывает наличие альдегидной группы в глюкозе. Альдегидная группа глюкозы окисляется до карбоксильной группы. Глюкоза превращается в глюконовую кислоту:



Реактивы: 0,2 н. раствор нитрата серебра (AgNO₃), 2 н. раствор гидроксида натрия (NaOH), водный раствор аммиака (NH₄OH), 0,5%-ный раствор глюкозы.

Ход работы. В пробирку внесите 2 капли раствора нитрата серебра, 1 каплю гидроксида натрия и добавьте 2–3 капли водного раствора аммиака. Образующийся осадок гидроксида серебра должен раствориться. Далее добавьте 2 капли раствора глюкозы и осторожно нагрейте пробирку над пламенем горелки.

Протокол работы

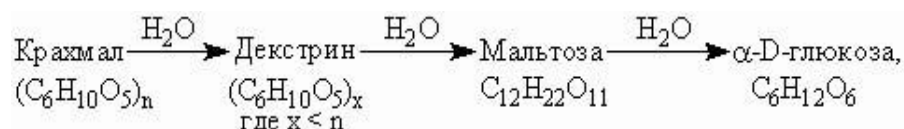
1.2. Результаты опытов

| Реакция | Результат реакции (наличие или растворение осадка, цвет, помутнение, запах, за счет каких веществ происходят изменения) |
|--|---|
| Реакция Троммера | |
| Гидролиз сахарозы | |
| Проба на образование альдегидных смол | |
| Восстановление аммиачного раствора оксида серебра глюкозой | |

Полисахариды

Работа 8. Кислотный гидролиз крахмала

Крахмал может гидролизаться, частично образуя в качестве продуктов декстрины – $(C_6H_{10}O_5)_n$ – вещества с молекулярной массой значительно ниже, чем у крахмала.



Если гидролиз крахмала протекает полностью, образуется глюкоза ($C_6H_{12}O_6$).

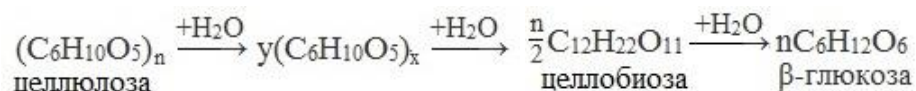
Реактивы: 0,1%-ный раствор крахмала, 2 н. раствор H_2SO_4 , раствор Люголя, 2 н. раствор $CuSO_4$, 2 н. раствор $NaOH$.

Ход работы. Поместите в колбу 5 мл 0,1%-ного раствора крахмала и 3 мл 2 н. раствора серной кислоты. Осторожно нагревайте над пламенем горелки в течение 5 минут, отмерьте пипеткой или дозатором 0,5 мл гидролизата и добавьте 1 каплю раствора Люголя.

Наблюдайте за изменением цвета гидролизата под действием йода в процессе гидролиза. Проведите реакцию Троммера с оставшимся гидролизатом. Сделайте выводы о структуре крахмала.

Работа 9. Кислотный гидролиз клетчатки

Гидролиз целлюлозы происходит при нагревании в кислой среде. Конечным продуктом гидролиза является глюкоза. При длительном нагревании с минеральными кислотами или под действием ферментов идет ступенчатый гидролиз целлюлозы:



Реактивы: концентрированная серная кислота, 10%-ный раствор гидроксида натрия, реактив Фелинга, универсальная индикаторная бумага; мелко нарезанная фильтровальная бумага, стеклянные палочки, водяные бани, пробирки.

Ход работы. Поместите несколько листов фильтровальной бумаги в пробирку и добавьте 1 мл серной кислоты. Тщательно перемешайте содержимое стеклянной палочкой, чтобы получился бесцветный, вязкий раствор. Затем добавьте 1 мл дистиллированной воды медленно по каплям, помешивая. Поместите пробирку в горячую водяную баню. Нагревайте на водяной бане в течение 10...15 мин, периодически помешивая. После охлаждения нейтрализуйте раствором гидроксида натрия (тест с индикатором) и проведите реакцию с реактивом Фелинга для обнаружения восстанавливающих сахаров в гидролизате.

Протокол работы

1.3. Результаты опытов

| Реакция | Результат реакции | Вывод о строении полисахарида |
|------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| Кислотный гидролиз крахмала | | |
| Кислотный гидролиз клетчатки | | |

Количественное определение углеводов

Работа 10. Определение массовой доли восстанавливающих (редуцирующих) сахаров и сахарозы

Фотоэлектроколориметрический феррицианидный метод основан на фотоколориметрировании непрореагировавшего избытка щелочного раствора феррицианида с редуцирующими веществами объекта исследования.

1. Определение начинают с приготовления раствора навески. Массу навески меда рассчитывают по формуле

$$M = 0,2V/\Pi, \quad (1.1)$$

где M – масса навески объекта исследования, г; 0,2 – оптимальная концентрация сахаров (редуцирующих веществ или общего сахара) в водной вытяжке объемом 100 мл, г; V – вместимость мерной колбы, используемой для приготовления водной вытяжки, мл; Π – предполагаемое (ориентировочно) содержание редуцирующих веществ или общего сахара в объекте, %.

1.1. Навеску массой 0,5 г, взятую в стаканчике, сразу растворяют в теплой дистиллированной воде. Если мед растворяется без остатка (раствор прозрачен), то раствор из стаканчика количественно переносят в мерную колбу на 100 мл, объем доводят до метки и перемешивают.

Определите массовую долю редуцирующих веществ в фильтрате или в растворе меда, если осветление не проводилось: перенесите 25 мл щелочного раствора гексацианоферрата калия, 8 мл суспензии и 2 мл дистиллированной воды в коническую колбу. Доведите содержимое колбы до кипения, кипятите ровно 1 мин, затем дайте остыть перед добавлением жидкости в колбу.

Оптическую плотность измеряют с помощью спектрофотометра с оптическим фильтром с максимальным пропусканием 450 нм (эквивалентно фильтру № 3 – фиолетовый) и 10-миллиметровой кюветой. Оптическая плотность измеряется не менее 3 раз с каждым раствором, и из полученных данных рассчитывается среднее арифметическое.

Обратите внимание, что результаты получаются только при наличии избытка щелочного раствора феррицианида. Если по каким-то причинам такого избытка или недостатка нет, то фотометрический анализ не имеет смысла.

Массовая доля редуцирующих веществ (%) в пересчете на сухое вещество

$$C_1 = aV_0 \cdot 100 \cdot 100/[V_m(100 - B)], \quad (1.2)$$

где a – количество инвертного сахара (глюкозы), найденное по калибровочному графику, мг; V_0 – вместимость мерной колбы, использованной для приготовления водной вытяжки, мл; V_m – объем водной вытяжки меда, взятый для реакции, мл; m – масса навески объекта исследования, мг; B – массовая доля воды в меде, %.

1.2. Чтобы определить массовую долю общего сахара, возьмите еще один образец. Удвойте массу образца. Сразу растворите пробу, собранную в стакане, в теплой дистиллированной воде и перенесите в коническую колбу. Объем водного экстракта доведите до 100 мл. Затем происходит гидролиз сахарозы: 50 мл суспензии пипеткой переносят в коническую колбу емкостью 100 мл. Затем добавьте 4 мл концентрированной соляной кислоты, в колбу вставьте термометр и поместите на водяную баню, нагретую до 80 °С. Температуру жидкости в колбе доведите до 67...70 °С и поддерживайте при этой температуре в течение 5 мин. Быстро охладите содержимое колбы, термометр выньте, добавьте каплю раствора метилового оранжевого и нейтрализуйте ранее введенную соляную кислоту концентрированным раствором гидроксида калия до перехода розового цвета в желто-оранжевый. Затем перенесите в мерную колбу емкостью 100 мл, доведите объем до метки и перемешайте.

Затем в коническую колбу пипеткой внесите 25 мл щелочного раствора гексацианоферрата калия (феррицианида), 8 мл полученного раствора гидролизата и 2 мл дистиллированной воды. Содержимое колбы доведите до кипения, кипятите в течение 1 мин, затем охладите, добавьте жидкость в колбу и определите оптическую плотность.

Массовую долю общего сахара C_2 (%), выраженную в инвертном сахаре в пересчете на сухое вещество, вычисляют по формуле (1.2), увеличив результат расчета в 2 раза.

Массовая доля сахарозы (%) в пересчете на сухое вещество

$$C = 0,95/(C_2 - C_1), \quad (1.3)$$

где 0,95 – коэффициент пересчета инвертного сахара на сахарозу; C_2 и C_1 – массовые доли соответственно общего сахара и восстанавливающего (редуцирующего) сахара, %.

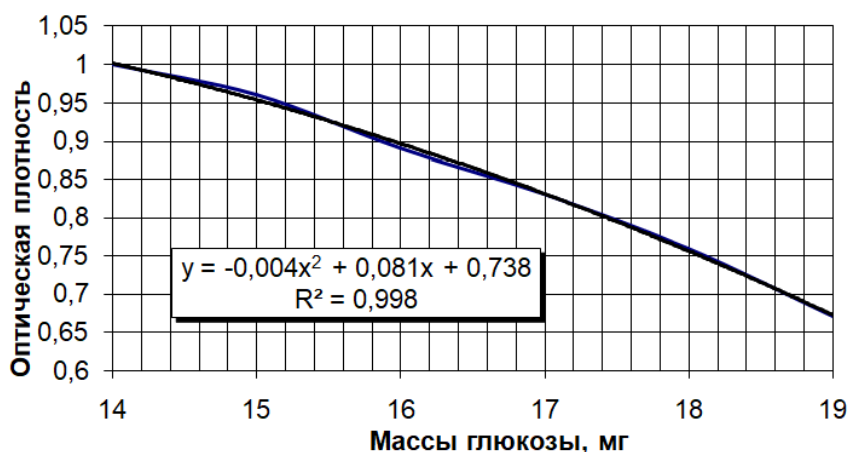


Рис. 1.1. Калибровочный график для определения массовой доли редуцирующих веществ, общего сахара и сахарозы. Значения массы глюкозы в миллиграммах (количество сантиметров стандартного раствора, умноженное на 2)

2. Определение массовой доли лактозы. Растворите 2 г испытуемой лактозы, взвешенной с точностью $\pm 0,01$ г в маленькой мензурке, в теплой дистиллированной воде, перенесите в мерную колбу емкостью 200 мл, добавьте дистиллированную воду при 20°C до номинального объема, тщательно перемешайте и отмерьте. Смешайте 10 мл Фелинга I и II и 10 мл суспензии в коническую колбу емкостью 150...250 мл. Добавьте 20 мл дистиллированной воды, чтобы общий объем составил 50 мл. В то же время проводят «холостой» эксперимент, в котором в ту же коническую колбу добавляют тот же реагент и 10 мл воды вместо суспензии, т.е. 30 мл воды вместо 20 мл.

Обе колбы нагревают до температуры кипения и кипятят в песочных часах в течение 2 мин. Кипение должно быть достаточно мягким, чтобы объем жидкости в колбах существенно не изменился. Затем колбы охлаждают, в каждую колбу добавляют по 10 мл свежеприготовленного 30%-ного раствора йодистого калия и 10 мл 25%-ной серной кислоты, и выделенный йод медленно по каплям титруют 0,1 н. раствором тиосульфата натрия при перемешивании до появления желтой окраски раствора. Затем добавляют 1 мл 1%-ного раствора крахмала и титруют до исчезновения синей окраски.

