***На правах рукописи***

Минобрнауки Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

**«Оренбургский государственный университет»**

Кафедра биологии и почвоведения

Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины

*«Б1.Д.Б.23 Биохимия и молекулярная биология»*

Уровень высшего образования

БАКАЛАВРИАТ

Направление подготовки

*06.03.01 Биология*

(код и наименование направления подготовки)

*Биоэкология*

(наименование направленности (профиля) образовательной программы)

Тип образовательной программы

*Программа академического бакалавриата*

Квалификация

*Бакалавр*

Форма обучения

*Очная*

Составители \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Шамраев А.В., Сизова Е.А.

Методические указания рассмотрены и одобрены на заседании кафедры биологии и почвоведения

Заведующий кафедрой \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Галактионова Л.В.

Методические указания является приложением к рабочей программе по дисциплине Химические процессы в молекулярной биологии, зарегистрированной в ЦИТ под учетным номером\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

|  |
| --- |
|  |
|  |

**Структура дисциплины**

Общая трудоемкость дисциплины составляет 3 зачетные единицы (108 академических часов).

| Вид работы | Трудоемкость,  академических часов | |
| --- | --- | --- |
| 4 семестр | всего |
| **Общая трудоёмкость** | **108** | **108** |
| **Контактная работа:** | **50,25** | **50,25** |
| Лекции (Л) | 18 | 18 |
| Практические занятия (ПЗ) | 16 | 16 |
| Лабораторные работы (ЛР) | 16 | 16 |
| Промежуточная аттестация (зачет, экзамен) | 0,25 | 0,25 |
| **Самостоятельная работа:** | **57,75** | **57,75** |
|  |  |  |
| **Вид итогового контроля (зачет, экзамен, дифференцированный зачет)** | **диф. зач.** |  |

Разделы дисциплины, изучаемые в 4 семестре

| № раздела | Наименование разделов | Количество часов | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| всего | аудиторная  работа | | | внеауд. работа |
| Л | ПЗ | ЛР |
| 1 | История становления науки. Белки и нуклеиновые кислоты. Методы молекулярной биологии. | 16 | 2 | 2 | 2 | 10 |
| 2 | Белковые вещества и ферменты | 20 | 4 | 2 | 2 | 12 |
| 3 | Витамины и гормоны | 24 | 4 | 4 | 4 | 12 |
| 4 | Сахара и Углеводный обмен | 24 | 4 | 4 | 4 | 12 |
| 5 | Липиды | 24 | 4 | 4 | 4 | 12 |
|  | Итого: | 108 | 18 | 16 | 16 | 58 |
|  | Всего: | 108 | 18 | 16 | 16 | 58 |

**Содержание разделов дисциплины**

**Раздел 1 История становления науки. Белки и нуклеиновые кислоты. Методы молекулярной биологии.**

Принципы клеточной организации биологических объектов. Молекулярная биология, ее характеристика как науки. Задачи молекулярной биологии в познании основных закономерностей жизнедеятельности. Современные направления молекулярной биологии: геномика, протеомика, энзимология и т.д. Биофизические и биохимические основы, мембранных процессов и молекулярных механизмов жизнедеятельности.

Белки и нуклеиновые кислоты. Общее понятие о функции белков и нуклеиновых кислот. Их принципиальное функциональное различие. Общая структурная характеристика белков и нуклеиновых кислот как биополимеров. Понятие о первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурах биополимеров.

Методы молекулярной биологии: рентгеноструктурный анализ, электронная микроскопия, генно-инженерные методы, молекулярное клонирование. Методы выделения белков. Методы выделения нуклеиновых. Методика микроскопического изучения объектов. Методы изучения основных биофизических, биохимических, мембранных и молекулярных процессов жизнедеятельности клеток. Методы использования конкретных данных о строении и химическом составе клеточных структур для характеристики обменных процессов и функционального состояния клеток и тканей.

**№ 2 Белковые вещества и ферменты**Аминокислоты – классификация, свойства; пептиды, биологическая роль. Виды связей, стабилизирующих белковую молекулу. Строение белка, иерархия различных уровней, характеристика отдельных структур. Свойства белков. Зависимость скорости ферментативных процессов в клетке от различных факторов. Специфичность ферментов. Локализация ферментов в клетке. Классификация и номенклатура ферментов. Характеристика отдельных классов. Инженерная энзимология. Иммобилизованные ферменты. Биологическое значение ферментов. Применение ферментов и их ингибиторов в медицине и промышленности.

**№ 3 Витамины и гормоны** Витамины. Их классификация. Водорастворимые витамины, особенности структуры витаминов. Распространение в природе, биологическая роль. Жирорастворимые витамины. Распространение в природе. Биологическая роль. Иерархия гормонов. Механизм действия стероидных и пептидных гормонов. Характеристика отдельных гормонов.

**№ 4 Сахара** Классификация, номенклатура. Моносахариды. Генетический ряд моносахаридов, изомерия моносахаридов. Химические свойства простых сахаров. Реакции окисления и восстановления. Полиолы, аминосахара, дезоксисахара, гликозиды. Дисахариды, их биологическая роль. Полисахариды. Особенности строения отдельных представителей. Полисахариды микроорганизмов. Биологическая роль углеводов и их роль в организации живой материи.

**Углеводный обмен** Анаэробный распад углеводов. Кофакторы пируватдегидрогеназы и их роль. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы. Энергетика и биологическая роль интермедиатов пентозного цикла. Цикл трикарбоновых кислот его регуляция и значение. Глюконеогенез, его значение. Глиоксилатный цикл. Фотосинтез – общая харктеристика, хлорофиллы, механизмы световой и темновой стадий. С4 – путь фотосинтеза.

**№ 5 Липиды** Биологическая роль липидов. Классификация липидов. Жиры, их строение, свойства. Жирнокислотный состав липидов. Качественные показатели жиров. Фосфолипиды, строение, свойства, участие в построении биологических мембран. Сфинголипиды. Цереброзиды. Воски. Циклические липиды.

**Обмен липидов** Переваривание и всасывание липидов в желудочно-кишечном тракте. Роль коэнзима А, карнитина и ацилпереносящего белка. Обмен сложных липидов. Синтез и распад триглицеридов.

**4.3 Лабораторные работы**

| № ЛР | № раздела | Наименование лабораторных работ | Кол-во часов |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | 1 | Выделение нуклеиновых кислот из клеток печени. Качественная реакция на ДНК. | 2 |
| 2 | 2 | Реакция осаждения белков при нагревании. Осаждение белков органическими растворителями | 2 |
| 3-4 | 3 | Количественное определение аскорбиновой кислоты в продуктах. Качественная на адреналин с хлорным желнзом | 4 |
| 5-6 | 4 | Гидролиз крахмала А амилазой слюны. Специфичность А амилазы слюны и сахарозы дрожжей | 4 |
| 7-8 | 5 | Открытие непредельных жирных кислот в жире. Эмульгирование жиров | 4 |
|  |  | Итого: | 16 |

**4.4 Практические занятия (семинары)**

| № занятия | № раздела | Тема | Кол-во часов |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | 1 | История становления науки. Современные направления молекулярной биологии. Белки и нуклеиновые кислоты как объект молекулярной биологии | 2 |
| 2 | 2 | Классификация белков, характеристика отдельных классов. Методы выделения белков. Ферменты. Особенности строения простых и сложных ферментов. Кофакторы ферментов. Роль витаминов и металлов. Активный и аллостерический центры. Энергия активации и энергетический барьер ферментативных и неферментативных реакций. Теория ферментативного катализа. Кинетика ферментативных реакций. Уравнение Михаэлиса-Ментен, вывод, анализ. | 2 |
| 3-4 | 3 | Авитаминозы и их лечение. Суточная потребность человека в различных витаминах. Содержание витаминов в продуктах питания. Химическая природа и физиологическая роль гормонов. Эндокринные железы и гормоны, вырабатываемые в них. | 4 |
| 5-6 | 4 | Гликолиз и гликогенолиз. Пути их регуляции. Энергетика анаэробного пути распада углеводов. Брожение – виды, энергетика брожения. Связь процессов гликолиза и брожения. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты. | 4 |
| 7-8 | 5 | Окисление жирных кислот (β-окисление). Энергетика β -окисления жирных кислот. Синтез жирных кислот. | 4 |
|  |  | Итого: | 16 |

**Лабораторные работы**

# 1 Выделение нуклеиновых кислот из клеток печени. Качественная реакции на ДНК.

**Цель:** доказать, что в большом количестве нуклеиновые кислоты содержатся в виде соединений с белками (дезоксинуклеопротеид - ДНП) в тканях богатых ядрами (печень, селезенка, зобная железа).

**Оборудование:** штатив, пробирки, ступка с пестиком, стеклянный порошок, пипетка, кристаллизатор, мерные цилиндры на 50 и 300 мл, пипетки вместимостью 1 мл. Деревянные палочки с насечками, водяная баня, марля для фильтрования, хлорид натрия, 5 % раствор, содержащий 0,04 % трехзамещенного нитрата натрия, 0,4 % раствор гидроксида натрия, дифениламиновый реактив (1 г дифениламина растворить в 100 мл ледяной уксусной кислоты, к раствору добавить 2,75 мл концентрированной серной кислоты). Печень свежая или мороженая, РНК дрожжевая, свежеприготовленный 0,1% раствор.

**Ход работы:**

**1) выделение дезоксинуклеопротеида (ДНП) из ткани печени.** Метод основан на способности ДНП растворяться в солевых растворах большой ионной силы и выпадать в осадок при снижении их концентрации. 2 - 3 г ткани печени тщательно разотрите в ступке со стеклянным порошком, постепенно небольшими порциями приливая 35 - 40 мл раствора хлорида натрия. Полученный вязкий раствор профильтруйте через два слоя марли и малый кристаллизатор. Цилиндром отмерьте шестикратный (по отношению к фильтру) объем дистиллированной воды и медленно вылейте ее в фильтрат. Образовавшиеся нити ДНП осторожно намотайте на деревянную палочку, перенесите в пробирку для использования в последующей работе;

**2) качественная реакция на ДНК.** Метод основан на способности дизоксирибозы, входящей в ДНК дезоксинуклеопротеида, образовать соединение синего цвета с дифениламином при нагревании в среде, содержащей смесь ледяной уксусной и концентрированной серной кислот. С рибозой РНК аналогичная реакция дает зеленое окрашивание.

К ¼части осадка ДНП перелейте 1 мл 0,4 % растворагидроксида натрия (до растворения). Добавьте 0,5 мл дифениламинового реактива. Содержимое пробирки перемешайте и поставьте на кипящую водяную баню (15-20 минут). Аналогичную реакцию выполните в другой пробирке с 1 мл раствора РНК.

Сравните окрашивание в пробах, результат наблюдения запишите.

# 2 Выделение нуклеиновых кислот из растительных клеток. Качественная реакция на ДНК.

**Цель:** углубить знания о ДНК и её роли в организме, выделить ДНК из тканей растения.

**Оборудование:** банан (яблоко), физиологический раствор, медицинский спирт, дистиллированная вода, моющее средство, пробирки, воронка, ступка с пестиком, стеклянная палочка, фильтровальная бумага

**Ход работы:**

1. Небольшой кусочек банана (2-3 см длиной) необходимо растолочь до мягкой консистенции с помощью вилки, ложки, керамического пестика или других подручных средств. На такой объем материала нужно добавить две-три столовые ложки раствора соли (физ.раствора).

Если вы используете не банан, а, например, яблоко, то для его обработки надо добавить немного песочка. Яблоко надо мелко нарезать и лучше растирать его именно в ступке пестиком. Ткань яблока жестче, чем у банана и добывать из него ДНК сложнее.

2. В равномерно растертую массу надо добавить моющее средство. Его задача – растворить мембраны клеток и ядер, внутри которых и содержится ДНК. Эти мембраны построены из жиров, поэтому моющее средство эти жиры прекрасно разбивает на мелкие капли, а ДНК взаимодействует с солевым раствором и оказывается в воде.

3. Фильтровальную бумагу надо вставить в воронку и смочить водой. Потом налить в воронку получившуюся смесь и ждать пока раствор отфильтруется. Банановое пюре останется в воронке и его можно будет выкинуть.

4. Фильтрат лучше сразу собирать в пробирку. Это должна быть прозрачная жидкость. Если нет фильтровальной бумаги и вы фильтруете через несколько слоев марли или бинта, то жидкость будет мутной. Для дальнейшей работы вполне хватит слоя фильтрата высотой 1 см от дна пробирки. После окончания сбора фильтрата в него желательно добавить равное по объему количество дистиллированной воды.