По результатам обоих титрований находят количество (мл) точно 0,1 н. раствора тиосульфата калия, эквивалентное количеству лактозы, по формуле

$$B = (V_0 - V)K, \quad (1.4)$$

где V_0 и V – объемы при титровании соответственно «холостого» и исследуемого растворов, мл; K – коэффициент нормальности раствора тиосульфата натрия.

Величина B должна быть больше 7 мл, в противном случае анализ следует повторить, увеличив навеску в 1,5 – 2 раза.

Результат анализа – массовая доля лактозы – кристаллогидрата (%)

$$L = [5(B - 7) + 33]K \cdot V_1 100 / (V_2 m), \quad (1.5)$$

где разность объемов израсходованного раствора тиосульфата натрия (см. выше), соответствующего реакционному объему лактозы, мл; V_1 и V_2 – объемы мерной колбы и суспензии, внесенной в реакционную колбу, мл ($V_1 = 200$ мл; $V_2 = 10$ мл), соответственно; m – масса суспензии, мг.

Если масса навески точно 2 г, использованная мерная колба вместимостью 200 мл и для анализа взято 10 мл раствора, то расчет можно проводить по упрощенной формуле

$$L = 5(B - 7) + 33. \quad (1.6)$$

В результате анализа содержание лактозы в исследуемом продукте может быть несколько большим, чем 100%. Это свидетельствует о том, что кристаллогидрат лактозы ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$), на который проводится расчет, частично обезвожился.

Протокол работы

Экспериментальные данные заносят в табл. 1.4 и по ним производят расчет. Все полученные по расчетам данные вносят в табл. 1.5.

1.4. Экспериментальные данные

| | | |
|--|---|---|
| Исследуемое вещество | | |
| Оптическая плотность водной вытяжки в-ва | | – |
| Количество редуцирующего сахара, найденное по калибровочному графику, a_1 | | – |
| Оптическая плотность исследуемого в-ва с раствором феррицианида | | – |
| Количество общего сахара, найденное по калибровочному графику, a_2 | | – |
| Массовая доля воды в исследуемом в-ве B (%) | | – |
| Объем 0,1 н. тиосульфата натрия, пошедшего на титрование «холостой» пробы, мл | – | |
| Объем 0,1 н. тиосульфата натрия, пошедшего на титрование исследуемой пробы, мл | – | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

1.5. Расчетные величины

| | | |
|---------------------------------------|--|--|
| Исследуемое вещество | | |
| Массовая доля редуцирующего сахара, % | | |
| Массовая доля общего сахара, % | | |
| Массовая доля сахарозы, % | | |
| Массовая доля лактозы, % | | |

Контрольные вопросы и ситуационные задачи

Задача № 1. Врачи призывают население ограничивать употребление сахара и включать в рацион больше фруктов и овощей.

Обоснуйте эти рекомендации.

1. Что называют углеводами?
2. Какова классификация углеводов?
3. Какие углеводы относятся к редуцирующим?
4. Каковы принципы методов обнаружения: а) глюкозы; б) фруктозы; в) мальтозы, сахарозы?

Лабораторная работа № 2

ЛИПИДЫ

Цель работы: оценить качество жиров и масел и приобрести практические навыки качественного анализа веществ, связанных с наличием различных липидных групп.

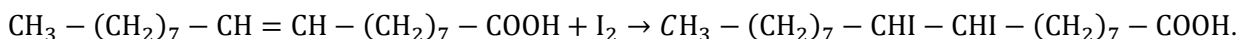
Методические указания

Липиды представляют собой большую группу разнообразных соединений, характеризующихся низкой растворимостью в воде и легкостью экстракции органическими растворителями. Липиды можно разделить на простые и сложные. Первая группа – это сложные эфиры жирных кислот и третичных спиртов глицерина. Жиры включают насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты.

Свойства жиров и масел определяются качественным составом жирных кислот, их количественным соотношением и процентным содержанием свободных жирных кислот. Для характеристики жиров и масел используются жировые константы и химические и физические индексы. Определение этих показателей полезно не только для контроля качества жиров и масел, но и для установления технического одобрения различных жировых и масляных продуктов.

Степень ненасыщенности жиров определяется наличием в их составе ненасыщенных жирных кислот. Ненасыщенные соединения – это соединения с двумя атомами галогена, присоединенными к двойной связи. Степень ненасыщенности обычно определяется по йодному числу – сколько граммов йода содержится в 100 граммах жира.

Йодное число является одним из наиболее важных химических показателей для масел (жиров). Оно позволяет судить о склонности жира к высыханию, прогорканию и другим изменениям, происходящим при хранении и переработке пищевых и технических масел.



Кислотное число характеризует кислотность жира и измеряется числом миллиграммов гидроксида калия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Кислотное число, наряду с другими физико-химическими показателями, характеризует качество масла. Например, масло из зрелых семян содержит очень мало свободных жирных кислот. Во время хранения происходит гидролиз глицеридов и накапливаются свободные жирные кислоты. Повышение кислотности масла свидетельствует о снижении его качества.

Омыление – это количество мг гидроксида калия, необходимое для нейтрализации свободных и связанных жирных кислот в 1 г масла.

По таблице 1.6 определяют степень порчи жира.

1.6. Оценка степени порчи жира по величине перекисного числа

| Перекисное число, % | Степень порчи |
|---------------------|---------------------------------|
| Ниже 0,03 | Свежее |
| От 0,03...0,06 | Свежее, но не подлежит хранению |
| От 0,06...0,10 | Сомнительной свежести |
| Более 0,10 | Испорченное |

При хранении жиры окисляются с образованием пероксидов (гниение). Метод измерения перекисного числа основан на взаимодействии йодистого калия с перекисью в кислой среде, а выделившийся йод отщепляется гипосульфитом натрия.

Работа 1. Определение насыщенности жиров

Реактивы: масло, спирт, 0,2 н. спиртовой раствор йода, 0,1 н. раствор тиосульфата натрия, 1%-ный раствор крахмала (свежеприготовленный).

Ход работы. Для определения йодного числа поместите 2 г масла в сухую коническую колбу с пробкой из матового стекла емкостью 250 мл; добавьте 25 мл спирта для растворения образца и нагревайте на водяной бане до полного растворения масла. Поместите 25 мл спирта в контрольную колбу, добавьте 12,5 мл 0,2 н. спиртового раствора йода, перемешайте, добавьте 100 мл дистиллированной воды, хорошо взболтайте и плотно закупорьте; через 5 мин титруйте содержимое колбы 0,1 н. раствором тиосульфата натрия до слабо-желтого цвета, добавьте 1 мл раствора крахмала. Титруйте до исчезновения синей окраски.

Работа 2. Определение кислотного числа жиров

Реактивы: масло, нейтральная смесь спирта и эфира (1:1), фенолфталеин, 0,1 н. спиртовой раствор КОН.

Ход работы. Чтобы определить кислотное число, поместите образец жира массой 3 г в коническую колбу емкостью 100 мл. Нагрейте образец на водяной бане, чтобы он растворился. Добавьте 10 мл нейтральной смеси спирта и эфира (1:1). Для нейтрализации добавьте 4 капли фенолфталеина и 0,1 н. раствор гидроксида калия до слабо-розового цвета. После растворения жира добавьте 1–2 капли раствора фенолфталеина и титруйте 0,1 н. раствором гидроксида калия до слабо-розового цвета. Добавьте все реагенты, кроме образца масла, в контрольную колбу и проведите контрольное титрование.

Работа 3. Определение числа омыления жиров

Реактивы: масло, 0,5 н. спиртовой раствор КОН, фенолфталеин, 0,5 н. раствор HCl.

Ход работы. Определите степень омыления, добавив 0,5 г жира в колбу емкостью 100 мл и 0,5 мл воды в другую колбу. Добавьте в обе колбы по 15 мл 0,5. спиртового раствора КОН. Присоедините к колбам рефлюксный холодильник и нагревайте на кипящей водяной бане в течение 30 мин при периодическом встряхивании.

После омыления в каждую колбу добавляют по 20 мл воды и 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 н. раствором соляной кислоты до исчезновения розового цвета.

Работа 4. Определение перекисного числа

Реактивы: масло, смесь хлороформа и ледяной CH_3COOH (2:1), насыщенный на холоде водный раствор KI , 1%-ный раствор крахмала, 0,01 н. раствор тиосульфата натрия.

Ход работы. Взвесьте 1 г масла в мерной колбе на 100 мл и растворите в 6 мл хлороформа и ледяной уксусной кислоты (2:1). Нагревайте на водяной бане до полного растворения масла. К полученному раствору добавьте 1 мл насыщенного раствора холодного йодистого калия (3 мл воды), закройте колбу и встряхивайте в течение 3 мин. Затем добавьте 3 – 5 капель 1%-ного раствора крахмала и титруйте 0,01 н. раствором тиосульфата натрия через микробюретку. Одновременно проведите контрольное титрование без жира.

Протокол работы

Йодное число вычисляют по формуле

$$I = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0127 \cdot 100}{a}, \quad (2.1)$$

где V_1 и V_2 – количество 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, пошедшего на титрование контроля и опыта (мл); 0,0127 – титр тиосульфата по йоду; a – навеска жира (г).

Кислотное число вычисляют по формуле

$$K = \frac{V \cdot T}{a}, \quad (2.2)$$

где V – количество 0,1 н. раствора KOH , пошедшего на титрование (мл); T – титр 0,1 н. раствора гидроксида калия (мг); a – навеска жира (г).

Число омыления вычисляют по формуле

$$O = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 28}{a}, \quad (2.3)$$

где V_1 и V_2 – объем кислоты, пошедшей на титрование контроля и опыта (м^3); a – масса жира (г); 28 – титр 0,5 н. раствора KOH (мг).

Перекисное число вычисляют по формуле

$$П = (V_1 - V_2) \cdot 0,00127 \cdot 100\%, \quad (2.4)$$

где V_1 и V_2 – количество 0,01 н. раствора тиосульфата, пошедшего на титрование контроля (без жира) и опыта (мл); 0,00127 – титр раствора тиосульфата (г).

Полученные данные вносят в табл. 2.1 и делают заключение о качестве жиров.

2.1. Показатели качества жиров

| Исследуемый жир | Показатели жира | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------|
| | Йодное число | Кислотное число | Число омыления | Перекисное число |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

Вывод: _____

Работа 5. Обнаружение желчных кислот (проба Петенкофера)

Проба основана на образовании окрашенного продукта при взаимодействии желчных кислот и оксиметилфурфурола, который образуется из сахарозы при действии концентрированной серной кислоты.

Реактивы: раствор желчных кислот, концентрированная H_2SO_4 , 5%-ный раствор $C_{12}H_{22}O_{11}$.

Ход работы. Налейте 5 мл раствора желчной кислоты в пробирку, добавьте 10 капель раствора сахарозы и осторожно добавьте 10 капель концентрированной серной кислоты по стенке пробирки. Не встряхивайте. Дайте пробирке постоять 10...15 мин. На границе жидкости образуется красновато-фиолетовое кольцо.

Работа 6. Исследование действия липазы поджелудочной железы

Жир редко всасывается в желудочно-кишечном тракте. Гидролиз происходит в тонком кишечнике и катализируется липолитическими ферментами, выделяемыми поджелудочной железой. Существует несколько типов панкреатических липаз. Некоторые из них специфичны для сложноэфирной связи в α -положении триацилглицерина, а другие гидролизуют связь в β -положении. Полный гидролиз жиров происходит поэтапно. Сначала гидролизуются α -связи, затем гидролизуется β -моноацилглицерол. Конечные продукты пищеварения (глицерин, высшие жирные кислоты, моно- и диацилглицеролы) всасываются кишечной стенкой.

Желчные кислоты играют важную роль в переваривании и всасывании липидов. Они эмульгируют жиры, активируют липазы и облегчают всасывание нерастворимых продуктов переваривания.

Исследуемый материал: молоко, разведенное с водой в соотношении 1:10.

Реактивы: спиртовой раствор фенолфталеина; 0,01%-ный раствор NaOH; панкреатин, содержащий липазу.

Ход работы. Подготовьте три колбы для испытуемого и контрольного образцов. Контрольный образец предварительно кипятят с липазой, содержащейся в панкреатине, в течение 10 мин на кипящей бане. В каждую колбу добавьте молоко, препарат липазы и желчь (табл. 2.2).

2.2. Исходные данные эксперимента

| Компоненты смеси | Опыт 1, мл | Опыт 2, мл | Контроль, мл |
|--------------------|------------|------------|-------------------|
| Молоко:вода (1:10) | 10 | 10 | 10 |
| Препарат липазы | 1 | 1 | 1 (прокипяченная) |
| Препарат желчи | – | 1 | – |

Тщательно перемешайте приготовленную смесь. Затем возьмите по 2 мл смеси из каждой колбы в стакан для титрования. Добавьте 2 капли раствора фенолфталеина в каждый стакан и титруйте раствором NaOH до слабо-розового цвета. Первое титрование нейтрализует органические кислоты в молоке.

Оставшуюся в колбе смесь помещают в термостат (температура 38...40 °С), и через 10, 20, 30 и 40 мин отобранные из каждой пробы, не вынимая из термостата, 2 мл смеси титруют раствором NaOH с концентрацией 0,01 моль/л. Время титрования и количество гидроксида натрия заносят в табл. 2.3.

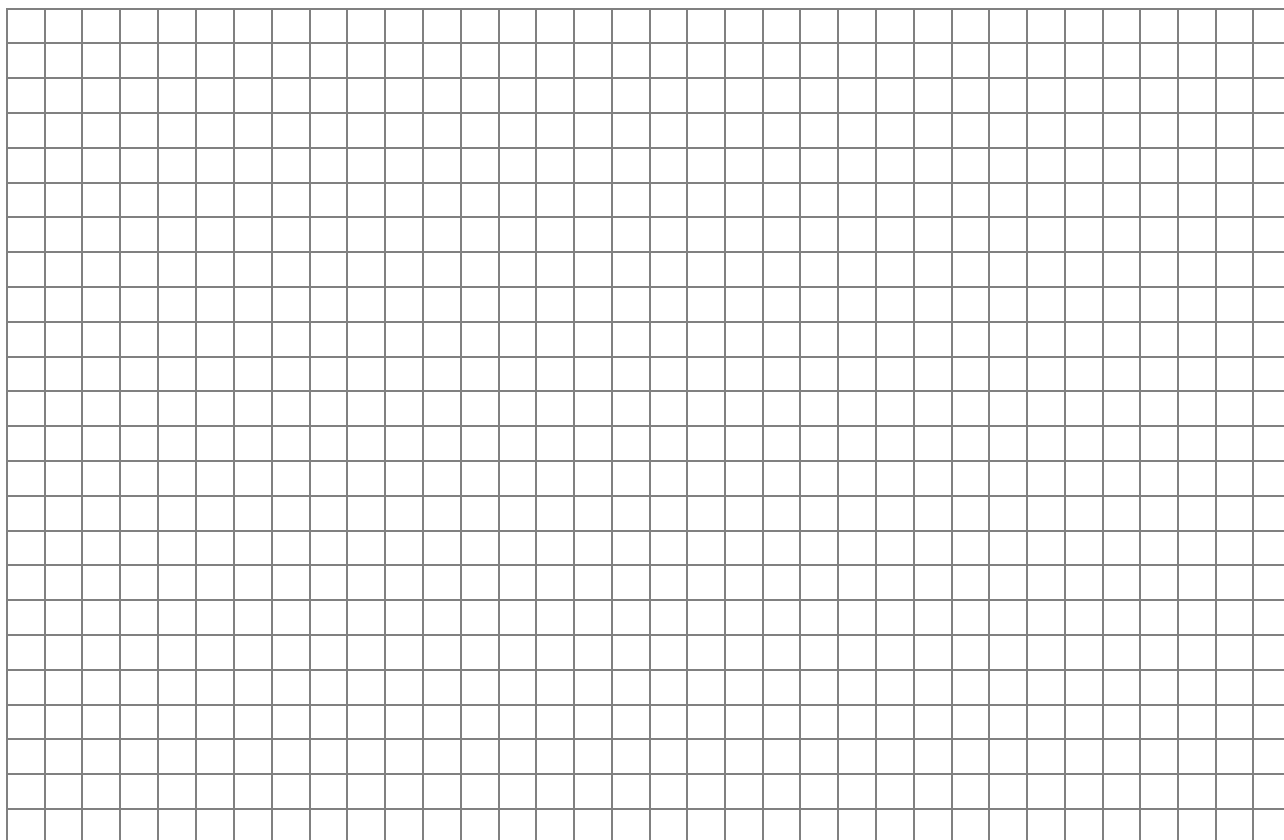
Протокол работы

2.3. Результаты опыта

| Время инкубации, мин | Объем NaOH, пошедшего на титрование, мл | | |
|----------------------|---|--------|----------|
| | Опыт 1 | Опыт 2 | Контроль |
| 0 | | | |
| 10 | | | |
| 20 | | | |
| 30 | | | |

Результаты первого титрования, полученного до начала действия липазы, вычитают из результатов последующих титрований.

По полученным данным строят график, где ось абсцисс – время (минуты), ось ординат – активность липазы (объем р-ра NaOH (мл), потраченного на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени). Делают выводы об условиях работы липазы.



Работа 7. Исследование состава фосфатидилхолина

В этом методе фосфатидилхолин (лецитин) в яичном желтке гидролизуется при нагревании в растворе NaOH, и определяются структурные компоненты (жирные кислоты, глицерин, холин и фосфорная кислота) в гидролизованном продукте. Холин при нагревании в щелочной среде превращается в триметиламин $N(CH_3)_3$.

Реактивы: сухой желток куриного яйца, 10%-ный р-р NaOH, 10%-ный р-р HCl, конц. HNO_3 , молибденовый реактив, 1%-ный р-р $CuSO_4$.

Ход работы. Гидролиз фосфатидилхолина. Кусочек яичного желтка помещают в пробирку, добавляют 3...4 мл 10%-ного раствора NaOH, кипятят в водяной бане 15 мин.

Гидролизат делят на три пробирки: 1. Обнаружение жирных кислот. К гидролизату 1-й пробирки прибавляют по каплям 10%-ный раствор HCl до появления хлопьевидной взвеси жирных кислот.

2. Обнаружение фосфорной кислоты. Ко второй части гидролизата осторожно добавляют 5 – 7 капель концентрированной HNO_3 и по каплям молибденовый реактив до появления желтого осадка фосфомолибдата аммония. При необходимости нагревают в кипящей водяной бане. После охлаждения пробирки в струе воды фосфомолибдат аммония выпадает в осадок.

3. Обнаружение глицерола. К 3-й части гидролизата добавляют 5 капель 10%-ного раствора NaOH и 1 каплю 1%-ного раствора $CuSO_4$, перемешивают. Образуется хелатное соединение меди с глицеролом ярко-синего цвета.

Записывают результат реакций и выводы в виде табл. 2.4.

Протокол работы

2.4. Результаты опытов

| Продукты гидролиза фосфатидилхолина | Результат реакции | Вывод о наличии |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------|
| Холин | | |
| Жирные кислоты | | |
| Фосфорная кислота | | |
| Глицерол | | |

Контрольные вопросы и ситуационные задачи:

Задача № 1. Это вещество было выделено из яичного желтка в 1846 году французским химиком и фармацевтом Теодором Гобле и названо им лецитином (др. греч. λέκιθος – яичный желток).

1. Назовите современное название этого вещества.
2. Назовите роль лецитина в организме.
3. Какова классификация липидов? В чем отличия липидов и жиров?
4. Что такое число омыления и как оно определяется?
5. Что такое кислотное число, как оно определяется и что характеризует?
6. Раскройте принцип метода определения желчных кислот.

Лабораторная работа № 3

БЕЛКИ. АМИНОКИСЛОТЫ И ПЕПТИДЫ

Цель работы: изучить физико-химические свойства белков, освоить методы количественного определения аминокислот и пептидов.

Методические указания

Белки (протеины, полипептиды) – это высокомолекулярные природные соединения, состоящие из аминокислот. Они выполняют каталитические, регуляторные, структурные, кинетические, защитные и транспортные функции. Белки являются наиболее важными компонентами пищи, обеспечивая аминокислоты, необходимые людям и животным.

Разнообразие и специфичность белков в значительной степени зависят от последовательности и порядка аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Белки характеризуются сложными пространственными структурами, которые определяют их свойства и функции.

Сочетание специфических и общих физико-химических свойств белков (таких как реакция с образованием хромосом, осаждение из раствора и денатурация, приводящая к потере присущих свойств) полезно при распознавании, выделении и очистке белковых образцов. Процессы тепловой денатурации играют особую роль при выпечке хлеба, производстве макаронных изделий, бланшировании растительных ингредиентов, а также при переработке мясных и молочных продуктов. Использование технологии экстракции белков является основополагающим при переработке молока и производстве сыра.

Аминокислоты – это гетерофункциональные соединения с амино- и карбоксильными группами. Они являются строительными блоками белков и пептидов (низкомолекулярных фрагментов белков) и содержатся в различных видах сырья. Из 20 аминокислот, входящих в состав белков, восемь называются незаменимыми аминокислотами и не могут быть синтезированы человеком или животными, поэтому их необходимо получать из рациона. Содержание аминокислот в сырье и продуктах, а также их качественный и количественный состав не только характеризуют пищевую ценность конечного продукта, но и влияют на интенсивность многих технологических процессов.

Аминокислоты, подобно белкам, являются амфотерными электролитами и существуют в водных растворах в виде дипольных ионов $^+\text{NH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}^-$. Способность аминокислот находиться в растворе в ионизированном состоянии и их кислотно-основные свойства имеют важное значение для идентификации и количественного анализа аминокислот, пептидов и белков.

Приготовление белкового раствора

10 мл яичного белка растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Часть 1. Физико-химические свойства белка

Цель работы: научиться осажать белки из раствора разными методами и использовать способность к осаждению белков в лабораторной практике.

Реакции осаждения белков

Чтобы осадить белки, необходимо лишить их факторов, удерживающих их в растворе, используя различные агенты, которые уменьшают их заряд или разрушают гидратную оболочку белковых частиц. Существует два типа реакций осаждения: обратимые и необратимые.