5. Самый сложный этап. В пробирку надо долить холодный спирт в объеме примерно в 2 раза больше, чем там находится смеси. Но доливать надо осторожно, тонкой струйкой по стеночке пробирки. Тогда спирт соберется в отдельный слой над поверхностью воды. А ДНК в спирте не растворяется и образует в его нижнем слое колечко или путанную смесь из своих отдельных нитей. На фотографии в пробирке можно увидеть достаточно мутный слой из спутанных нитей. Он такой мутный потому, что для выделения использовался самый примитивный вариант процесса — без фильтровальной бумаги. Но нити ДНК все равно выделились, хотя и видны хуже из-за мути.

6. Эти нити ДНК можно подцепить стеклянной (или пластмассовой) палочкой или другим подходящим инструментом и вытащить из пробирки.

7. Работа сделана и можно любоваться на ДНК невооруженным глазом или рассмотреть её с помощью лупы. Если появится желание сохранить результаты эксперимента, то можно использовать флакончик из-под какого-нибудь лекарства, который герметично закрывается. ДНК надо хранить в спирте.

# 3 Электрофорез

**Цель:** ознакомление с электрическими свойствами дисперсных систем; исследование электрофореза в золе гидроксида железа. Определить линейную скорость перемещения границы раздела фаз, рассчитать электрофоретическую подвижность и электрокинети- чсский потенциал.

**Оборудование:** прибор для измерения электрофоретической скорости методом подвижной границы, источник постоянного тока (выпрямитель) с вольтметром, гибкая проволока, линейка, часы, наждачная бумага, электроплита, коническая колба для приготовления золя на 500 мл, химические стаканчики, пипетка на 15 мл - 1 шт.; цилиндр на 100 мл. Реактивы: FeCl3 - 4%; NaCl - 0,1М; FeS04 - 0,1Мэ; КСl или НС1 - 0,01М; дистиллированная вода.

**Ход работы:**

1. Приготовить золь гидроксида железа методом гидролиза. Для этого в конической колбе нагреть до кипения 85 мл дистиллированной воды и прилить в кипящую воду но каплям 15 мл раствора хлорного железа. После кипячения (1-2 минуты) образуется золь гидроксида железа.

В условиях большого разведения и при кипячении осадок не выпадает, а образуется золь Fe(OH)3 красно-коричневого цвета. Его прозрачность указывает на высокую степень дисперсности системы. После приготовления золь необходимо охладить в струе проточной воды.

2. Тщательно промыть U-образную трубку электрофоретической установки дистиллированной водой и заполнить ее примерно наполовину раствором хлористого калия (или соляной кислоты), выполняющим функцию боковой жидкости.

3. Электроды зачистить до блестящей металлической поверхности наждачной бумагой и тщательно прополоскать дистиллированной водой. Расположить пробки, в которые вмонтированы электроды, сверху над отверстиями гак, чтобы электроды оказались внутри, но плотно отверстия не закрывать.

4. Заполнить свежеприготовленным золем боковую (вспомогательную) трубку электрофоретической установки так, чтобы золь был виден в просвете, расположенном под U-образной трубкой.

5. После этого медленно и осторожно открыть кран вспомогательного сосуда, чтобы золь начал перемещаться в U-образиую трубку снизу. При этом раствор боковой жидкости за счет вытеснения будет подниматься наверх. Чтобы в обоих коленах сосуда подъем шел с одинаковой скоростью, пробки с электродами не должны плотно закрывать отверстия, тогда граница золь - боковая жидкость получится четкой.

6. После того, как раствор боковой жидкости поднялся наверх тка, что погруженными в него на 3-5 мм оказались оба электрода, кран подачи золя перекрыть, пробками с вмонтированными электродами плотно закрыть отверстия U-образного сосуда. Отметить исходное положение границы раздела золь - боковая жидкость в правом и левом коленах по шкале линейки.

7. Включить в сеть источник постоянного тока тумблером «Вкл.» на панели прибора и отрегулировать напряжение по вольтметру на 110-30В. После этого сразу же включить секундомер. Величина напряжения во время опыта должна оставаться постоянной.

8. По истечении времени электрофореза (10-15 минут) выключить секундомер и отметить конечный уровень золя в обоих коленах (в одном колене граница раздела поднимается, в другом - опускается). Результаты занести в таблица 1.

9. Визуально определить знак заряда коллоидных частиц, исходя из того, что частицы перемещаются в сторону электрода с противоположным знаком.

10. После отключения установки измерить расстояние между электродами с помощью гибкой проволоки, прикладывая ее к внешней стороне U-образной трубки. Аккуратно сливая золь из U-образного сосуда, измерить цилиндром его объем.

11. Для изучения влияния концентрации и заряда противоионов использовать растворы йодида натрия и сульфата железа (по заданию преподавателя). Растворы нужной концентрации готовить с помощью цилиндра, разведения 1:1, 1:2, 1:4 и 1:8 проводить в отдельных чистых стаканах. Золь смешивать с электролитом в соотношении, заданном преподавателем, нужно заранее, в U-образный сосуд вливать уже готовую смесь. Перед каждым следующим опытом тщательно промыть дистиллированной водой U-образный сосуд, вспомогательный сосуд и электроды. Опыты проводить по аналогии с первым, соблюдая последовательность проведения.

Таблица 1 - Результаты эксперимента

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Условия опыта | Начальный уровень золя | | Конечный уровень золя | | Перемещение | |
| Левое колено | Правое колено | Левое колено | Правое колено | Левое коленоL1;мм | Правое колено L2, мм |
| Время электрофореза г, с |  |  |  |  |  |  |

Напряжение на электродах U, В; расстояние между электродами L, мм; добавленный электролит (формула и концентрация) по п. 11

12. При обработки экспериментальных результатов для каждого случая электрофореза вычислить перемещение золя в правом L2 и левом L1 коленах и определить путь S, пройденный частицами золя как среднеарифметическое перемещения границ в каждом колене: S=(L1+L2).

# 4 Выделение белков солями тяжелых металлов

**Цель:** доказать и отметить образование труднорастворимых солеобразных соединений белка.

**Оборудование:**две пробирки, 1-2 мл раствора белка, раствор медного купороса, раствор ацетата свинца.

**Ход работы:** данный опыт иллюстрирует применение белка как противоядия при отравлении солями тяжелых металлов.

В две пробирки налейте по 1 - 2 мл раствора белка и медленно, при встряхивании, по каплям добавьте в одну пробирку насыщенный раствор медного купороса, а в другую - раствор ацетата свинца. Отметьте образование труднорастворимых солеобразных соединений белка.

**Практические занятия (семинары)**

# 1 История становления науки. Современные направления молекулярной биологии. Белки и нуклеиновые кислоты как объект молекулярной биологии

* 1. **Цель занятия и задачи**

Дать определения молекулярной биологии, как науки, рассмотреть этапы ее становления, определить связь с другими науками. Охарактеризовать особенности строения белков и нуклеиновых кислот.

**1.2 Основные вопросы темы**

1 История развития науки.

2 Основополагающие открытия молекулярной биологии.

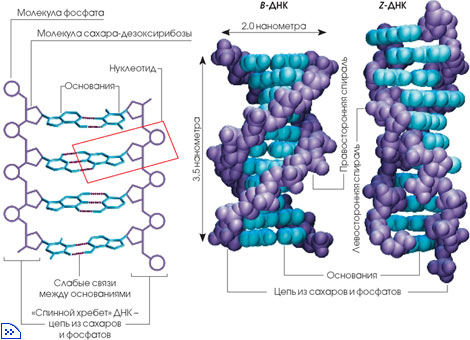
3 Аминокислоты как мономеры белков: строение, физико-химические свойства, классификация.

4 Характеристика белков: строение, функции, свойства, структурная организация белковой молекулы.

5 Строение нуклеиновых кислот. Модель ДНК Д.Уотсона и Ф.Крика.

* 1. **Практическая работа**
     1. Схема строения ДНК

Зарисуйте схему строения ДНК, выделите нуклеотид и обозначьте его составные части.



* + 1. Сравнительная характеристика ДНК и РНК

Сравните нуклеиновые кислоты по следующим признакам и заполните таблицу 1.

Таблица 1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Признаки | ДНК | РНК |
| Построение макромолекулы |  |  |
| Мономеры |  |  |
| Состав нуклеотида |  |  |
| Типы нуклеотидов |  |  |
| Свойства |  |  |
| Местонахождение в клетке |  |  |
| Функции |  |  |

* 1. **Контрольные вопросы для самопроверки**

1. Раскройте роль и место молекулярной биологии в системе естественных наук.
2. Что является предметом изучения молекулярной биологии?
3. Какие задачи молекулярной биологии вам известны?
4. Охарактеризуйте основные этапы становления молекулярной биологии как науки.
5. Какие доказательства генетической роли нуклеиновых кислот вам известны?
6. Что такое геномика?
7. Что такое протеомика?
8. Что изучает энзимология?
9. Почему аминокислоты являются мономерами белков?
10. От чего зависит молекулярная масса белков?
11. Какими факторами определяется форма белковых молекул?
12. Дайте характеристику высших уровней организации белковых молекул?
13. На каких принципах базируется классификация простых белков?
14. Какие группы простых белков вам известны?
15. Каково строение сложных белков?
16. Какие группы сложных белков вам известны?
17. Что такое нуклеопротеиды?
18. В чем заключаются важнейшие биологические функции нуклеотидов?
19. Какие функции в клетке выполняет ДНК?
20. Какие виды РНК в клетке вам известны?

# 

# 2 Методы молекулярной биологии

* 1. **Цель занятия и задачи**

Дать характеристику основным методам выделения и очистки белков и нуклеиновых кислот.

**2.2 Основные вопросы темы**

1 Микроскопия.

2 Рентгеноструктурный анализ.

3 Применение радиоактивных изотопов в молекулярной биологии.

4Ультрацентрифугирование.

5Методы фракционирования белков: хроматография, электрофорез и изоэлектрофокусирование.

6 Применение культур клеток и бесклеточных систем в молекулярной биологии.

* 1. **Практическая работа**
     1. Используя полученные знания, заполните таблицу 2.

Таблица 2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Факторы денатурации | Виды денатурации (об­ратимая, необратимая) | Изменения, про­изошедшие с бел­ками, степень раз­рушения структур белка. |
| 1 Нагревание до 40 °С |  |  |
| 2 Нагревание выше 50 °С |  |  |
| 3 Рентгеновское излу­чение |  |  |
| 4 Ультрафиолетовое из­лучение |  |  |
| 5 Концентрированные раст­воры кислот и щелочей |  |  |
| 6 Растворы солей легких металлов Nа, К, Са, Мg |  |  |
| 7 Растворы солей тяже­лых металлов Сu, Нg, Рb, Sn |  |  |
| 8 Органические раство­рители и детергенты |  |  |

* 1. **Контрольные вопросы для самопроверки**

1. Какие методы выделения белков вам известны?
2. Дайте характеристику основным этапам выделения белков.
3. На каких принципах основано фракционирование белков солевыми растворами?
4. В чем сущность электрофореза как метод выделения белков?
5. Какие виды хроматографии применимы для разделения белковых смесей?
6. Какие реакции осаждения белков вам известны?
7. Перечислите основные методы выделения нуклеиновых кислот.

# Репликативный синтез ДНК

**Цель занятия и задачи**

Изучить принципы передачи генетической информации от материнской клетки к дочерней.

**3.2 Основные вопросы темы**

1 Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК.

2.Инициация репликации

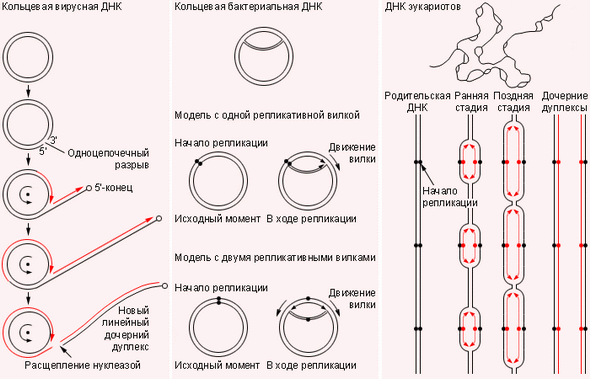
3 Элонгация репликации. Модель Артура Корнберга.

4 Терминация репликации

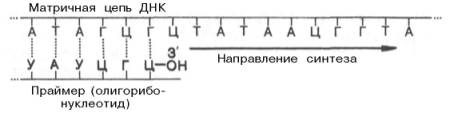
5 Регуляция репликации

**3.3 Практическая работа**

**3.3.1** Зарисуйте схему инициации репликации.

**

А Б В



Г

Инициация репликации ДНК.

Репликация инициируется в специфическом участке ДНК, называемом origin (ori).

А, Б - в замкнутых кольцевых дуплексах ДНК новосинтезируемые цепи соединяются в местах встречи увеличивающихся в размере репликативных вилок, или где единственная вилка возращается к точке начала репликации .

В – репликация хромосомной ДНК эукариот. Репликация идет в двух направлениях из разных точек начала репликации (ori), с образованием «пузырьков». Как видно из рисунка по мере движения репликативных вилок пузырьки увеличиваются в размере и в конце концов сливаются.

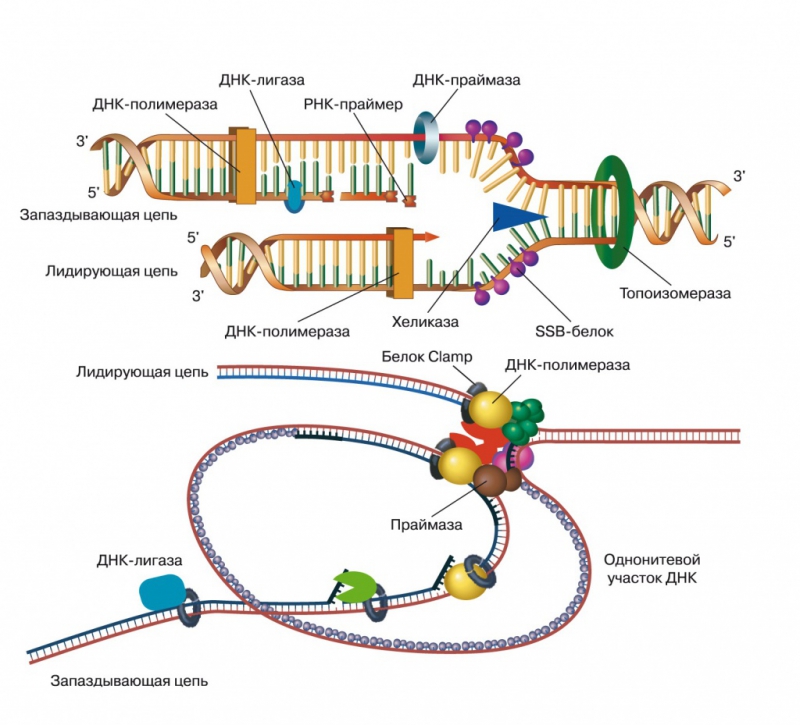
Г – с образованием коротких РНК-затравок (праймеров), комплементарных матричной ДНК.

**3.3.2** Дан фрагмент одной из цепей молекулы ДНК:-A-G-C-T-T-A-G-C-C-:

а) запишите, какую нуклеотидную последователь­ность имеет 2-я цепь ДНК;

б) укажите 3'- и 5'-концы в цепях ДНК.

**3.3.3** Зарисуйте схему репликативной вилки и обозначьте ферменты, участвующие в ее образовании.



**3.3.4** Решить задачу

**Пример1:**

Участок правой цепи молекулы ДНК имеет последовательность нуклеотидов:

А-Г-Т-Ц-Т-А-А-Ц-Т-Г-А-Г-Ц-А-Т. Запишите последовательность нуклеотидов левой цепи ДНК.

Дано: ДНК А-Г-Т-Ц-Т-А-А-Ц-Т-Г-А-Г-Ц-А-Т

Решение: ( нуклеотиды левой цепи ДНК подбираем по принципу комплементарности А-Т, Г-Ц)

ДНК А Г Т Ц Т А А Ц Т Г А Г Ц А Т

ДНК Т Ц А Г А Т Т Г А Ц Т Ц Г Т А

Ответ : левая цепь ДНК имеет последовательность нуклеотидов Т-Ц-А-Г-А-Т-Т-Г-А-Ц-Т-Ц-Г-Т-А

**Пример 2:**

Участок цепи молекулы ДНК имеет последовательность нуклеотидов: Ц-Т-А-А-Ц-Ц-А-Т-А-Г-Т-Т-Г-А-Г. Запишите последовательность нуклеотидов иРНК.

**Дано:** ДНК Ц-Т-А-А- Ц-Ц-А-Т-А-Г-Т-Т- Г- А- Г

**Решение:** ( нуклеотиды иРНК подбираем по принципу комплементарности к ДНК : А-У, Г-Ц)

ДНК Ц Т А А Ц Ц А Т А Г Т Т Г А Г

 иРНК Г А **У У** Г Г **У** А **У** Ц А А Ц **У** Ц

**Ответ :** иРНК имеет последовательность нуклеотидов Г-А-У-У-Г- Г-У-А-У-Ц-А-А-Ц-У-Ц

**Задача:**

Определите последовательность нуклеотидов иРНК, антикодоны молекул тРНК , если фрагмент ДНК имеет последовательность нуклеотидов

Г-Ц-Ц-Т-А-Ц-Т-А-А-Г-Т-Ц

**3.4 Контрольные вопросы для самопроверки**

1 Что такое репликация ДНК?

2 Каковы основные принципы репликации ДНК?

3 Какие механизмы репликации ДНК вам известны?

4 Какие опыты являются доказательствами полуконсервативного механизма репликации ДНК?

1. Дайте характеристику основным этапам репликации ДНК.

6 Какие белки способствуют осуществлению процесса репликации?

1. Какие ферменты участвуют в протекании репликации?
2. Что такое репликационная вилка?
3. Что такое ориджины?
4. Что такое фрагменты Оказаки?
5. Почему одна из цепей репликационной вилки называется лидирующей, а другая – запаздывающей?
6. В чем заключаются отличия в процесса репликации у эукариот

# 

# 4 Репарация ДНК

**Цель занятия и задачи**

Указать типы и процессы повреждения ДНК, изучить механизмы репарации

**4.2 Основные вопросы темы**

1 Типы и механизмы повреждения ДНК.

2 Типы репарации.

3 SOS-репарация.

4 Рекомбинантная (пострепликативная) репарация.

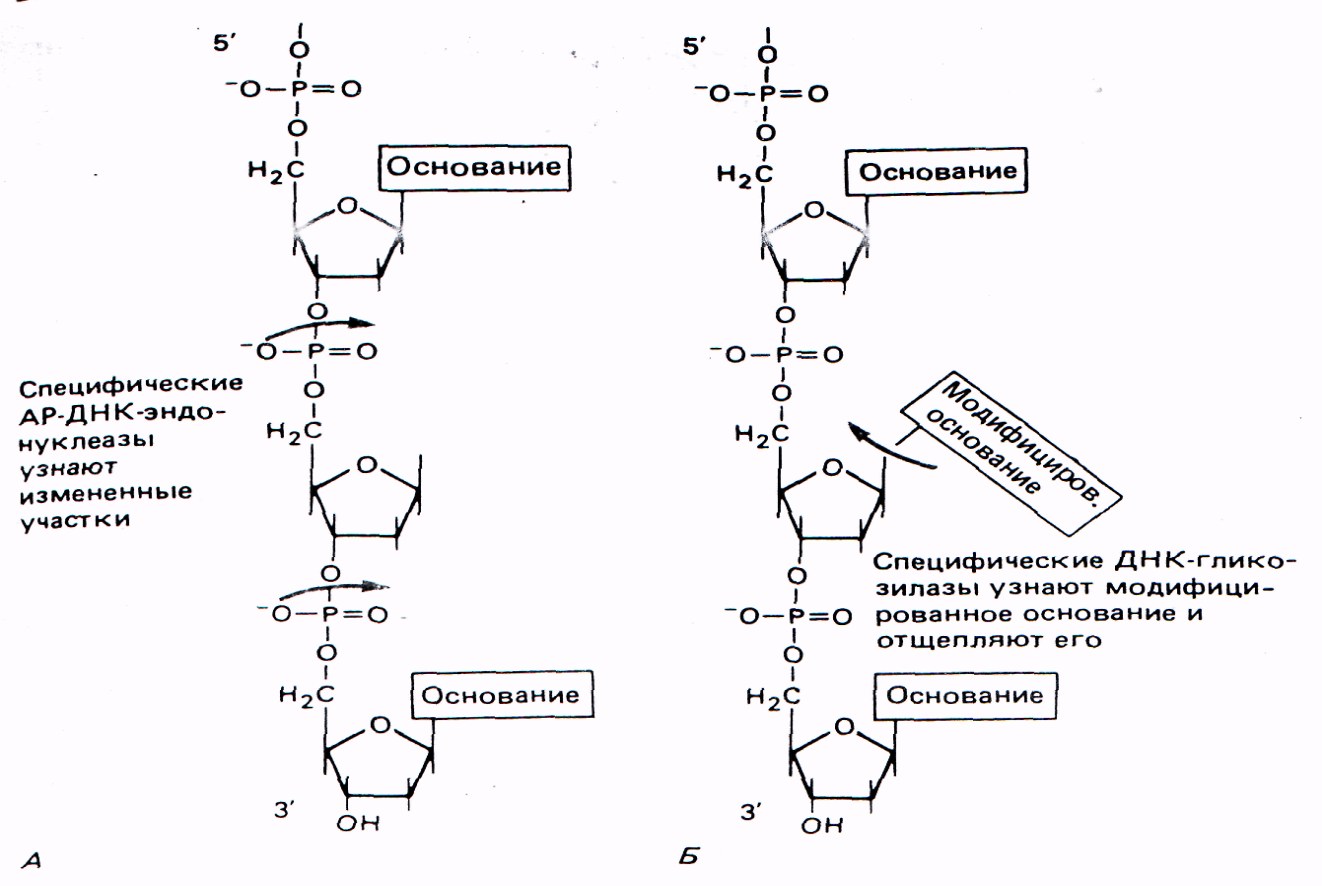
**4.3 Практическая работа**

**4.3.1** Заполните таблицу.

Таблица 3- Общие ферменты эксцизионной репарации.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| НАЗВАНИЕ | ФУНКЦИЯ | МЕХАНИЗМ |
| **ДНК-N-гликозилазы** |  |  |
| **АР-эндонуклеаза** |  |  |
| **экзонуклеаза** |  |  |

**4.3.2** Зарисуйте схему репарации N-алкилированных пуринов.



Репарация N-алкилированных пуринов и дру­гих модифицированных оснований.

*А.* АР-эндонуклеазы узнают сайты, где произо­шла апуринизация или апиримидинизация, и гидролизуют фосфодиэфирную связь либо с 3'-, либо с 5'-стороны от этого сайта.

*Б.* N-гликозилазы осуществляют репарацию, гидролизуя гликозидную связь между модифицированным основанием и дезоксирибозой.

**4.3.3** Заполните таблицу 4.

Таблица 4 - Гены, задействованные в SOS-репарации повреждений ДНК

|  |  |
| --- | --- |
| Гены | Последствия активации гена |
| uvrA, B, C, D |  |
| recA |  |
| recN, ruv |  |
| SSB |  |
| umuC, D |  |
| sulA |  |
| lexA |  |

**4.3.4** Решите задачу

**Пример:**

В одной молекуле ДНК нуклеотидов с тимином Т -22% . Определите процентное содержание нуклеотидов с А, Г, Ц по отдельности в этой молекуле ДНК.

Дано: Т -22%

Найти: % А, Г, Ц

Решение 1:

согласно правилу Чаргаффа А+Г = Т+Ц, все нуклеотиды в ДНК составляют 100%.

Так как тимин комплементарен аденину, то А=22%.

22+22=44% ( А+Т)

100- 44 =56% (Г+Ц)

Так как гуанин комплементарен цитозину, то их количество тоже равно, поэтому

56 : 2 =28% (Г, Ц)

Решение 2:

согласно правилу Чаргаффа А+Г = Т+Ц, все нуклеотиды в ДНК составляют 100% или А+Г и Т+Ц по 50 %

Так как тимин комплементарен аденину, то А=22%.

следовательно 50 - 22=28% (Г, Ц, т.к. они комплементарны)

Ответ : А=22%, Г=28%, Ц=28%

**Задача 1:**

Сколько содержится нуклеотидов А, Т, Г, во фрагменте молекулы ДНК, если в нем обнаружено 1500 нуклеотидов Ц, что составляет 30% от общего количества нуклеотидов в этом фрагменте ДНК?

**Задача 2:**

Участок молекулы ДНК ( одна цепочка) содержит:

150 нуклеотидов – А, 50 нуклеотидов – Т,

300 нуклеотидов – Ц, 100 нуклеотидов - Г.

Определите : количество нуклеотидов во второй цепи с А, Т, Г, Ц и общее количество нуклеотидов с А, Т, Ц, Г в двух цепях ДНК.

**Контрольные вопросы для самопроверки**

1. Что такое репарация генетический повреждений?
2. Какие виды «прямой» репарации вам известны?
3. В чем сущность процесса фотореактивации?
4. Объясните механизм репарации димеров тимина.
5. Каков механизм репарации однонитевых разрывов ДНК?
6. Как осуществляется репарация АП-сайтов за счет вставки пуринов?
7. Что такое инсертазы?
8. Что такое эксцизионная репарация?
9. Какие виды эксцизионной репарации вам известны?
10. Раскройте основной механизм эксцизионной репарации нуклеотидов?
11. Что такое мисмэтчи?
12. Как осуществляется репарация неспаренных нуклеотидов?
13. Что такое пострепликативная репарация?
14. Какова роль SOS-репарации?
15. Какие наследственные болезни могут быть вызваны дефектами репарационных систем?