1. Обратимые реакции преципитации не приводят к существенному изменению структуры белка, и полученный преципитат может быть повторно растворен в исходном растворителе. Белок сохраняет свои первоначальные нативные свойства, в том числе биологические.

2. Необратимые реакции значительно изменяют структуру белка, поэтому полученный осадок не может быть растворен в исходном растворителе. Происходит денатурация белка. Денатурация – это изменение белка таким образом, что он теряет свои первоначальные биологические и физико-химические свойства, теряет свою гидрофильность и способность растворяться в воде.

Практическое значение реакций денатурации белков заключается в том, что они дают возможность 1) изучать свойства белков, 2) освобождать жидкости от присутствия белков, 3) устанавливать наличие белков в моче при патологических состояниях, 4) разделять отдельные белковые фракции на альбумин и глобулин.

Работа 1. Осаждение белков при нагревании (термическая денатурация)

Большинство белков денатурируют при нагревании (выше 50 °С). Механизм тепловой денатурации связан с перестройкой белковой молекулы, в результате чего происходит потеря нативных свойств белков и снижение растворимости (снижение гидрофильности приводит к разрушению гидратной оболочки). Присутствие солей и концентрация водородных ионов играют важную роль в осаждении термически денатурированных белков. Наиболее полное и быстрое выпадение осадка происходит в изоэлектрической точке белка, т.е. при значении рН, при котором коллоидные частицы белка наименее стабильны. Поэтому для того, чтобы белок полностью выпал в осадок при нагревании, должна произойти реакция среды, соответствующая его изоэлектрической точке. Белки с кислотными свойствами осаждаются в слабокислой среде, а белки с щелочными свойствами – в слабощелочной среде. Термоденатурированные белки не выпадают в осадок в сильноокислых или сильнощелочных растворах. Это происходит потому, что частицы белка перезаряжаются (или их существующий заряд усиливается) и становятся положительно заряженными в первых и отрицательно заряженными во вторых. В результате возникают электростатические силы отталкивания, которые повышают стабильность раствора. Таким образом, в сильноокислых или сильнощелочных растворах белки обычно не выпадают в осадок при нагревании. Однако в сильноокислых растворах белок затвердевает, если к нему в достаточном количестве добавить любую нейтральную соль. Степень влияния нейтральных ионов соли на выпадение белка в осадок зависит от их способности адсорбироваться на частицах белка. Адсорбированные ионы соли нейтрализуют заряд на частицах. Наступает момент, когда межмолекулярное притяжение превышает силу отталкивания, и белок выпадает в осадок.

Реактивы: раствор белка, 1%-ный раствор CH_3COOH , 10%-ный раствор NaOH , насыщенный раствор NaCl .

Ход работы. Поместите по 5 капель раствора яичного белка (без NaCl) в каждую из пяти пробирок. Поместите нейтральный раствор в первую пробирку и доведите до кипения. Жидкость становится мутной, потому что водная оболочка вокруг молекул белка разрушается, и частицы белка становятся крупнее. Мицеллы белка заряжены и удерживаются во взвешенном состоянии; во второй пробирке нагрейте раствор белка до кипения и добавьте каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты (чтобы слегка подкислить его). Через некоторое время выпадает хлопьевидный осадок белка. Частицы белка теряют заряд и приближаются к изоэлектрическому состоянию; в третью пробирку добавьте 5 капель 1%-ного раствора уксусной кислоты (для получения сильноокислой реакции среды). Кипячение не приводит к образованию осадка, поскольку белковые мицеллы перезаряжаются и становятся положительно заряженными, что повышает их стабильность. В четвертую пробирку добавляют 2 капли 10%-ного раствора NaOH для создания щелочной среды. В щелочной среде отрицательный заряд белковых частиц увеличивается, поэтому при кипячении жидкости осадок не образуется. В пятую пробирку добавляют 5 капель 1%-ной уксусной кислоты и 2 капли раствора NaCl и нагревают. Белок выпадает в осадок в виде белых хлопьев, потому что белковые частицы теряют свой заряд из-за взаимодействия с противоположно заряженными ионами хлорида натрия.

Протокол работы

Записать в табл. 3.1 результаты осаждения белков при кипячении в различных средах и в каждом случае указать причину появления или отсутствия осадка белка.

3.1. Результаты исследований

| Щелочная среда | Нейтральная среда | Слабокислая среда | Сильнокислая среда | Сильнокислая среда + электролит |
|----------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------------------|
| | | | | |

Работа 2. Термохимическая денатурация

Термокальциевая коагуляция белков молока широко используется в молочной промышленности и характеризуется изоэлектрическим осаждением казеина и одновременной денатурацией сывороточных белков (лактальбумина и лактоглобулина) под воздействием высокой температуры.

Реактивы: молоко, CaCl_2 4%.

Ход работы. Взвесьте 5 мл испытуемого молока в толстостенной пробирке и добавьте 5 капель 4%-ного раствора хлорида кальция. Поместите пробирку в кипящую водяную баню, чтобы белок полностью выпал в осадок; через 4 мин выньте пробирку из бани и наблюдайте за осадком.

Работа 3. Осаждение белка органическими растворителями

Белки нерастворимы во многих органических растворителях. Однако их осаждение происходит только из нейтральных и слабокислых растворов и особенно полно в присутствии электролитов (ионные соли связываются коллоидными частицами и снимают заряд). Органические растворители дегидратируют частицы белка (разрушают водную оболочку) и этим понижают их устойчивость в растворе. Кратковременное воздействие органических растворителей сохраняет белок в естественном состоянии, продолжительное воздействие приводит к денатурации.

Реактивы: раствор белка, спирт или ацетон, насыщенный раствор NaCl .

Ход работы. Поместите в пробирку 5 капель раствора яичного белка и 20 капель спирта или ацетона. Раствор мутный. При добавлении нескольких капель насыщенного раствора хлорида натрия белки выпадают в осадок. Обратимость этого явления подтверждается добавлением избытка дистиллированной воды.

Работа 4. Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами

Осаждение белка концентрированными кислотами происходит вследствие дегидратации белковых частиц и в итоге нейтрализации их зарядов, а также в связи с рядом других причин (денатурация, образование солей и др.). В избытке серной и соляной кислот, а также при их длительном воздействии выпавший осадок денатурированного белка растворяется, по-видимому, за счет перезарядки белка и частичного гидролиза. В избытке азотной кислоты растворения не происходит.

Реактивы: раствор белка, концентрированные HCl , H_2SO_4 , HNO_3 .

Ход работы. В три пробирки капните по 15 – 20 капель концентрированной соляной, серной и азотной кислот. Затем равные количества белка осторожно настилают друг на друга так, чтобы жидкости не смешивались; на границе между двумя слоями жидкости появляется тонкая пленка белкового осадка. Осторожное встряхивание пробирок подтверждает, что белковый осадок растворяется в случае осаждения соляной и серной кислотой, и что белок не растворяется в случае осаждения азотной кислотой.

Работа 5. Осаждение белка органическими кислотами

Белки из растворов могут осаждаться органическими кислотами, однако различные органические кислоты неодинаково действуют на белок. Механизм осаждения белков органическими кислотами объясняется дегидратацией белковой молекулы и снятием заряда.

Реактивы: раствор белка, 10%-ный раствор CH_3COOH , 20%-ный раствор сульфосалициловой кислоты $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})(\text{COOH})\text{SO}_3\text{H}$.

Ход работы. В две пробирки наливают по 5 капель раствора белка, затем в одну пробирку добавляют 1–2 капли раствора уксусной кислоты, в другую – столько же раствора сульфосалициловой кислоты. В пробирках образуется осадок.

Работа 6. Осаждение белка солями тяжелых металлов

Когда соли тяжелых металлов действуют на раствор белка, происходит денатурация белковой молекулы. Денатурированный белок выпадает в осадок, поскольку тяжелый металл адсорбируется на поверхности белковой молекулы и образует нерастворимый комплекс. Способность белков связывать тяжелые металлы имеет медицинское применение: белки используются в качестве антидотов для таких солей, как ртуть, свинец и медь. Белки образуют нерастворимые комплексы с тяжелыми металлами, тем самым ограничивая их поглощение. При осаждении белков солями некоторых тяжелых металлов избыток этих солей приводит к растворению первоначально образовавшегося осадка, что связано с адсорбцией тяжелых металлов на поверхности коллоидных частиц и появлением положительных зарядов на белковых молекулах. Растворения не наблюдается в присутствии избытка серебра или ртути.

Реактивы: раствор белка, 10%-ный раствор CuSO_4 , 5%-ный раствор уксуснокислого свинца.

Ход работы. В две пробирки вносят по 5 капель раствора яичного белка и по 1 капле в первую пробирку 7%-ного раствора сульфата меди, во вторую – 5%-ного раствора уксуснокислого свинца. В пробирках образуется осадок. В первую пробирку добавляют еще 5 – 10 капель 7%-ного раствора сульфата меди, при этом наблюдается растворение осадка.

Протокол работы

Результаты всех опытов вносят в табл. 3.2.

3.2. Результаты исследований

| Осадитель | Употребляемые реактивы | Характер и цвет осадка | | | Чем обусловлена реакция |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|--------------|---------|-------------------------|
| | | Яичный | Растительный | Желатин | |
| Органические растворители | | | | | |
| Минеральные кислоты (конц.) | | | | | |
| Органические кислоты | | | | | |
| Соли тяжелых металлов | | | | | |

Растворимость белков

Работа 7. Растворимость альбуминов и глобулинов

Многие белки растворимы в воде благодаря наличию свободных гидрофильных групп (-ОН, -NH₂, -СОН и т.д.) на поверхности белковой молекулы. Растворимость белков различна; белки опорных тканей (кератин, коллаген и т.д.) нерастворимы в воде. Растворимость белка в воде зависит от природы белка, реакции среды и присутствия электролитов. Белки с кислотными свойствами (альбумин, глобулин, проламин, глютелин) лучше растворяются в кислой среде. Белки со щелочными свойствами (протамин, гистамин) лучше растворяются в щелочной среде. Белки альбумина растворимы в дистиллированной воде, а глобулин растворяется в воде только в присутствии электролитов.

Реактивы: яичный белок, 5%-ный раствор NaCl, дистиллированная вода.

Ход работы. В одну пробирку добавьте 2 капли неразбавленного яичного белка и 20 капель воды. Перемешайте содержимое. Альбумин растворится, а глобулин выпадет в виде небольшого осадка. В другую пробирку добавьте 2 капли яичного белка и 20 капель 5%-ного раствора хлорида натрия. Растворите альбумин и глобулин слабым физраствором. Поместите небольшое количество кератина (волос) в оставшиеся две пробирки. Добавьте 20 капель воды в одну пробирку и 20 капель раствора хлорида натрия в другую. Кератин нерастворим ни в воде, ни в физрастворе.

Протокол работы

Результаты работы оформляются в виде табл. 3.3, где растворимость обозначают знаком «плюс» (+), а отсутствие растворимости – знаком «минус» (-).