# 

# 5 Биосинтез РНК (транскрипция). Регуляция транскрипции у эукариот и прокариот

**5.1 Цель занятия и задачи**

Изучить основные этапы транскрипции, рассмотреть принципы позитивной и негативной регуляции.

**5.2 Основные вопросы темы**

1Характеристика основных этапов транскрипции у прокариот

2Инициация транскрипции

3 Терминация транскрипции

4 Отличительные особенности транскрипции у эукариот.

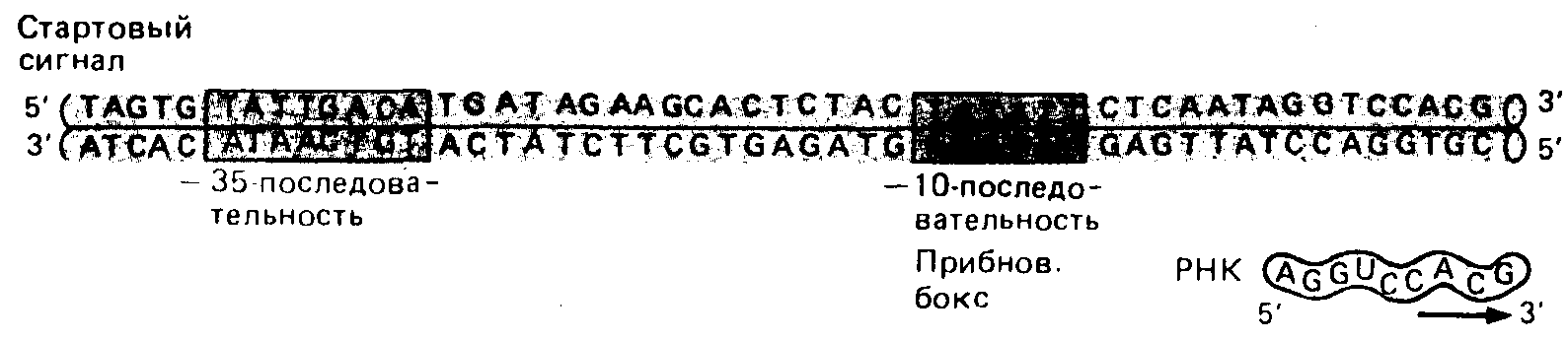
5 Механизмы регуляции транскрипции у прокариот.

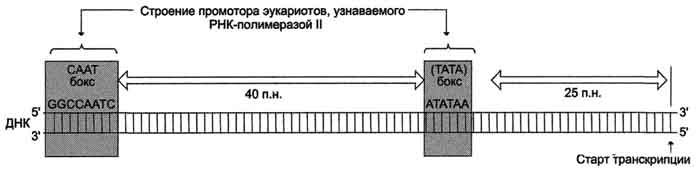
6 Принципы негативной и позитивной регуляции.

**5.3 Практическая работа**

**5.3.1** Зарисуйте схему промотора про- и эукариотов.

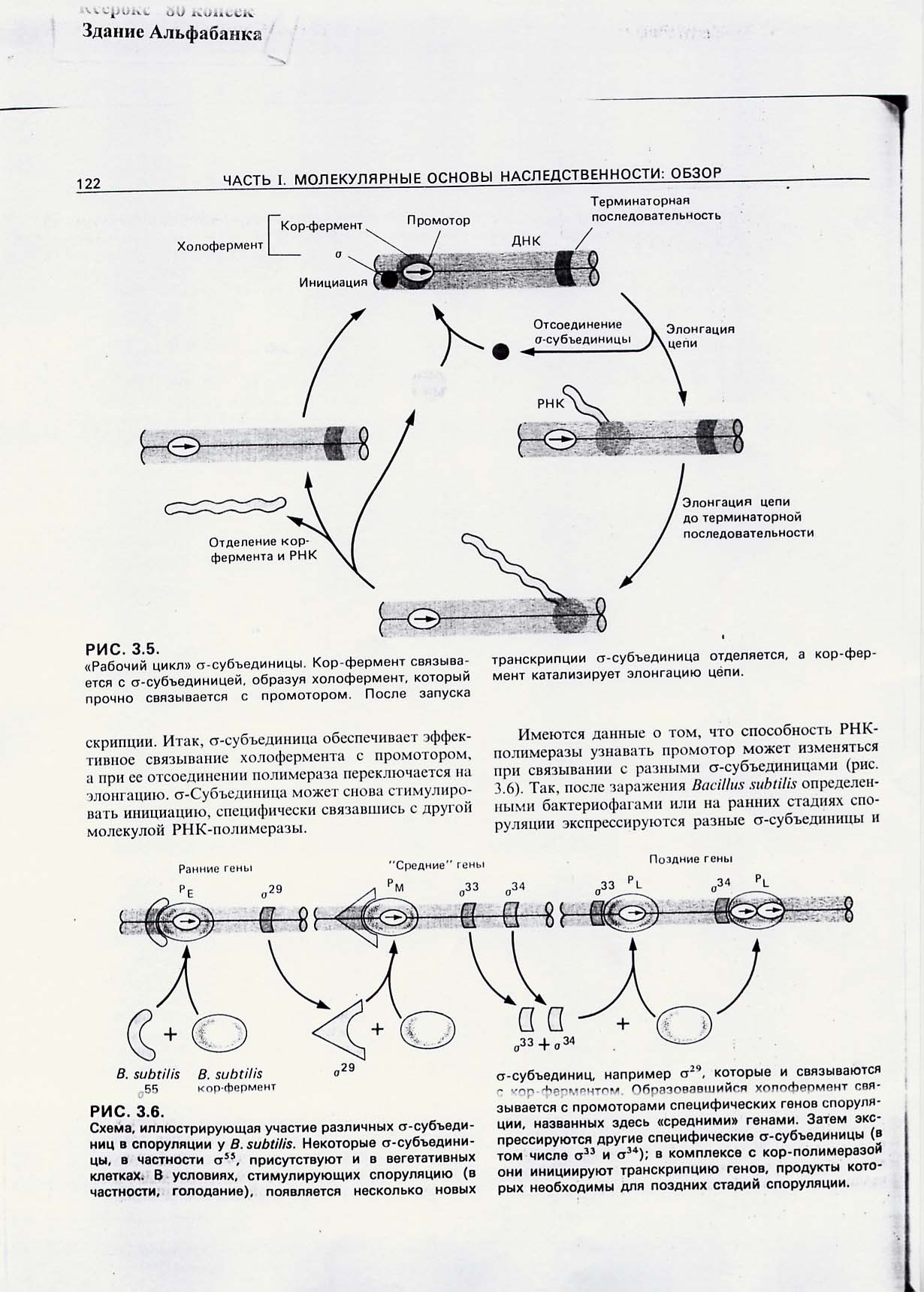
Строение промотора *E. Coli.*



**

* + 1. Зарисуйте«Рабочий цикл» σ-субъединицы.

«Рабочий цикл» σ-субъедини-цы. Кор-фермент связывается с σ -субъединицей, образуя холофермент, который прочно связывается с промотором. После запускатранскрипции σ –субъединица отделяется, а кор-фермент катализирует элонгацию цепи.



* + 1. Если нуклеотидный состав ДНК – АТТ-ГЦГ-ТАТ, то каким должен быть нуклеотидный состав и-РНК?

Используя полученные знания, заполните таблицу 5.

Таблица 5 - Субъединицы РНК – полимеразы *E. Coli*

|  |  |
| --- | --- |
| Субъеденицы | Функции |
| Альфа (α) |  |
| Бета (β) |  |
| Бета прим. (β') |  |
| Сигма (σ) |  |
| Омега (ω) |  |

**5.3.4** Решите задачу

**Пример:**

Участок молекулы ДНК состоит из 60 пар нуклеотидов. Определите длину этого участка (расстояние между нуклеотидами в ДНК составляет 0, 34 нм)

Дано: 60 пар нуклеотидов

Найти: длину участка

Решение: длина нуклеотида 0, 34 нм

60х0,34= 20,4 нм

Ответ: 20,4 нм

Длина участка молекулы ДНК составляет 510нм. Определите число пар нуклеотидов в этом участке.

Дано: длина участка ДНК 510нм

Найти: Определите число пар нуклеотидов

Решение: длина нуклеотида 0, 34 нм

510:0,34= 1500 нуклеотидов

Ответ: 1500 нуклеотидов

**Задача 1:**

Число нуклеотидов в цепи ДНК равно 100. Определите длину этого участка

**Задача 2:**

Число нуклеотидов в цепи и-РНК равно 100. Определите длину этого участка

**5.4 Контрольные вопросы для самопроверки**

1 Что такое транскрипция?

2 Какие принципы транскрипции вам известны?

3 Что такое оперон?

4 Опишите структурную организацию оперона.

5 Какова роль РНК-полимераз в биосинтезе белка?

6 Какие виды РНК-полимераз характерны для прокариот?

7 Раскройте основные моменты строения РНК-полимераз?

8 Каков механизм действия у данных ферментов?

9 Какие этапы можно выделить в процессе биосинтеза РНК?

10 Дайте характеристику основным этапам транскрипции у прокариот.

11 Что такое негативная индукция транскрипции? Каков ее механизм?

12 Что такое позитивная индукция? Каков ее механизм?

13 Что такое негативная репрессия? Каков ее механизм?

14 Что такое позитивная репрессия? Каков ее механизм?

15 Что такое аттенуация? Каков ее механизм?

16 В чем состоят особенности процесса транскрипции у эукариот?

# 6 Процессинг РНК

**6.1 Цель занятия и задачи**

Изучить процесс посттранскрипционной модификации первичных транскриптов (РНК-предшественников).

**6.2 Основные вопросы темы**

1 Процессинг у прокариот.

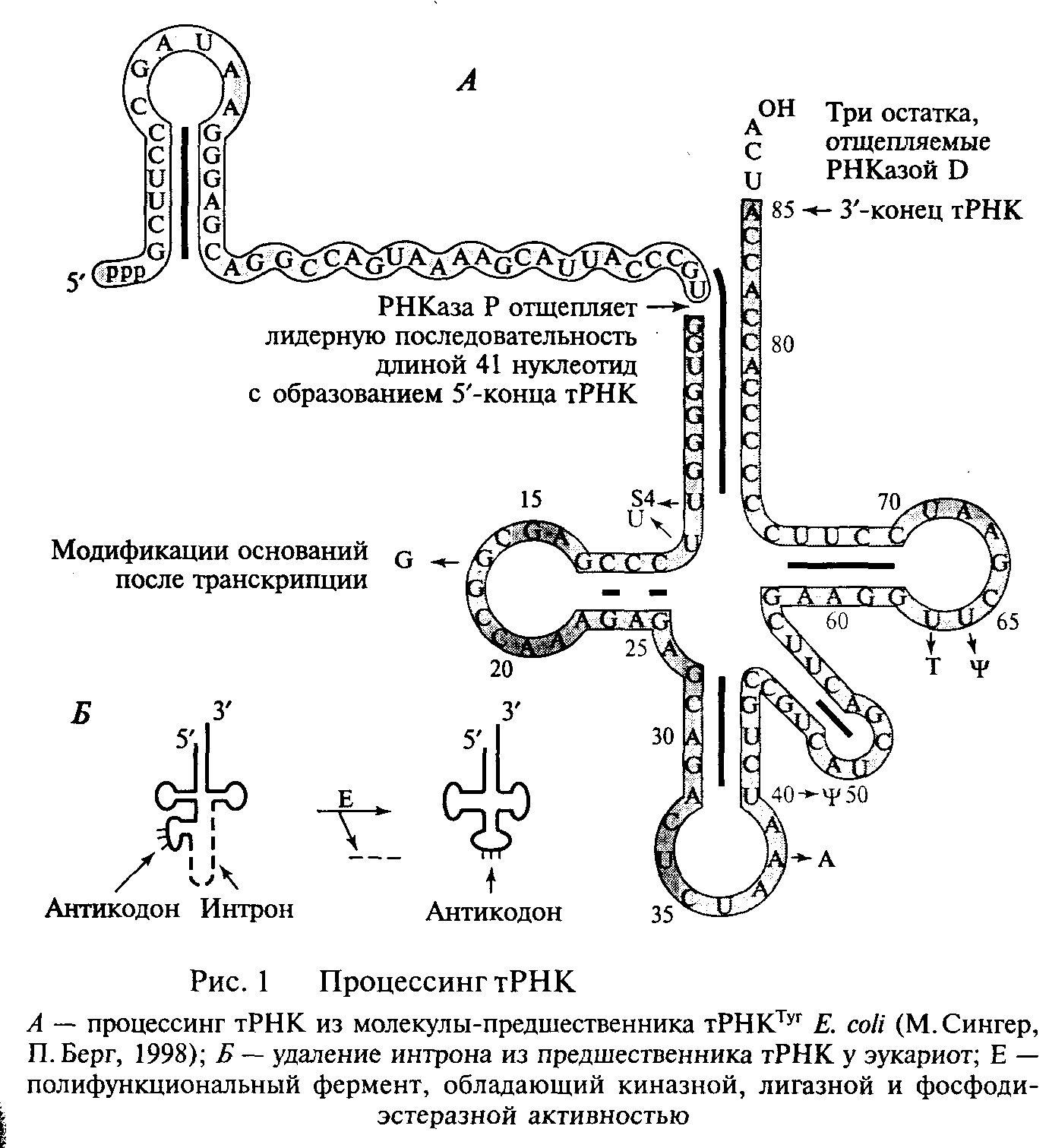
2 Процессинг т-РНК и р-РНК у эукариот.

3 Процессинг м-РНК у эукариот

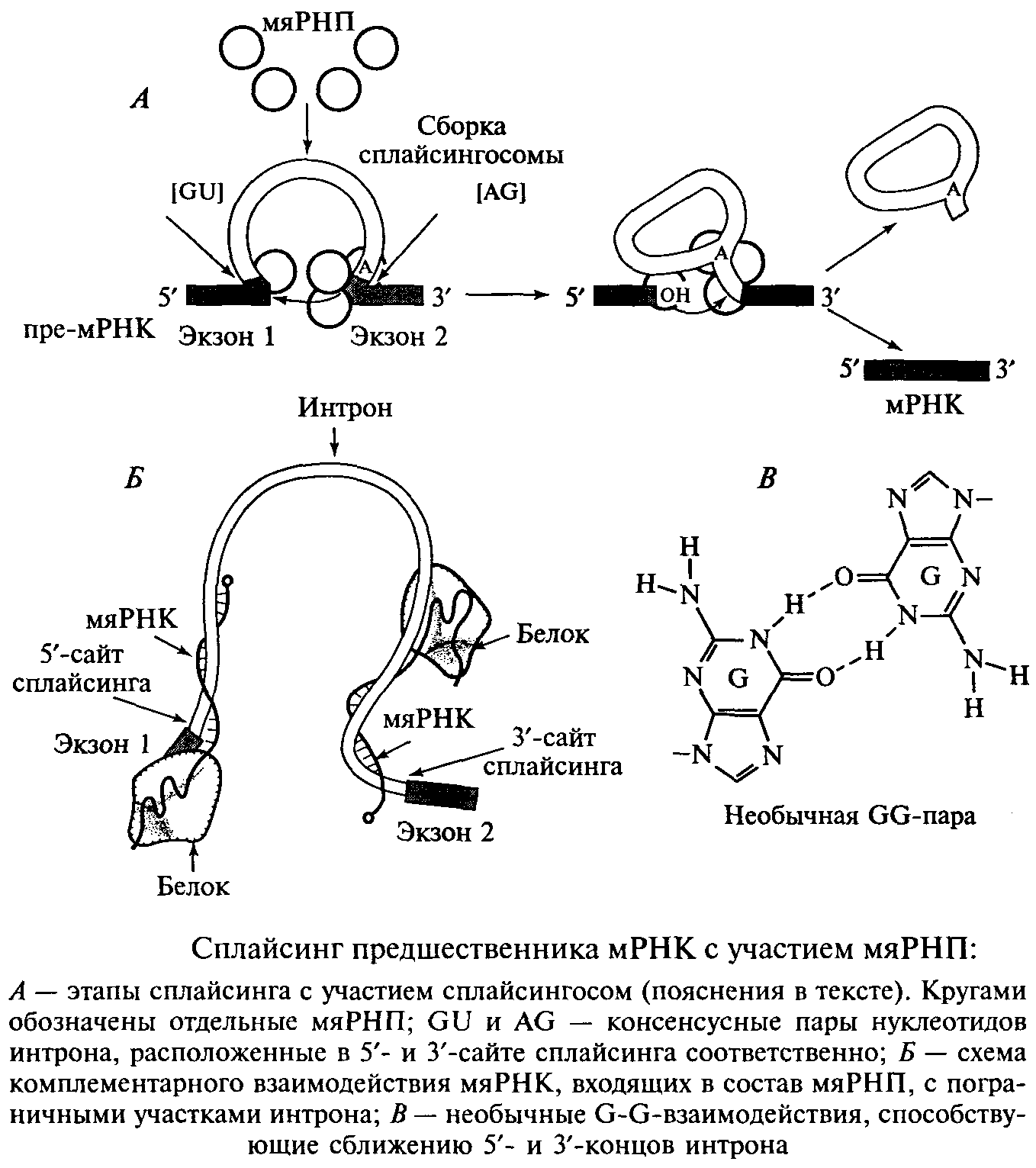
4 Альтернативный сплайсинг.

**6.3 Практическая работа**

**6.3.1** Зарисуйте схему процессинга молекулы тРНК из молекулы-предшественника тРНКTyr*E. Coli*, укажите ферменты, участвующие в этом процессе.



**6.3.1** Зарисуйте схему сплайсинга предшественников м-РНК с участием мя-РНП.



**6.3.2** Решите задачу

**Пример:**

Фрагмент цепи ДНК имеет последовательность нуклеотидов: ТГГАГТГАГТТА. Определите последовательность нуклеотидов на иРНК, антикодоны тРНК и аминокислотную последовательность фрагмента молекулы белка.

Дано: ДНК Т-Г-Г-А-Г-Т-Г-А-Г-Т-Т-А

Найти: иРНК, тРНК и аминокислотную последовательность белка

Решение: на участке ДНК по принципу комплементарности (А-У, Г-Ц) построим иРНК, затем по цепи иРНК построим тРНК по принципу комплементарности ( А-У, Г-Ц)

ДНК Т- Г- Г- А- Г- Т- Г- А- Г- Т- Т- А

иРНК А-Ц-Ц-У- Ц- А- Ц- У- Ц- А- А- У

тРНК У- Г- Г- А -Г- У- Г -А- Г- У- У-А

иРНК разделим на триплеты и по таблице генетического кода определим аминокислотную последовательность белка:

А-Ц-Ц тре, У-Ц-А сер, Ц-У-Ц лей, А- А-У асн.

Ответ : иРНК А-Ц- Ц-У- Ц- А-Ц-У-Ц-А- А-У

тРНК У- Г -Г- А- Г-У- Г-А-Г- У- У-А

аминокислотную последовательность белка :тре, сер, лей, асн

**Задача 1:**

Участок молекулы ДНК имеет следующее строение:

ГГА -АЦЦ-АТА-ГТЦ-ЦАА

Определите последовательность нуклеотидов соответствующего участка иРНК. Определите последовательность аминокислот в полипептиде, синтезируемом по иРНК. Как изме­нится последовательность аминокислот в полипептиде, если в результате мутации пятый нуклеотид в ДНК будет заменён на аденин? Ответ объясните.

**Задача 2:**

Известно, что все виды РНК синтезируются на ДНК- матрице. Фрагмент молекулы ДНК, на котором синтезируется участок центральной петли тРНК, имеет следующую последовательность нуклеотидов АТАГЦТГААЦГГАЦТ. Установите нуклеотидную последовательность участка тРНК, который синтезируется на данном фрагменте, и аминокислоту, которую будет переносить эта тРНК в процессе биосинтеза белка, если третий триплет соответствует антикодону тРНК.

**6.4 Контрольные вопросы для самопроверки**

1 Что такое процессинг клеточных РНК?

2 Какие этапы процессинга вам известны?

3 Что такое кепирование?

4 Какова биологическая роль кепа?

5 Что такое полиаденилировани?

6 Каков биологический смысл процесса полиаденилирования?

7 Что такое интроны?

8 Что такое экзоны?

9 Что такие сплайсинг?

10 Какие виды сплайсинга вам известны?

# 7 Биосинтез белка (трансляция). Регуляция трансляции у прокариот и эукариот

**7.1 Цель занятия и задачи**

Изучить этапы биосинтеза белка, особенности регуляции трансляции и эукариот и прокариот. Рассмотреть строение рибосом.

**7.2 Основные вопросы темы**

1 Факторы трансляции

2 Этапы трансляции.

3 Морфологическая и функциональная структура рибосом.

4 Регуляция трансляции.

5 Особенности трансляции у прокариот и эукариот

**7.3 Практическая работа**

**7.3.1**Зарисуйте строение рибосом. Укажите их типичный состав у прокариот и эукариот.

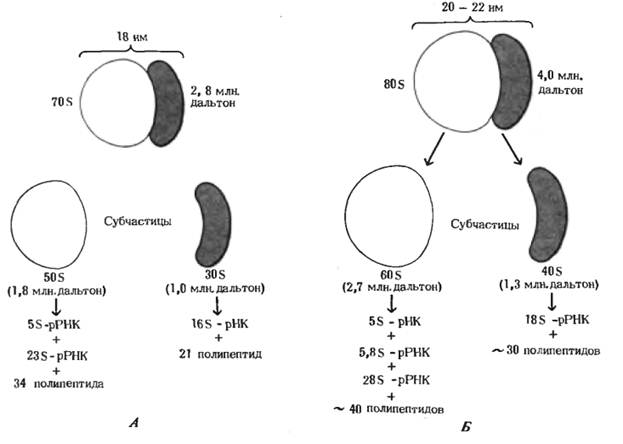


Рис. 1. Состав типичных рибосом про- и эукариот.

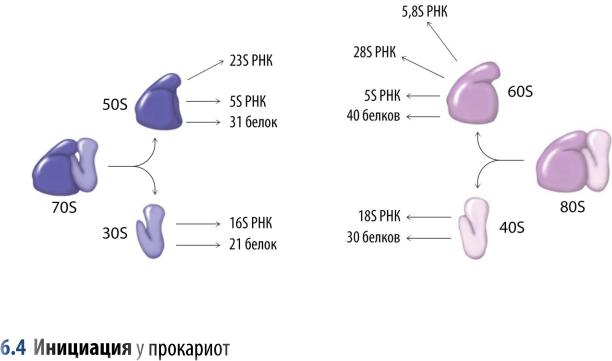


Рис. 2. Реконструированные изображения 30S, 50S и 70S рибосом *Е. Соli,* полученные с помощью данных электрон­ной дифракции. Субчастицы представлены в двух взаимно перпендикулярных проекциях.