3.3. Результаты исследований

| Название белка | H ₂ O | 5%-ный р-р NaCl |
|-----------------|------------------|-----------------|
| Яичный альбумин | | |
| Яичный глобулин | | |
| Кератин | | |

Высаливание белков

Работа 8. Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка

Высаливанием называется процесс выделения белков из водных растворов нейтральными растворами концентрированных солей щелочных и щелочноземельных металлов. Когда в раствор белка добавляется высокая концентрация соли, частицы белка обезвоживаются и теряют свой заряд, в результате чего белок выпадает в осадок. Степень осаждения белка зависит от ионной силы раствора осадителя, размера частиц белковых молекул, величины заряда и гидрофильности раствора. Различные концентрации соли осаждают различные белки. Поэтому в осадках, полученных путем постепенного увеличения концентрации соли, отдельные белки присутствуют в разных фракциях. Высаливание белков является обратимым процессом, и белки восстанавливают свои нативные свойства после удаления соли. Поэтому высаливание используется в клинической практике для разделения сывороточных белков.

Реактивы: яичный белок, насыщенный (NH₄)₂SO₄, измельченный порошок (NH₄)₂SO₄, 10%-ный раствор NaOH, 1%-ный раствор CuSO₄.

Ход работы. Поместите 20 капель основного раствора яичного белка в пробирку, добавьте равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и перемешайте. Получают полунасыщенный раствор сульфата аммония и выпадает осадок яичного глобулина; через 5 мин осадок отфильтровывают. Другой белок, яичный альбумин, остается в фильтрате. Для обессоливания альбумина добавляют измельченный сульфат аммония до тех пор, пока фильтрат не станет насыщенным, т.е. соль перестанет быть растворимой. Выпавший осадок альбумина отфильтровывают, а с фильтратом проводят биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белка.

Протокол работы

Результаты работы заносят в табл. 3.4.

3.4. Результаты исследований

| Название белка | Используемая соль | Степень насыщения | Образование белка |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Глобулин | | | |
| Альбумин | | | |

Определение изоэлектрической точки белков

Изоэлектрическая точка белка – это значение pH среды, при котором белок существует в виде нейтральной молекулы с равным количеством положительного и отрицательного заряда (изоэлектрическое состояние). При других концентрациях ионов водорода в растворе преобладают положительные и отрицательные ионы белка. Растворы белков в изоэлектрической точке наименее стабильны и легко выпадают в осадок. Для многих белков изоэлектрическая точка близка к нейтральной среде, но не совпадает с ней полностью, смещаясь в кислую сторону, а некоторые белки имеют изоэлектрические точки в слабощелочной среде. Измерение изоэлектрической точки может быть сведено к определению pH раствора, при котором осаждение белков происходит наиболее быстро и полностью наблюдается. Для проведения экспериментальной работы необходимо изучить понятие изоэлектрической точки белка.

Работа 9. Определение изоэлектрической точки казеина

Реактивы: молоко, 10%-ный раствор CH_3COOH , дистиллированная вода, 0,2 М раствор CH_3COONa , 0,2 М раствор CH_3COOH .

Ход работы.

1. Извлекать казеин из молока: к 2 мл молока добавьте 2 мл дистиллированной воды и 2 капли 10%-ной уксусной кислоты. Образуется осадок казеина, который отфильтровывают. Фильтрат отбрасывают, осадок казеина осторожно снимают с фильтра стеклянной палочкой и помещают в чистую пробирку.

2. Определить изоэлектрическую точку казеина. В семь сухих пробирок налейте количество реагента, указанное в табл. 3.5; через 5...10 мин во всех пробирках выпадает осадок (помутнение), но больше всего осадка наблюдается в пробирке с pH, соответствующим изоэлектрической точке белка.

Протокол работы

3.5. Исходные данные и результаты исследований

| Количество 0,2 М CH_3COONa , мл | Количество H_2O , мл | Количество 0,4%-ного раствора казеина в 0,2 М CH_3COONa , мл | pH смеси | Степень помутнения |
|---|--------------------------------------|--|----------|--------------------|
| 1,6 | 0,4 | 0,2 | 3,8 | |
| 0,8 | 1,2 | 0,2 | 4,1 | |
| 0,4 | 1,6 | 0,2 | 4,4 | |
| 0,2 | 1,8 | 0,2 | 4,7 | |
| 0,1 | 1,9 | 0,2 | 5,0 | |
| 0,06 | 1,94 | 0,2 | 5,3 | |
| 0,3 | 1,97 | 0,2 | 5,6 | |

Результаты опытов представить в виде табл. 3.5. В графе «Степень помутнения» отсутствие осадка обозначить знаком «минус» (-), наличие его знаком «плюс» (+), значительное помутнение несколькими «плюсами».

Часть 2. Гидролиз белков

Работа 10. Гидролиз белков

Цель работы: научиться выделять сложные белки из различных объектов и проводить качественные реакции на компоненты сложных белков.

Гидролиз – это расщепление сложных веществ на более простые компоненты путем добавления воды в местах разрыва связей. В зависимости от используемого катализатора различают кислотный, щелочной и ферментативный гидролиз. При простом гидролизе белка конечным продуктом являются аминокислоты. Белки в организме постоянно гидролизуются под действием протеолитических ферментов во время пищеварения и клеточной активности. При гидролизе белков в кислой среде некоторые аминокислоты разрушаются (триптофан разрушается полностью, серин, треонин, цистин, тирозин и фенилаланин разрушаются частично). При щелочном гидролизе степень расщепления аминокислот очень высока. При кислотном гидролизе белки сначала расщепляются на высокомолекулярные пептиды, затем на низкомолекулярные пептиды, дипептиды и аминокислоты. Сложные белки состоят из аминокислот и небелковых компонентов (групп комплемента). К сложным белкам относятся нуклеопротеины, цветные белки, фосфопротеины, гликопротеины, сложные ферментные белки и металлопротеины. Для проведения экспериментальной работы необходимо ознакомиться с процессами гидролиза простых и сложных белков.

Реактивы: 1%-ный раствор яичного белка, ацетон, 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, конц. HNO_3 , 1%-ный раствор CuSO_4 , конц. H_2SO_4 , 5%-ный раствор $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, танин, 20%-ный раствор сульфосалициловой кислоты.

Ход работы. Добавьте 5 капель 1%-ного раствора яичного белка в каждый ряд пронумерованных пробирок и добавьте реагенты, как указано в табл. 3.6. При гидролизе несколько капель гидролизата до нейтрализации добавляют в биуретовую реакцию. Пептоны, промежуточные продукты распада белков, приобретают розовый или красный цвет, в то время как белки становятся синевато-фиолетовыми.

Протокол работы

3.6. Исходные данные и результаты исследований

| № проб | Используемые реактивы | Число капель | Механизм и особенности реакции | Результат |
|---|-----------------------|--------------|---|-----------|
| Денатурация солями тяжелых металлов | | | | |
| 1 | Меди сульфат | 2 | Ионы металлов связываются с заряженными группами аминокислот, в результате чего изменяется пространственная структура белка | |
| 2 | Свинца ацетат | 2 | | |
| Денатурация концентрированными минеральными кислотами | | | | |
| 3 | Азотная | 2 | Концентрированные кислоты вызывают дегидратацию белков, нейтрализуют заряд белка, связываясь с катионными группами | |
| 4 | Серная | 2 | | |
| 5 | Азотная | 10 | Исчезновение осадка белка при добавлении избытка серной кислоты обусловлено перезарядкой ионных групп | |
| 6 | Серная | 10 | | |
| Денатурация органическими кислотами | | | | |
| 7 | Трихлоруксусная | 2 | Кислоты нейтрализуют заряд белка, разрушают систему водородных связей и образуют комплексы с белком | |
| 8 | Сульфосалициловая | 2 | | |
| Денатурация дубильными веществами | | | | |
| 9 | Танин | 2 | Образуются нерастворимые солеобразные соединения с аминогруппами основных аминокислот | |
| Денатурация органическими растворителями | | | | |
| 10 | Ацетон | 5 | Нарушаются гидрофобные взаимодействия внутри белковой молекулы | |

Знаками «+» и «-» отмечают результаты наблюдения. Интенсивность денатурации указывают числом знаков «+». Необратимость или обратимость осаждения белка устанавливают добавлением к осадку 20 – 30 капель дистиллированной воды.

Работа 11. Хромопротеиды

Хромопротеины – это сложные белки, в которых комплементарная группа представлена не белком, а окрашенным соединением (пигментом). Различные окрашенные белки могут принадлежать к разным классам органических соединений (порфирины, каротиноиды, производные витаминов и т.д.). Белки, содержащие порфириновые пигментные соединения, такие как гемоглобин крови, миоглобин мышц и ферменты (каталаза, пероксидаза, цитохром и др.), являются наиболее важной группой белков.

Гемоглобин состоит из глобина, белка, и гема, пигментной части. Химически гем представляет собой соединение протопорфирина и двухвалентного железа, которое в особых условиях может быть преобразовано в трехвалентное железо.

Анализ Тейхмана на содержание гемина. При нагревании высушенной крови в ледяной уксусной кислоте гемоглобин распадается на глобин и гематин. Гематин под воздействием хлористого водорода, образующегося при взаимодействии хлорида натрия (присутствующего в крови или добавленного) и уксусной кислоты, превращается в хлорпроизводное гематина, которое кристаллизуется при охлаждении.

В отличие от гема в гемине трехвалентное железо связано с атомом хлора.

Реактивы: кровь, ледяная CH_3COOH , насыщенный раствор NaCl .

Ход работы. Поместите каплю свежей крови на предметное стекло и высушите, держа его высоко над пламенем горелки, чтобы она не нагрелась выше 60°C (контролируйте нагрев, прижимая стекло тыльной стороной ладони, чтобы оно не закипело). Добавьте 1–2 капли концентрированной уксусной кислоты в высушенную кровь, тщательно перемешайте стеклянной палочкой, накройте предметным стеклом и осторожно нагревайте, пока кислота не начнет кипеть. Затем предметные стекла охлаждают и рассматривают под микроскопом на предмет ромбовидных кристаллов гемоглобина, которые образовались при разложении гемоглобина. Если кристаллы не обнаружены, снимите покровное стекло, добавьте 2–3 капли концентрированной уксусной кислоты, нагрейте, охладите и снова наблюдайте под микроскопом.

Для старых пятен проведите тест на гемин, соскоблив пятно или разрезав окрашенную ткань на мелкие кусочки. Перед обработкой ледяной уксусной кислотой добавьте один маленький кристалл хлорида натрия.

Работа 12. Фосфопротеиды

Фосфопротеины – это сложные белки, состоящие из простого белка и небелковой части – фосфата. Фосфорные кислоты связаны с белками через гидроксильные группы оксиаминокислот серина и треонина. К ним относятся казеин в молоке, вителлин в яичном желтке, ихтулин в икре и др. Фосфопротеины относятся к питательным веществам, необходимым для эмбрионального развития.

Реактивы: молоко, CH_3COOH , 1%-ный раствор CuSO_4 , 10%-ный раствор NaOH , 10%-ный раствор HNO_3 , фенолфталеин, молибденовый реактив.

Ход работы. Выделение казеина из молока. К 2 мл молока добавляют 2 мл дистиллированной воды и 2 капли 10%-ной уксусной кислоты. Образуется осадок казеина, который отфильтровывают. Фильтрат отбрасывают, а осадок казеина осторожно снимают с фильтра стеклянной палочкой и помещают в чистые пробирки.