**7.3.2** Зарисуйте схему инициации трансляции

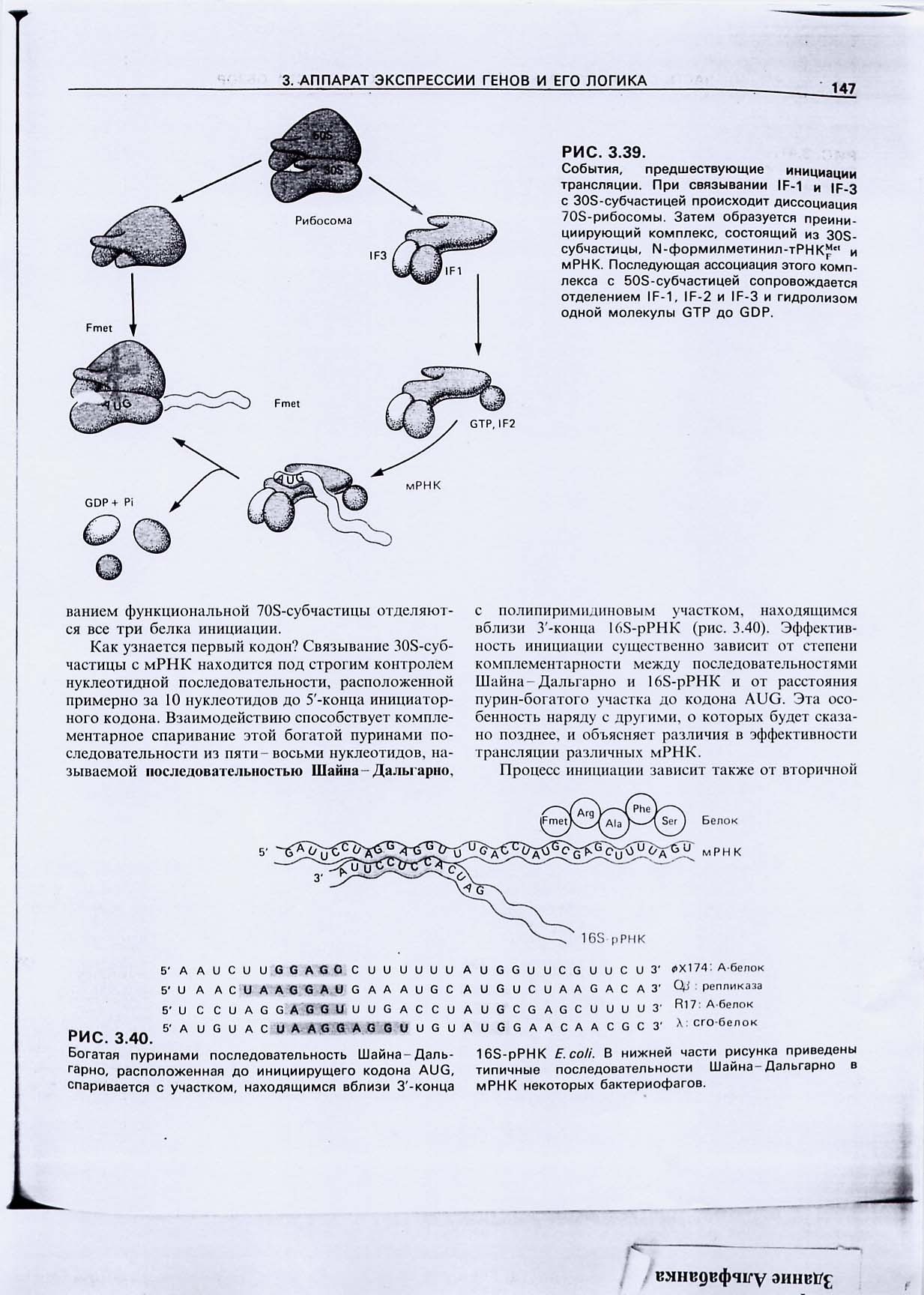


Рис. 3. События, предшествующие инициации трансляции. При связывании IF-1 IF-3 с 30S-субчастицей происходит диссоциация 70S-рибосомы. Затем образуется преинициирующий комплекс, состоящий из 30S-субчастлцы, N-формилметинил-тРНКfMet и мРНК. Последующая ассоциация этого комп­лекса с 50S-субчастицей сопровождается отделением IF-1, IF-2 и IF-3 и гидролизом одной молекулы GТР до GDР.

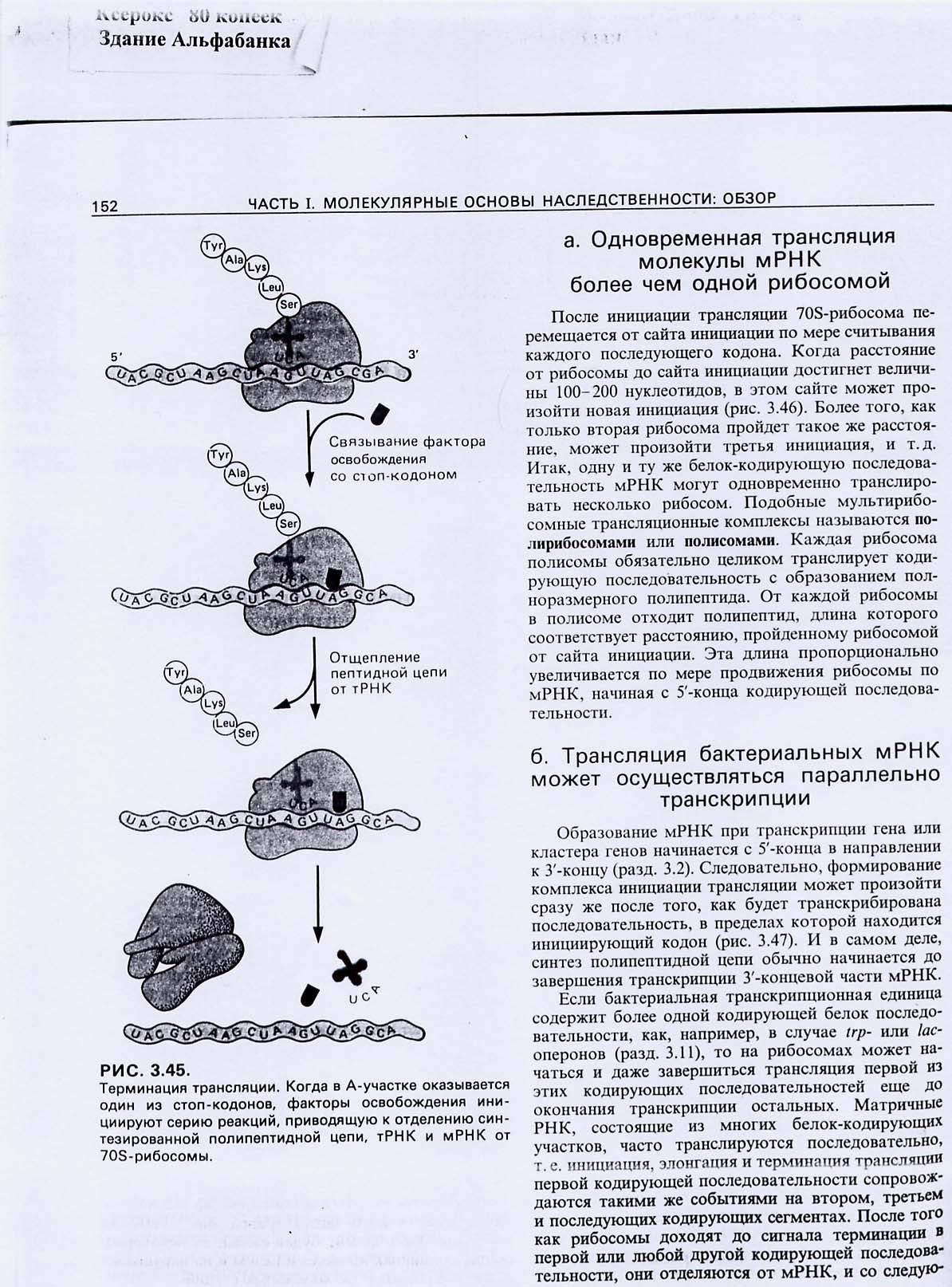


Рис. 4. Образование первой пептидной связи. Преинициирующий комплекс 70S-рибосомы с мРНК и N- формилметионил-тРНКfMet, находящийся в Р-участке, связывает тройной комплекс аланил-тРНКА1а- ЕF-Тu-GТР. Аланил-тРНКА1а перемещается к А-участку и связывается со вторым кодоном, GCU, с помощью антикодона 5'-АGС-3'. GТР гидролизуется, и комплекс ЕF-Тu-GDР отделяется. В результате пептидилтрансферазной реак­ции дипептидил-тРНК занимает А-участок.

**7.3.3** Зарисуйте схему элонгации полипептидной цепи.

При ассоциации двух рибосомных субчастиц пе­ред инициацией трансляции образуются два функ­циональных участка, необходимых для сборки бел­ка: Р- и А-участки. Формилметионил-тРНКfMet занимает Р-участок, а для образования первой пептидной связи необходимо, чтобы аминоацил-тРНК, соответст­вующая следующему кодону, заняла А-участок. Для этого аминоацил-тРНК должна сначала связать ЕF-Тu и GТР. Образовавшийся тройной комплекс (аминоацил-тРНК-EF-Тu-GТР) и доставляет ами-ноацил-тРНК к А-участку.

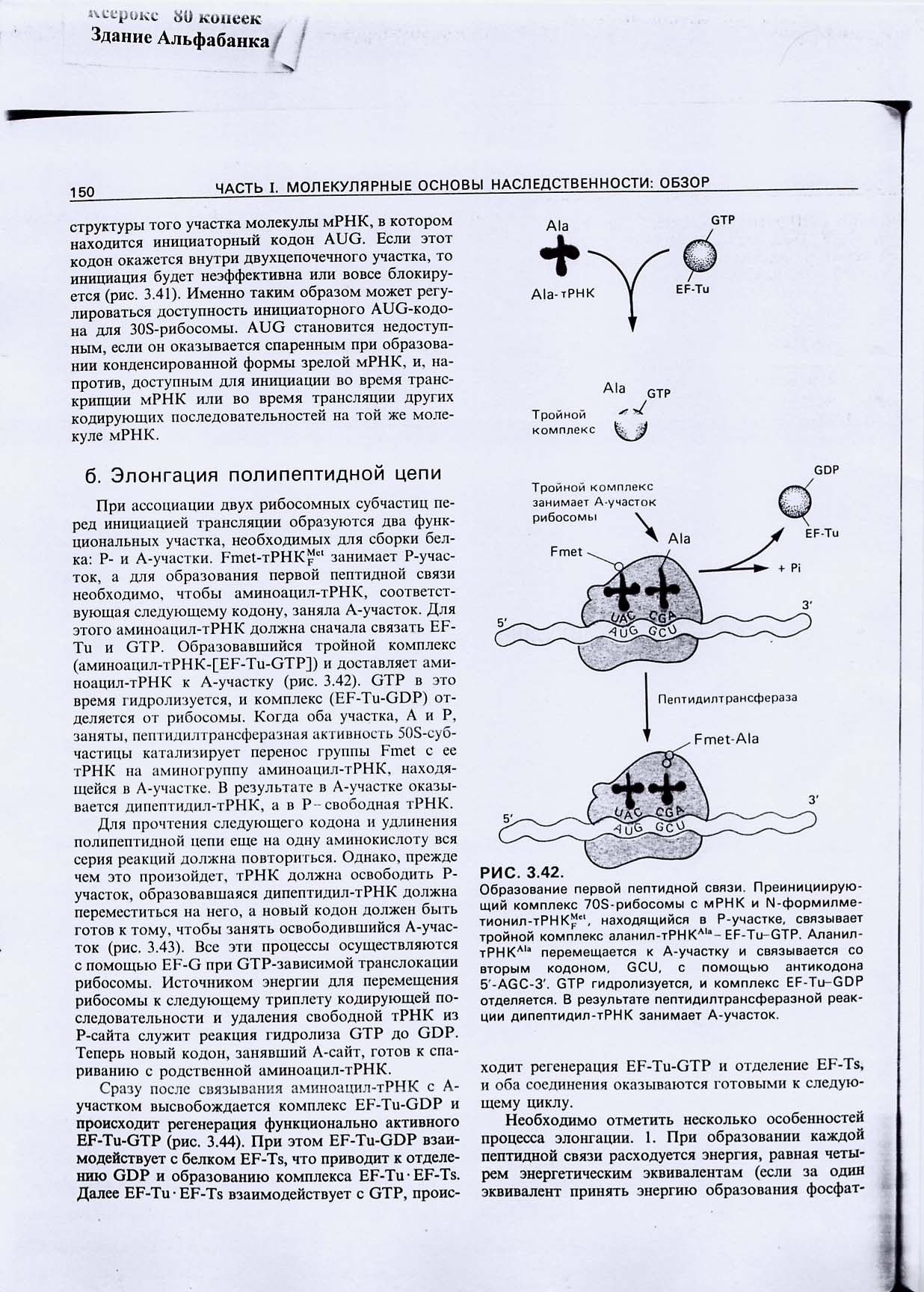


Рис. 5. Элонгация полипептидной цепи. Фактор ЕР-С осуществ­ляет СТР-зависимое перемещение 705-рибосомы вдоль мРНК. Далее СТР гидролизуется, тРНК удаляется из Р-участка и пептидил-тРНК перемещается из А-участка на освободившийся Р-участок. Теперь А-участок и сле­дующий кодом готовы принять «свою» аминоацил-тРНК.

**7.3.4** Зарисуйте схему терминации трансляции

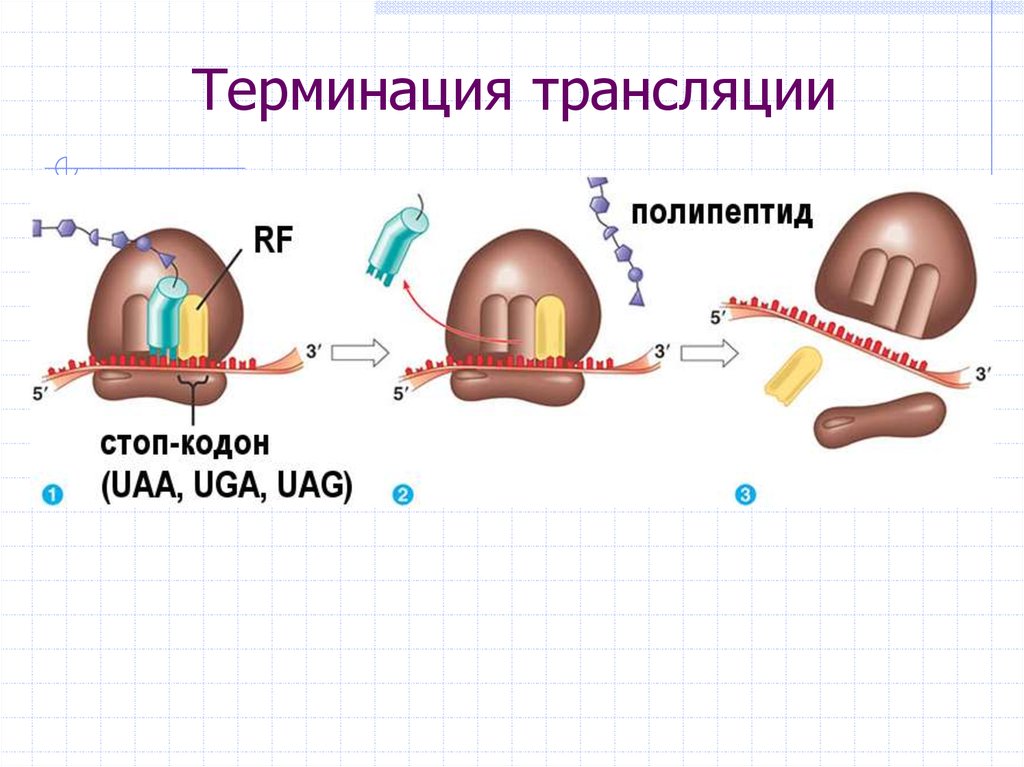


Рис. 6. Терминация трансляции.

Когда в А-участке оказывается один из стоп-кодонов, факторы освобождения ини­циируют серию реакций, приводящую к отделению син­тезированной полипептидной цепи, тРНК и мРНК от 70S-рибосомы.

**7.3.5** Решите задачу

**Пример:**

Фрагмент молекулы ДНК содержит 1230 нуклеотидных остатков. Сколько аминокислот будет входить в состав белка?

Дано: 1230 нуклеотидов

Найти: количество аминокислот

Решение:

Одной аминокислоте соответствует 3 нуклеотда, поэтому 1230:3= 410 аминокислот.

Ответ: 410 аминокислот.

**Задача 1:**

Определите число аминокислот , входящих в состав белка, число триплетов и число нуклеотидов в гене, который кодирует этот белок, если в процессе трансляции участвовало 30 молекул тРНК.

**Задача 2:**

Молекулярная масса полипептида составляет 40000. Определите длину кодирующего его гена, если молекулярная масса одной аминокислоты в среднем равна 100, а расстояние между соседними нуклеотидами в цепи ДНК составляет 0, 34 нм.

**Задачи к теме «Трансляция»:**

Пользуясь таблицей биологического кода:

1) установите строение пептида, синтезированаго на фрагменте матрицы следующего строении:

5'............-GUC-CAC-UCA-..........3'

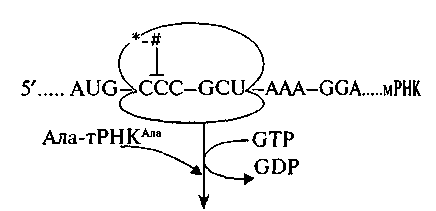
2) назовите нуклеиновую кислоту, которая явля­ется матрицей, и укажите, в каком направле­нии будут идти ее прочтение и синтез пептида;

3) перечислите компоненты, необходимые до синтеза белка;

4) напишите реакцию образования аа-тРНК для аминокислоты, закодированной триплетом САС. Назовите фермент;

5) укажите последовательность и направление нуклеотидов антикодона адапторной молекулы.

6) Ниже изображены события на рибосоме на ста­дии...

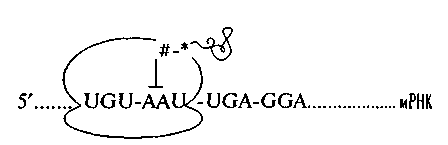


а) продолжите события, изобразив включение Ала-тРНКАла в рибосому;

б) допишите в местах, обозначенных значка­ми \* и #, соответствующие аминокислоты;

в) назовите центр на рибосоме, в который включается Ала-тРНКАла, и фактор, необхо­димый для осуществления этой стадии

7) Ниже показано включение очередной аминокислоты в молекулу препроинсулина:



а) продолжите синтез пептида, изобразив соот­ветствующуюсхему. Замените значки \* и # на соответствующие аминокислоты;

б) назовите последующие стадии процесса и уча­ствующие в них факторы.

**7.4 Контрольные вопросы для самопроверки**

**Общая схема биосинтеза белка**

1. Что такое трансляция?
2. Из каких компонентов состоит белок-синтезирующая система клетки?
3. Дайте характеристику основным составляющим белок-синтезирующей системы.
4. Какова функция аминоацил-т-РНК-синтетаз?
5. Раскройте особенности строения аминоацил-т-РНК-синтетаз.
6. В чем заключается механизм действия аминоацил-тРНК-синтетаз?
7. Раскройте особенности организации вторичной структуры т-РНК.
8. Раскройте особенности организации третичной структурыт-РНК.
9. Какие функции в клетке выполнят и-РНК?
10. Каково строение и особенности организации и-РНК?
11. Какие функции в клетке выполнят р-РНК?
12. Какие особенности характерны для вторичной структуры р-РНК?
13. Какие функции выполняют рибосомные белки?
14. Какие стадии составляют процесс трансляции?

**Морфологическая и функциональная структура рибосом**

1. Что такое рибосомы?
2. Какие функции рибосомы выполняют в клетке?
3. Как рибосомы локализованы в клетке?
4. В чем заключаются особенности морфологической организации рибосом?
5. Почему рибосомы являются нуклеопротеидами?
6. Что такое коэффициент седиментации?
7. Какова детальная форма субъединиц рибосом?
8. Что такое диссоциация рибосомы? Когда она происходит?
9. Что такие ассоциация рибосомы? Когда происходит данный процесс?
10. Какие свойства рибосомы позволяют ей выполнять свои нативные функции?
11. Что такое рабочий цикл рибосомы?
12. Какие функционально-активные участки можно выделить на субъединицах рибосом?
13. Что такое рекогниция?
14. Что такое инициация белкового синтеза?
15. Как происходит инициация белкового синтеза у прокариот?
16. Как происходит инициация белкового синтеза у эукариот?
17. Какие факторы инициации вам известны?
18. Что такое элонгация белкового синтеза?
19. Что такое кодон-антикодоновое взаимодействие?
20. В чем сущность адапторной гипотезы? Каковы ее доказательства?
21. В чем заключается гипотеза нестрогого соответствия?
22. Какова роль гидролиза ГТФ в ходе элонгации?
23. Напишите уравнение гидролиза ГТФ?
24. Что такое транспептидация?
25. Каков химизм процесса транспептидации?
26. Что такое транслокация?
27. Какоков химиз процесса транслокации?
28. Какова скорость элонгации белкового синтеза?
29. Как можно регулировать скорость элонгации?
30. Какие факторы элонгации вам известны?
31. Что такое терминация белкового синтеза?
32. Что такое терминирующий кодон?
33. Какие терминационные факторы вам известны?

**Регуляция трансляции у прокариот и эукариот.**

1 Каким образом в клетке происходит регуляция биосинтеза белка?

2 В чем заключаются основные особенности регуляции биосинтеза белка у эукариот?

3 В чем заключаются основные особенности регуляции биосинтеза белка у прокариот?

4 Что такое информосомы?

5 Как осуществляется транспорт новосинтезированных полипептидных цепей в клетке?

6 Какие посттрансляционные изменения белков вам известны?

**Реакции осаждения белков при нагревании**

*Реактивы*

Раствор белка (приготовление см. Приложение, 52) или разбавленная сыворотка крови лошади.

Уксусная кислота, 1% раствор.

Уксусная кислота, 10% раствор.

Хлористый натрий, насыщенный раствор.

Едкий натр, 10% раствор.

*Оборудование*

Штатив с пробирками.

Капельницы.

*Техника*

В 5 пробирок наливают по 10 капель раствора белка.В первой пробирке нейтральный раствор белка нагревают. Опалесценция усиливается еще до того, как жидкость закипит. При кипячении может выпасть осадок. Растворы белков кипят неровно, толчками, так как белок по стенкам свертывается и в этих местах происходит перегревание, поэтому нагревание надо проводить осторожно, все время встряхивая пробирку. Усиление опалесценции объясняется укрупнением взвешенных частиц белка. Они удерживаются во взвешенном состоянии, так как эти частицы несут заряд.

К нейтральному раствору белка во второй пробирке прибавляют 1—2 капли 1% раствора уксусной кислоты (до слабокислой реакции на лакмус), осадка при этом не образуется. При нагревании вначале появляется опалесценция, а при дальнейшем нагревании и последующем кипячении выпадает белый хлопьевидный осадок белка. Осадок появляется вследствие того, что в слабокислойсреде исследуемые белки находятся в изоэлектрическом состоянии, денатурируясь при нагревании, легко теряют свою растворимостьв результате агрегации.

Нейтральный раствор белка в третьей пробирке подкисляют10% раствором уксусной кислоты до сильно кислой реакции среды(добавляют 1—3 капли) и нагревают до кипения. Осадок не выпадает, поскольку при избытке водородных ионов (по сравнению с той концентрацией их, которая нужна для достижения изоэлектрического состояния) белки, имевшие в исходном растворе отрицательный заряд, перезаряжаются и приобретают положительный заряд, что придает им устойчивость.

Раствор белка в четвертой пробирке подкисляют 10% раствором уксусной кислоты до сильно кислой реакции среды, добавляют 2—3 капли насыщенного раствора поваренной соли и кипятят. Появляется белый хлопьевидный осадок белка, вследствие экранирования положительного заряда перезаряженных частиц белка противоположно заряженными ионами хлористого натрия путем адсорбции их. Кроме того, большое значение в этой реакции имеет водоотнимающее действие ионов поваренной соли.

К раствору белка в пятой пробирке добавляют 2—4 капли 10% раствора едкого натра (до щелочной реакции) и кипятят. Осадка необразуется, так как в щелочной среде подавляется основная диссоциация белка, усиливается кислотная и отрицательный заряд на коллоидных частицах белка возрастает еще более.

2. В одну пробирку добавляют несколько капель (1—2 капли) сульфосалициловой кислоты, а в другую такое же количество три-хлоруксусной кислоты. Наблюдают выпадение осадка белка.

**Осаждение белков органическими растворителями**

При добавлении к раствору белка органических растворителей, например спирта, выпадает осадок белка. В зависимости от природы белка для его осаждения требуются различные концентрации спирта. Осаждение наступает только из нейтральных или слабокислых растворов (в слабокислой среде заряд на коллоидных частицах белка является наименьшим) и более полно в присутствии электролитов, например хлористого натрия, что связано с ослаблением внутримолекулярных ионных связей ввиду конкуренции добавленных анионов и катионов. Если осаждение производить при низкой температуре (от 0 до 15 °С) и полученный осадок быстро отделить от спирта, то белок сохраняет свои природные свойства и может быть вновь растворен в воде. Длительное воздействие спирта приводит к необратимой денатурации белка.

Однако некоторые белки, например проламины растений, растворимы в горячем 70—80% спирте, гормон поджелудочной железы — инсулин растворяется в подкисленном 60% спирте. Это зависит от особенностей их первичной структуры.

*Реактивы*

Раствор яичного белка (приготовление см. Приложение, 52) или разбавленная сыворотка крови лошади.

Этиловый спирт, 96°.

Ацетон.

Хлороформ.

Хлористый натрий, насыщенный раствор.

Уксусная кислота, 1% раствор.

*Оборудование*

Штатив с пробирками.

Капельницы.

*Техника*

1. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка, а затем при взбалтыванииэтиловый спирт до появления осадка. При добавлении 1—2 капель 1% раствора уксусной кислоты образование осадка усиливается. Еще большее осаждение наблюдается при добавлении нескольких капель (1—2) насыщенного раствора поваренной соли.

Проделывают ту же реакцию, взяв вместо этилового спирта ацетон.

В пробирку наливают около 1 мл раствора белка и добавляютравный объем хлороформа. После встряхивания пробирки и последующего разделения слоев воды и хлороформа в верхнем слое жидкости появляется осадок белка. Денатурация белка хлороформом получила распространение при выделении нуклеиновых кислот и их очистке.

**Количественное определение аскорбиновой кислоты в продуктах (шиповнике, хвое, картофеле, капусте, молоке) с 2,6-дихлорфенолиндофенолом**

Содержание витамина С в пищевых продуктах может изменяться в зависимости от качества продукта, условий его технологической обработки, времени года, длительности и условий хранения и т. д. Сведения о содержании аскорбиновой кислоты в продуктах необходимы для того, чтобы учесть количество витамина С, поступающее с пищей.

Количественное определение основано на окислении аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и восстановлении 2,6-дихлорфенолиндофенола в бесцветное соединение.