Гидролиз казеина. В пробирку помещают выделенный из молока казеин и приливают 2 мл 10%-ного раствора едкого натра. Кипятят 10...15 мин на асбестовой сетке с обратным холодильником, затем охлаждают пробирку и проводят реакцию на продукты гидролиза.

Обнаружение белка. Белок обнаруживают биуретовой реакцией. В пробирку к трем каплям гидролизата добавляют одну каплю 1%-ного раствора сернокислой меди. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

Обнаружение фосфата. Оставшийся гидролизат подкисляют несколькими каплями 10%-ного раствора азотной кислоты в присутствии 1–2 капель фенолфталеина (до обесцвечивания) и отфильтровывают в сухую пробирку. К 5 каплям фильтрата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят несколько минут. Жидкость окрашивается в желтый цвет, а затем при охлаждении выпадает желтый осадок фосфорно-молибденового аммония, указывающий на присутствие фосфата в гидролизате:



Фосфатно-
молибденовый
аммоний

Работа 13. Гликопротеиды. Открытие углеводного компонента в яичном белке

Гликопротеиды – сложные белки, в простетические группы которых входят углеводы и их производные. Гликопротеиды содержатся почти во всех тканях и жидкостях организма, носят общее название муцинов и мукоидов и выполняют опорную и защитную функции. При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит их дегидратация: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз – оксиметилфурфурол. Они дают с тимолом или α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты продукты конденсации красного цвета.

Реактивы: яичный белок, концентрированная H_2SO_4 , 1%-ной раствор тимола, концентрированная CH_3COOH .

Ход работы. К 10 каплям профильтрованного гидролизата добавляют 2–3 капли 1%-ного раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно настилают 20 капель концентрированной H_2SO_4 . При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфурола с тимолом.

Протокол работы

Результаты работ оформить в табл. 3.7.

3.7. Результаты исследований

| Наименование сложного белка | Химическая структура простетической группы | Употребляемые реактивы | Продукты реакции | Чем обусловлена реакция? |
|-----------------------------|--|------------------------|------------------|--------------------------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

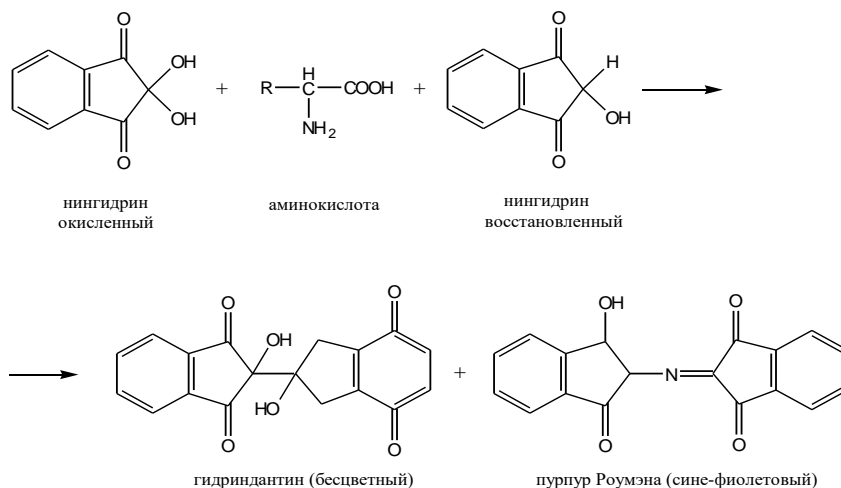
Часть 3. Химическая природа белка (цветные реакции)

Цель работы: приобретение практических навыков по проведению качественного анализа биологических жидкостей на присутствие аминокислот, пептидов и белков с помощью цветных реакций.

Присутствие белка в растворах можно обнаружить с помощью цветных реакций, обусловленных наличием в белке аминокислот, их специфических групп и пептидных связей. Существуют универсальные цветные реакции, т.е. на все белки (биуретовая и нингидриновая), и специфические, т.е. на определенные аминокислоты (ксантопротеиновая, Миллона, Фоля и др.).

Работа 14. Нингидриновая реакция на α -аминогруппу (реакция Рузмана)

Эта реакция вызывается наличием аминогруппы в α -положении аминокислот. Белки, полипептиды и аминокислоты образуют синие или голубовато-фиолетовые соединения при кипячении с нингидрином. Нингидриновая реакция является одной из наиболее чувствительных реакций для обнаружения α -аминогрупп.



Суть реакции заключается в том, что α -аминокислоты и пептиды реагируют с нингидрином, вызывая окислительное дезаминирование и декарбоксилирование. В зависимости от среды образуются различные продукты реакции. Механизм реакции сложен, но схематично его можно представить, как на рисунке.

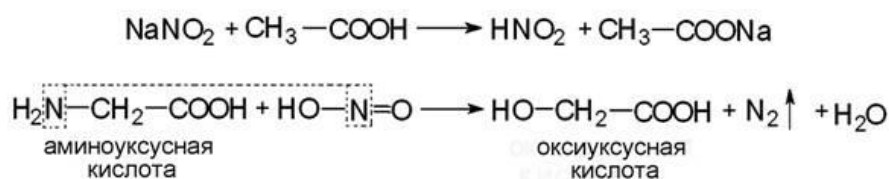
Реактивы: яичный белок, 1%-ный раствор (белок куриного яйца фильтруют через марлю и разводят дистиллированной водой 1:10), нингидрин, 0,5%-ный водный раствор.

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель раствора яичного белка, затем 5 капель нингидрина, нагревают смесь до кипения. Появляется розово-фиолетовое окрашивание, переходящее с течением времени в сине-фиолетовое.

Работа 15. Реакция с азотистой кислотой (реакция Ван Слайка)

Реактивы: глицин, 1%-ный раствор – 1 мл; NaNO_2 , 5%-ный раствор – 1 мл; CH_3COOH , концентрированная – 0,5 мл.

Ход работы. Поместите в пробирку 1 мл 1%-ного раствора глицина и равный объем 5%-ного раствора нитрита натрия. Добавьте 0,5 мл концентрированной CH_3COOH и осторожно встряхните. Появятся пузырьки.

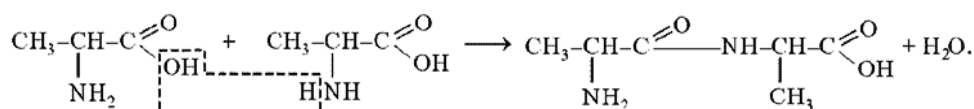


Эта реакция используется для определения первичной аминогруппы алифатических аминов. Альфа-аминокислоты с первичными аминогруппами реагируют с азотистой кислотой. При этом образуется нестабильное диазосоединение, которое разлагается с выделением свободного азота и образованием α -гидроксикарбоновой кислоты. Используя эту реакцию, аминокислоту определяют по объему выделившегося газа.

Работа 16. Реакция Пиотровского (биуретовая реакция)

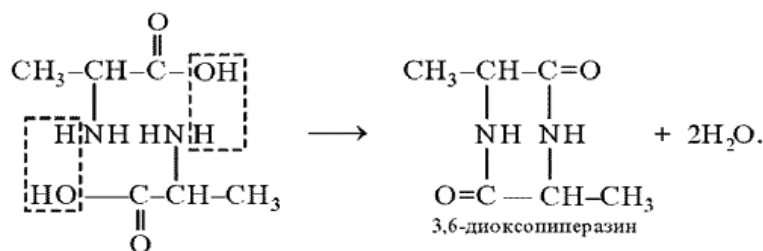
Реактивы: яичный белок, 1%-ный раствор – 2...3 мл; NaOH 20%-ный раствор 2...3 мл; CuSO_4 .

Ход работы. Добавьте 2...3 мл 20%-ного раствора едкого калия или натрия и несколько капель раствора медного купороса к 2...3 мл раствора белка и нагрейте. Появляется пурпурная окраска из-за образования комплексного соединения белка и меди.



В белках аминокислоты связаны друг с другом по типу полипептидов и дикетопиперазинов. Образование полипептидов из аминокислот происходит путем отщепления молекулы воды от аминогруппы одной молекулы аминокислоты и карбоксильной группы другой молекулы. Образующаяся группа —C(O)—NH— называется пептидной группой, связь C—N , соединяющая остатки молекул аминокислот, – пептидной связью. При взаимодействии дипептида с новой молекулой аминокислоты получается трипептид и т.д.

Дикетопиперазины образуются при взаимодействии двух молекул аминокислот с отщеплением двух молекул воды:

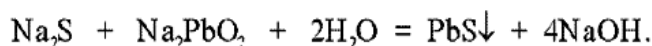
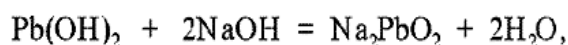
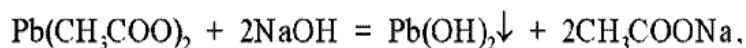
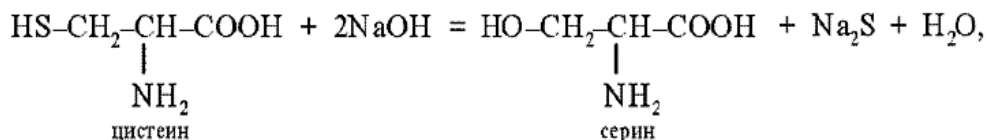


Наличие в белке повторяющихся пептидных групп подтверждается тем, что белки дают фиолетовое окрашивание при действии небольшого количества раствора медного купороса в присутствии щелочи (биуретовая реакция).

Работа 17. Реакция Фоля (на цистеин)

Реактивы: яичный белок, 1%-ный раствор; NaOH – 20%-ный раствор 0,5 мл; ацетат свинца (II) – 0,5 мл.

Ход работы. Капают 5 капель раствора белка в пробирку и добавляют 0,5 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия. Смесь нагревают до кипения и добавляют 0,5 мл раствора ацетата свинца (II). Наблюдается серо-черный осадок сульфида свинца (II):

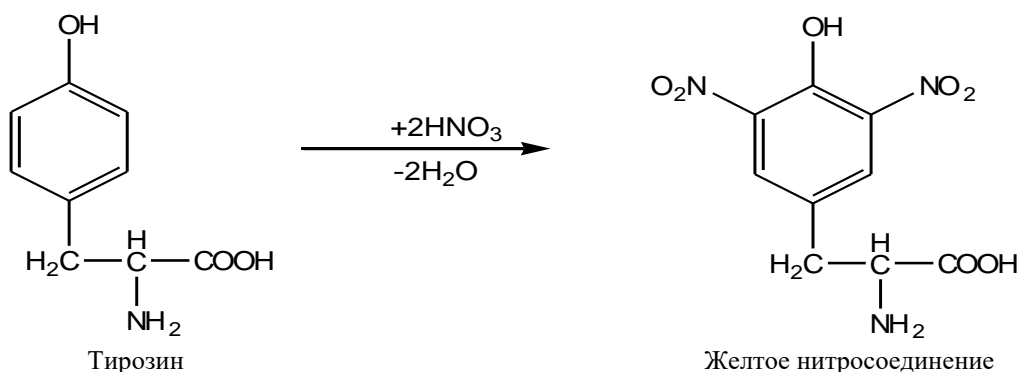


Реакция цистеина и цистина. При гидролизе щелочью «слабосвязанная сера» цистеина и цистина легко высвобождается, образуя сероводород, который реагирует со щелочью с образованием сульфида натрия и калия. При добавлении ацетата свинца образуется серовато-черный осадок сульфида свинца.

Работа 18. Ксантопротеиновая реакция (Мульдера) (на тирозин, триптофан, фенилаланин)

Реактивы: яичный белок – 1%-ный раствор; HNO₃ (конц.) – 0,5 мл; NaOH – 20%-ный раствор – 1...2 мл.

Ход работы. Капните 5 капель раствора белка в пробирку и добавьте 0,5 мл концентрированной HNO₃. Осторожно нагрейте до появления желтого цвета. После охлаждения (предпочтительно после выпадения осадка) добавьте 1...мл 20%-ного раствора гидроксида натрия, пока раствор не станет оранжевым.

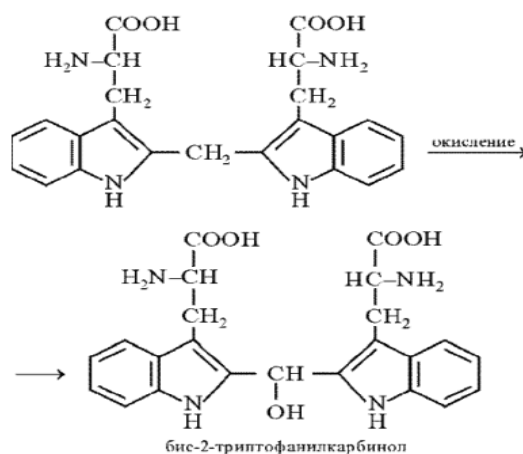


Эта реакция используется для обнаружения α-аминокислот, содержащих ароматические радикалы. Тирозин, триптофан и фенилаланин образуют нитропроизводные желтого цвета при реакции с концентрированной азотной кислотой. Нитропроизводные этих α-аминокислот образуют соли оранжевого цвета в щелочной среде.

Работа 19. Реакция Вуазена (на триптофан)

Реактивы: яичный белок, 5%-ный раствор в 30%-ном растворе KOH – 1 мл; формальдегид 1,25%-ный раствор; HCl (конц.) – 10 мл; NaNO₂ 0,05%-ный раствор.

Ход работы. Добавьте 1 каплю 1,25%-ного раствора формальдегида, 10 мл концентрированной соляной кислоты и через 10 мин добавьте 5 – 7 капель 0,05%-ного раствора нитрита натрия к 1 мл 5%-ного раствора белка в 30%-ном растворе гидроксида калия. Появляется фиолетовая окраска, обусловленная наличием триптофана в белке.



Работа 20. Реакция Адамкевича (на триптофан)

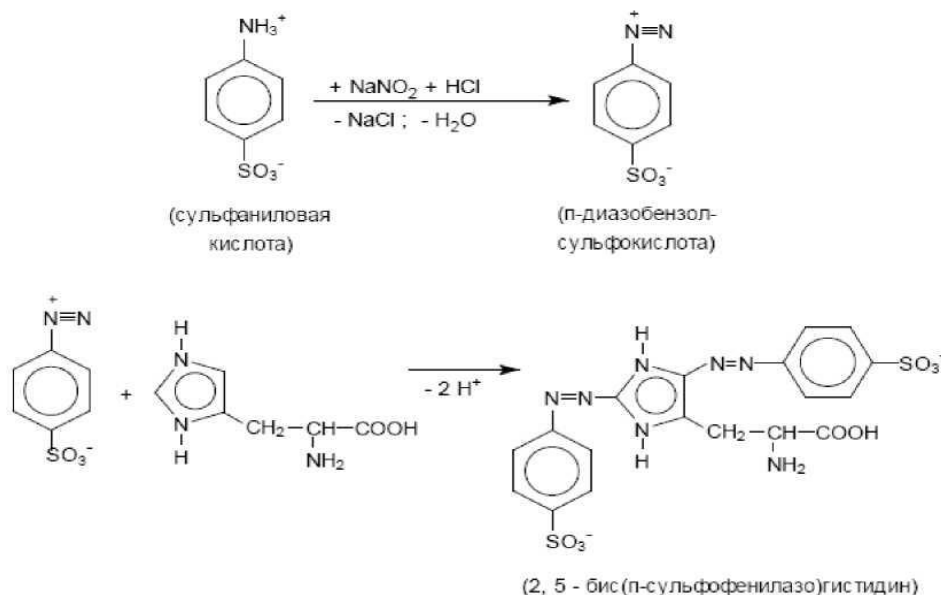
Белки, содержащие триптофан, в присутствии глиоксиловой кислоты и серной кислоты становятся красновато-фиолетовыми. Эта реакция основана на свойстве триптофана реагировать с альдегидом (глиоксидом) в кислой среде с образованием окрашенного конденсированного продукта. Глиоксид всегда присутствует в небольших количествах в ледяной уксусной кислоте, используемой в реакции Адамкевича.

Реактивы: яичный белок, CH_3COOH (ледяная) – 1 мл; H_2SO_4 (конц.) – 1 мл.

Ход работы. К 1 мл 1%-ного раствора яичного белка добавляют 1 мл ледяной CH_3COOH и осторожно нагревают до растворения осадка. После охлаждения к смеси осторожно добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты (по каплям, по стенке пробирки, чтобы жидкости не смешались). Через 5...10 мин на границе раздела двух слоев наблюдают образование красно-фиолетового кольца.

Работа 21. Реакция Паули (на гистидин и тирозин)

Реакция Паули обнаруживается, когда гистидин и тирозин, аминокислоты в белках, образуют комплексы вишневого цвета с диазобензолсульфокислотой. Диазобензолсульфокислота образуется в результате реакции diazotирования при взаимодействии сульфаниловой кислоты и нитрита натрия (или калия) в кислой среде.



Реактивы: яичный белок, сульфаниловая кислота 1%-ный раствор – 1 мл; NaNO_2 0,5%-ный раствор – 2 мл, Na_2CO_3 10%-ный раствор – 6 мл.

Ход работы. Для проведения реакции смешивают 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты (приготовленного из 5%-ного раствора соляной кислоты) и 2 мл 0,5%-ного раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают, добавляют 2 мл 1%-ного раствора яичного белка и после перемешивания добавляют 6 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. После перемешивания смесь окрашивается в вишнево-красный цвет.

Протокол исследований

Результаты работ оформляют в виде табл. 3.8.

3.8. Результаты исследований

| Название реакции | Исследуемый материал | Употребляемые реактивы | Наблюдаемая окраска | Чем обусловлена реакция? |
|------------------|----------------------|------------------------|---------------------|--------------------------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

Часть 4. Количественное определение белка

Для количественного определения белков используются физические, химические и биологические методы.

Из физических методов самым простым является взвешивание чистого белка. Однако этот метод используется редко, поскольку белки очень гигроскопичны и полностью удалить воду из их состава очень сложно.

Существует большое разнообразие методов химического определения белков. Самым простым является определение общего азота или азота белка (после осаждения белка и отделения от растворимого азотсодержащего материала).

Наиболее распространенным методом количественного определения белков является колориметрический метод. Он основан на измерении интенсивности цветной реакции, возникающей при взаимодействии белка с определенным реагентом. Для расчета концентрации белка составляются калибровочные графики.

Биологические методы количественного определения белков применимы только к белкам с ферментативной или гормональной активностью. Измеряя степень биологической активности состава, можно определить, какое количество содержащегося в нем белка обладает этой активностью. Этот метод не дает абсолютных результатов.

Работа 22. Биуретовый метод

Биуретовый метод основан на способности растворов белка давать фиолетовое окрашивание при взаимодействии с раствором сульфата меди в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в растворе.

Реактивы: стандартный раствор белка, содержащий 10 мг в 1 мл, биуретовый реактив – 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (виннокислый натрий-калий, или сегнетова соль) – растворяют в 50 мл H_2O , при энергичном перемешивании приливают 30 мл 10%-ного раствора NaOH , свободного от Na_2CO_3 ; добавляют 0,1 г KI и доводят водой до 100 мл. Хранят в полиэтиленовой склянке.

Ход работы. В четыре сухие пробирки вносят по 0,5 мл раствора белка. В три пробирки помещают стандартные растворы с содержанием белка 2,5; 5,0; 7,5 мг в 1 мл. Эти пробирки служат для построения калибровочной кривой. В четвертую пробирку наливают раствор белка с неизвестной концентрацией, которую необходимо определить.

В каждую пробирку добавляют по 2 мл биуретового реактива. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 20 мин (для развития окраски). Окрашенные растворы колориметрируют на спектрофотометре в кюветах с длиной оптического пути 5 мм, пользуясь зеленым светофильтром (длина волны 540 нм). В качестве контрольного раствора при измерении на спектрофотометре используют биуретовый реактив.

Строят калибровочный график (калибровочную кривую), откладывая на оси абсцисс значения концентрации стандартных растворов белка, а на оси ординат – соответствующие значения оптической плотности. Зная оптическую плотность раствора белка с неизвестной концентрацией, по калибровочной кривой определяют содержание белка. При построении калибровочной кривой необходимо

уметь пользоваться функцией построения графиков в программе Microsoft Excel. Необходимо учитывать тот факт, что диапазон концентраций белка для калибровочного графика зависит от выбранного метода. Например, метод Брэдфорда (см. ниже) довольно чувствительный, но калибровочная кривая должна иметь линейный участок в довольно таки узком интервале концентраций белка. Для каждого метода определения концентрации белка строится своя калибровочная кривая. Обычно для построения калибровочного графика служит один стандартный белок и важно правильно его выбрать. В противном случае это может привести к значительным ошибкам в расчетах содержания белка как в сторону завышения, так и в сторону занижения. Для построения калибровочного графика обычно используют 5 – 8 точек со значениями концентраций, отличающихся не менее чем на 30%. В идеальном случае концентрации стандартных растворов выбирают таким образом, что бы оптическая плотность исследуемого раствора белка была приблизительно в середине калибровочной кривой. Построенную калибровочную кривую необходимо проверять с некоторой периодичностью (приблизительно раз в неделю, иногда реже) со свежеприготовленными стандартными растворами. Определив оптическую плотность исследуемого раствора, находят ее значение на оси ординат, а затем на оси абсцисс соответствующее значение концентрации. Необходимо проверить полученный результат по уравнению прямой, построенной в программе Microsoft Excel, подставив значение оптической плотности под y , и найти x .

Работа 23. Микробиуретовый метод

Реактивы: стандартный раствор белка, содержащий 1 мг в 1 мл, биуретовый реактив для микроопределения (реактив Бенедикта) – 17,3 г цитрата натрия и 10 г Na_2CO_3 – растворяют при подогревании в небольшом количестве воды, в раствор добавляют 1,73 г сульфата меди, растворенного в 10 мл воды, и доводят водой до 100 мл; 6%-ный раствор NaOH.

Ход работы. К 2 мл раствора, содержащего 0,1...2,0 мг белка, добавьте 2 мл 6%-ного раствора NaOH и 0,2 мл раствора Бенедикта. Хорошо перемешайте раствор и через 15 мин измерьте оптическую плотность при 530 нм с помощью спектрофотометра. Предварительно постройте калибровочный график, используя стандартный раствор белка.

Работа 24. Метод Брэдфорда

Это один из самых популярных методов, поскольку он достаточно чувствителен, прост, недорог и быстр. Его главное преимущество – чувствительность (содержание белка можно надежно определить в диапазоне концентраций 10...100 мкг/мл белка). Метод основан на связывании одного из красителей Кумасси с белком. При связывании с белком спектр поглощения красителя изменяется. Интенсивность окраски зависит от концентрации белка в образце в диапазоне 1...10 мкг/мл. Зависимость линейная. Поскольку белки различаются по способности связываться с красителем, рекомендуются построить калибровочную кривую с использованием стандартного белка.

Реактивы: стандартный раствор белка, содержащий 0,05 мг/мл, раствор красителя – 10 мг Кумасси G-250 – гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе в 5 мл 95%-ного раствора этилового спирта, полученный раствор смешивают с 10 мл 95%-ного раствора фосфорной кислоты, разводят до конечного объема (100 мл). Отфильтрованный раствор красителя хранится около 2 недель.

Ход работы. Смешайте 1,5 мл раствора, содержащего 10...50 мкг белка, с 1,5 мл раствора красителя; через 3 – 5 мин измерьте оптическую плотность при 595 нм, используя в качестве контроля образец без белка. В описанных модификациях A595 линейно зависит от количества белка в диапазоне 10...50 мкг.

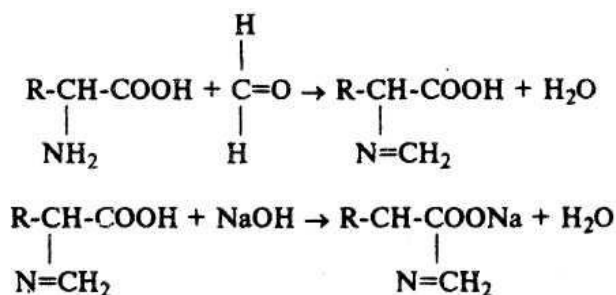
Работа 25. Спектрофотометрический метод

Этот метод основан на свойстве ароматических аминокислот (триптофана, тирозина и фенилаланина) поглощать ультрафиолетовый свет с максимумом при 280 нм. Ультрафиолетовый свет делится на дальний ультрафиолет (10...200 нм) и ближний ультрафиолет (200...400 нм).

Измеряя оптическую плотность при этих длинах волн, можно определить количество белка в растворе. Белки могут сильно отличаться по поглощению в ультрафиолетовой области из-за различного содержания ароматических аминокислот. Обычно, если «средняя» концентрация белка в растворе равна 1 мг/мл, оптическая плотность при 280 нм принимается равной 1,0 (для толщины ячейки 1,0 см). В этом диапазоне концентраций для измерения оптической плотности используется кювета из кварцевого стекла. Если показания оптической плотности больше 1, измерение считается неточным и должно быть учтено при разбавлении раствора и последующем расчете концентрации.

Работа 26. Определение содержания аминного азота формольным титрованием.

При расщеплении белков образуются аминокислоты, которые содержат свободные аминогруппы и карбоксильные группы. Чтобы определить количество аминогрупп, их блокируют формальдегидом, а свободные карбоксильные группы оттитровывают щелочью:



Реактивы: солод, кварцевый песок, формольная смесь, фенолфталеин, 0,2 н. раствор NaOH, 0,2 н. раствор HCl.

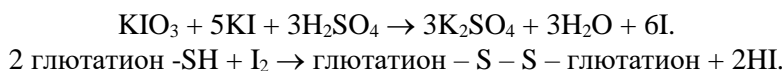
Ход работы. Для определения аминного азота 10 г солода измельчают в ступке, содержащей 5...10 мл дистиллированной воды и кварцевый песок. Содержимое ступки и воду количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, перемешивают, фильтруют на складчатом фильтре либо центрифугируют и измеряют количество аминного азота в фильтрате или в фугате.

Берут 20 мл фильтрата и добавляют 10 мл формольной смеси. Затем добавляют 3 капли 1%-ного раствора фенолфталеина и титруют 0,2 н. раствором NaOH из бюретки до появления яркой окраски. Избыток щелочи титруют 0,2 н. раствором HCl. Одновременно проведите контрольное титрование с 20 мл дистиллированной воды.

Работа 27. Определение глутатиона

Глутатион – это трипептид, состоящий из остатков гликокола, цистеина и глутаминовой кислоты. Он встречается в клетках живых организмов как свободное соединение. Особенно большое количество его содержится в мышечной ткани, зародыше пшеничного зерна, дрожжах, плесневых грибах. Он является переносчиком водорода в окислительно-восстановительных реакциях. Восстановленная форма глутатиона повышает активность некоторых ферментов, в частности протеолитических, которые расщепляют белок.

Принцип метода определения глутатиона заключается в окислении глутатиона йодом. Для получения устойчивых растворов йода применяют йодноватистокалиевый калий. Титрование ведут в присутствии йодистого калия в кислой среде. Реакции идут следующим образом:



Реактивы: дрожжи, кварцевый песок, 1 н. раствор сульфосалициловой кислоты, 4%-ный раствор сульфосалициловой кислоты, 5%-ный раствор йодистого калия, раствор крахмала, 0,001 н. раствор KIO₃.

Ход работы. Измельчите образец дрожжей (10 г) в ступке с хорошо промытым кварцевым песком. Перенесите гомогенат в мерную колбу на 100 мл и экстрагируйте удвоенным объемом воды при встряхивании в течение 10 мин. Затем медленно при постоянном перемешивании добавьте 5 мл 1 н. раствора сульфосалициловой кислоты и доведите содержимое колбы до отмеченной линии дистиллированной водой. Энергично встряхните смесь и отфильтруйте через сухой беззольный фильтр или центрифугу. Отберите 10 мл фильтрата или субстрата в коническую колбу емкостью 50 мл, добавьте 2,5 мл 4%-ного раствора сульфосалициловой кислоты и 2,5 мл 5%-ного раствора йодистого калия. Йодистый калий готовят ежедневно и проверяют на отсутствие свободного йода (качественная реакция с крахмалом). К анализируемой пробе прибавляют 10 капель раствора крахмала и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором KIO₃ до появления устойчивой синей окраски. Раствор титруют при 20 °С, для чего погружают колбочку в стакан с водой, температура которой должна быть 19...20 °С. Рекомендуется под стакан положить лист белой бумаги. В качестве контроля титруют 10 мл дистиллированной воды в условиях, идентичных с опытом.

Для определения окисленного глутатиона 10 мл фугата помещают в колбу, добавляют 30 мг цинковой пыли и ставят на 30 мин в кипящую водяную баню, пока вся пыль не перейдет в раствор. При этом весь глутатион переходит в восстановленную форму. Раствор фильтруют через бумажный фильтр.

Протокол исследований

Количество аминного азота (A , %) рассчитывают по формуле

$$A = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 2,8 \cdot a \cdot 100}{b \cdot m \cdot 1000}, \quad (3.1)$$

где V_1 и V_2 – объем раствора щелочи, пошедшего на титрование опыта и контроля, мл³; 2,8 – масса аминного азота (мг), соответствующая 1 мл³ 0,2 н. раствора NaOH; a – общий объем вытяжки, мл³; b – объем вытяжки, взятой на титрование, мл³; m – навеска исследуемого продукта, г.

Расчет восстановленного и общего количества глутатиона производят по формуле

$$X_1 = (V_1 - V_2) \cdot 0,307 \cdot 100, \quad (3.2)$$

где X_1 – массовая доля восстановленного глутатиона в исследуемом продукте, мг %; V_1 , V_2 – объем раствора КЮ₃, израсходованный на титрование опыта и контроля, мл³; 0,307 – количество восстановленного глутатиона, соответствующее 1 мл³ 0,001 н. раствора КЮ₃.

$$X_2 = (V_1 - V_2) \cdot 0,307 \cdot 100. \quad (3.3)$$

В охлажденном фильтрате определяют суммарное содержание глутатиона по описанной выше методике:

Из полученного общего количества глутатиона вычитают восстановленный и по разности определяют окисленный глутатион:

$$X_3 = (X_2 - X_1). \quad (3.4)$$

Контрольные вопросы и ситуационные задачи:

Задача № 1. Мужчина был срочно доставлен в больницу скорой помощи после того, как случайно выпил водный раствор медного купороса. Врач рекомендовал ему принять яичный белок. *Обоснуйте врачебное назначение.*

1. Что такое изоэлектрическая точка белка и как ее определить?
2. Что такое гликопротеиды, и какие существуют качественные реакции на их углеводную группу?
3. В чем заключается разница между осаждением белка и денатурацией?
4. Какие физические методы используются для определения содержания белка?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисциплина «Основы молекулярной биологии» является базовой дисциплиной по направлению 19.03.01 «Биотехнология» и входит в цикл естественно-научных дисциплин. Настоящий лабораторный практикум предназначен для применения на лабораторных работах дисциплины «Основы молекулярной биологии». На лабораторных занятиях студенты формируют навыки работы с химическими реагентами, проведения качественных реакций на основные макромолекулы, в определении массовой доли сахаров в пищевых продуктах, по проведению качественного анализа веществ на присутствие различных групп липидов, а также освоения методов количественного определения аминокислот и пептидов.

Выполнение лабораторных заданий поможет закрепить и конкретизировать знания по основам биохимии и молекулярной биологии, а также правильно применять научные знания, экспериментировать, наблюдать за проявлением общих закономерностей.

Авторы надеются, что студентам будет интересно на занятиях, а это позволит повысить мотивацию к профессиональной деятельности.

Умения и навыки, которые будут получены на занятиях дисциплины «Основы молекулярной биологии», пригодятся при изучении специальных дисциплин направления 19.03.01 «Биотехнология», а также при проведении научных исследований, выполнении выпускной квалификационной работы и в профессиональной деятельности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Принципы** и методы биохимии и молекулярной биологии / Э. Эйткен, А. Р. Бейдоун, Дж. Файфф и др. ; под ред. К. Уилсон, Дж. Уолкер ; пер. Т. П. Мосолова, Е. Ю. Бозелек-Решетняк. – 3-е изд. – М. : Лаборатория знаний, 2020. – 853 с.
2. **Эллиот, В.** Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. – М. : Изд-во НИИ биомедицинской химии РАМН, 2000. – 372 с.
3. **Биологическая** химия с упражнениями и задачами : учебник / под ред. чл.-корр. РАМН С. Е. Северина. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 624 с.

Учебное электронное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Методические указания

Составители:

УСТИНСКАЯ Яна Витальевна
ЕСЬКОВА Мария Александровна

Редактор Л. В. Комбарова
Графический и мультимедийный дизайнер Т. Ю. Зотова
Обложка, упаковка, тиражирование Л. В. Комбаровой

Подписано к использованию 03.07.2023.

Тираж 50 шт. Заказ № 76

Издательский центр ФГБОУ ВО «ТГТУ»
392000, г. Тамбов, ул. Советская, д. 106, к. 14.
Тел./факс (4752) 63-81-08.
E-mail: izdatelstvo@tstu.ru