Витамин С экстрагируют из продукта разведенной кислотой, так как в кислой среде он наиболее устойчив. Экстракт титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. После окисления всей имеющейся в экстракте аскорбиновой кислоты индикатор уже не восстанавливается, и его избыток окрашивает раствор в розовый цвет (окраска окисленной формы 2,6 дихлорфенолиндофенола в кислой среде розовая). Пользуясь изменением окраски, по количеств) реактива, израсходованного на окисление витамина С, вычисляют его содержание в исследуемом продукте.

*Реактивы и материалы*

Ягоды шиповника.

Хвоя.

Картофель.

Капуста.

Молоко свежее.

Соляная кислота, 2% раствор.

Уксусная кислота, 5% раствор.

2,6-Дихлорфенолиндофенол, натриевая соль, 0,001 н. раствор.

*Оборудование*

Весы аптечные и разновесы.

Ступка с пестиком.

Битое стекло, мелко истолченное.

Пипетка на 10 мл с делениями.

Воронки с бумажными фильтрами.

Колбы конические на 25 и 100 мл.

Пипетки на 3 и 5 мл.

Бюретка на 10 мл.

Микробюретка.

**Определение витамина С в шиповнике и хвое**

Отвешивают 0,1 г шиповника (или 1 г хвои).

Растирают навеску в ступке с щепоткой битого стекла, постепенно добавляя 9,9 мл (или 9 мл в случае хвои) 2% раствора соляной кислоты.

Полученный экстракт отфильтровывают в сухую колбочку.

В две конические колбочки отмеривают по 3 мл фильтрата и отитровывают из бюретки 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола до слабо-розовой окраски, удерживающейся около 30 секунд. Титрование ведут не более 2 минут. Результаты титрования записывают и высчитывают среднее арифметическое.

Вычисляют содержание витамина С в 100 г продукта. Исходят из того, что 1 мл 0,001 н. раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты (молекулярный вес аскорбиновой кислоты равен 176, а грамм-эквивалент = 88).

Расчет производят по формуле:

v • 0,088 • 10 • 100

х = '

3-в

где х — содержание витамина С в 100 г продукта, мг;

v — объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедший на "прование, мл;

0,088 — количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл л 001 н. раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, мг;

10 — общее количество вытяжки из навески, мл;

100 — коэффициент для пересчета на 100 г продукта;

3 — количество вытяжки, взятое для титрования, мл;

в — взятая навеска шиповника (хвои) в г. Среднее содержание аскорбиновой кислоты в 100 г сухого шиповника: целые плоды красного цвета — 1500 мг%, целые плоды темноокрашенные — 100 мг%.

Среднее содержание витамина С в хвое:

пихта (зимой) — 250 мг%,

пихта (летом) — 100 мг%,

сосна и ель (летом) — 70 мг%,

сосна и ель (зимой) — 220 мг%.

**Определение витамина С в картофеле**

Отвешивают 5 г картофеля и растирают в ступке с 16 мл 2% раствора соляной кислоты.

Сливают содержимое ступки в коническую колбу на 100 мл и несколько раз смывают ступку дистиллированной водой, перенося воду затем в ту же колбу.

Смесь в колбе титруют 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола до розового цвета, не исчезающего в течение 30 секунд.

Вычисляют содержание витамина С в 100 г картофеля по формуле:

v • 0,088 • 100

х = ,

5

где 5 — взятая навеска картофеля, г. Остальные обозначения те же, что и в предыдущей работе.

Среднее содержание витамина С в картофеле 10 мг%.

**Определение витамина С в капусте**

Отвешивают 2 г свежей капусты и растирают в ступке с 10 мл 5% раствора уксусной кислоты и щепоткой битого стекла.

Полученный экстракт отфильтровывают в сухую колбу.

В две конические колбочки на 25 мл наливают по 3 мл экстракта и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд.

Вычисляют содержание витамина С в 100 г капусты по формуле:

v • 0,088 • 10 • 100х=>2-3,

где 10 — объем экстракта, мл; 2 — взятая навеска, г;

3 — количество экстракта, взятое для титрования, мл. Остальные обозначения те же, что и в предыдущем опыте. Среднее содержание витамина С в белокочанной капусте 30 мг%.

**Определение витамина С в молоке**

5 мл коровьего молока разводят дистиллированной водой в сотношении 1 : 2. При разведении молоко отмеривают пипеткой, а дистиллированную воду наливают из бюретки.

5 мл полученного раствора вносят пипеткой в коническую колбу емкостью 25 мл, куда заранее наливают 1 мл 2% раствора соляной кислоты и дистиллированной воды до общего объема 15 мл.

Осторожно взбалтывая, содержимое колбы титруют из микробюретки 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, приливая последний по каплям до появления слабо-розового окрашивания, удерживающегося 0,5—1 мин. Для повторного титрования отбирают пробу из той же порции разведенного молока.

Содержание витамина С вычисляют по формуле:

х =v • 0,088 • С • 100

где х — количество аскорбиновой кислоты в 100 мл молока, мг;

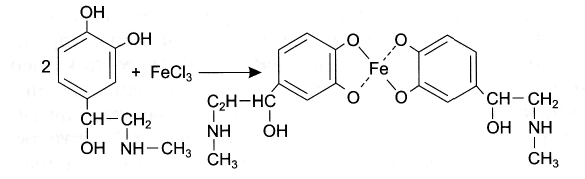
С — число, выражающее разведение (например, при разведении молока в соотношении 1:2 — разведение 3, при разведении молока в соотношении 1:5 — разведение бит. д.);

5 — количество разведенного молока, взятое для титрования, мл.

Остальные обозначения те же, что и в предыдущем опыте. Среднее содержание витамина С в молоке: коровьем — 1 мг%, женском — 5 мг%, кобыльем — 25 мг%.

**Качественная реакция на адреналин с хлорным железом**

При взаимодействии адреналина с хлорным железом возникает изумрудно-зеленое окрашивание. Реакция обусловлена наличием пирокатехиновой группировки в молекуле адреналина. Образуется соединение типа фенолята зеленого цвета.



Подобное окрашивание в присутствии хлорного железа получается с пирокатехином.

*Реактивы и материалы*

Адреналин, 0,1% раствор.

Хлорное железо, 3% раствор.

Едкий натр, 10% раствор.

Пирокатехин, 0,05% раствор.

*Оборудование*

Штатив с пробирками.

Капельницы.

*Техника*

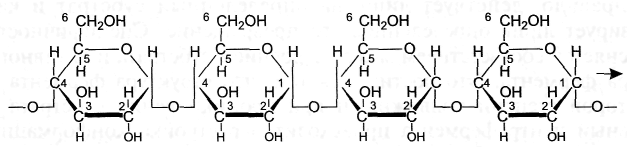
В пробирку помещают 10 капель 0,1% раствора адреналина иприбавляют 1 каплю 3% раствора хлорного железа. Жидкость окрашивается в изумрудно-зеленый цвет.

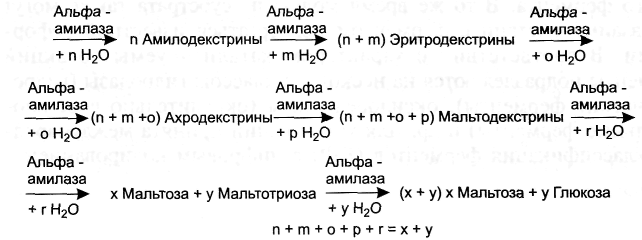
К содержимому пробирки добавляют 1 каплю 10% раствора едкого натра. Окраска переходит в винно-красную, а затем в коричневую.

Проделывают такую же пробу с 0,05% раствором пирокатехинаи убеждаются в том, что она аналогична реакции с адреналином. Это доказывает присутствие ядра пирокатехина в молекуле адреналина.

**Гидролиз крахмала а-амилазой слюны**

а-Амилаза слюны относится к классу гидролаз. Специфическими субстратами а-амилазы являются полисахариды крахмал и гликоген. В слюне имеется а-амилаза (КФ 3.2.1.1). Для исследования действия а-амилазы слюны в качестве субстрата берут крахмал. Нерасщепленный крахмал образует с йодом комплекс синего цвета и не обладает восстановительной способностью, так как почти не имеет свободных альдегидных групп. Раствор крахмала опалесцирует вследствие своего коллоидного состояния. а-Амилаза гидролизует а-1,4-глюкановые связи в крахмале, гликогене и олигосахаридах, которые разрываются без определенного порядка. При гидролизе крахмала образуются последовательно промежуточные продукты: амилодекстрины (дают синее или фиолетовое окрашивание с йодом), эритродекстрины (красно-бурое окрашивание с йодом), ахродекстрины (не дают окрашивания с йодом), малътодекстрины (не дают окрашивания с йодом). В качестве конечного продукта гидролиза под действием а-амилазы образуется смесь дисахарида мальтозы и моносахарида глюкозы. И мальтоза и глюкоза имеют свободные альдегидные группы, вследствие чего они обладают восстановительной способностью и открываются пробой Троммера. Опалесценция в гидролизате крахмала значительно меньше или отсутствует в сравнении с раствором нерасщепленного крахмала.





*Реактивы и материалы*

Разбавленная слюна: слегка ополаскивают рот дистиллированной водой для очищения его от остатков пищи, набирают новую порцию воды (примерно 15—20 мл) и ополаскивают рот в течение 1—2 мин. Собранную в стаканчик или пробирку жидкость профильтровывают и употребляют для анализа.

Крахмал, 1% раствор, свежеприготовленный.

Раствор йода в йодистом калии (приготовление см. Приложение, 54).

Едкий натр, 10% раствор.

Сернокислая медь, 1% раствор.

*Оборудование*

Штатив с пробирками.

Стаканчики.

Воронки с фильтром.

Пипетки.

Термостат или водяная баня, снабженная термометром.

Стеклянные палочки.

Капельницы.

*Техника*

К 5—10 каплям 1% раствора крахмала добавляют 1—2 капли раствора йода в йодистом калии и убеждаются в том, что крахмал с йодом дает синее окрашивание.

Заготавливают 8—10 пробирок, куда наливают по 1—3 капли раствора йода в йодистом калии.

В две другие пробирки помещают приблизительно по 5 мл 1% раствора крахмала. В одну из них добавляют около 3 мл дистиллированной воды (контрольный опыт), а в другую—около 3 мл разбавленной слюны (основной опыт). Содержимое обеих пробирок перемешивают стеклянной палочкой и ставят пробирки в термостат при 37°С или держат в зажатой кисти руки. Замечают время.

Через несколько секунд (5—7) из контрольного и основного опытов отливают по несколько капель жидкости в пробирки с раствором йода в йодистом калии и наблюдают окрашивание. Отбор проб и реакцию с раствором йода производят несколько раз через короткие интервалы. Сначала синее окрашивание будет появляться от проб, взятых из обеих пробирок; затем из пробирки, где есть амилаза, проба жидкости начнет давать с йодом красно-бурое окрашивание. Вскоре отмечают, что пробы жидкости из пробирки со слюной окрашивания с йодом более не дают. Эти различные окраски от йода указывают на то, что идет постепенный гидролиз крахмала с образованием декстринов. Когда последняя проба жидкости, взятая из пробирки со слюной, не изменит желтого цвета раствора йода, гидролиз считают завершенным и записывают время его окончания.

Пробы, взятые из контрольного опыта, все время дают синее окрашивание, что свидетельствует о том, что в отсутствие амилазы гидролиз крахмала не происходит.

5. С частью растворов основного и контрольного опытов производят пробу Троммера. С раствором из пробирки со слюной проба Троммера будет положительная, вследствие образования конечных продуктов ферментативного гидролиза крахмала. Раствор контрольного опыта пробу Троммера не дает. Наблюдают, что в пробирке с основным опытом опалесценция раствора в процессе гидролиза исчезает.

***Рекомендации к составлению протокола***

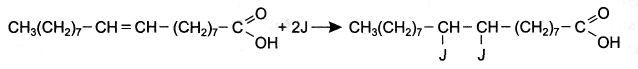
Результаты работы записать в таблицу. В выводах обратить внимание на то, что гидролиз крахмала под влиянием а-амилазы идет постепенно, через промежуточные продукты, при температуре тела или близкой к ней, в течение короткого времени. Обосновать, почему конечные продукты гидролиза дают положительную реакцию Троммера.

Гидролиз крахмала а-амилазой слюны

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Название | Окраска при | Время, | Температурные | Реакция |
| субстрата и | реакции с | затраченное | условия | Троммера |
| продуктов его | йодом | на гидролиз | гидролиза |  |
| гидролиза |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |

**Открытие непредельных жирных кислот в жире**

Непредельные жирные кислоты легко присоединяют галогены по месту двойных связей, образуя галогенпроизводные жирных кислот, что доказывается обесцвечиванием раствора брома или йода



*Реактивы и материалы*

1*.* Растительное масло или рыбий жир, раствор в хлороформе 2. Бром или йод, раствор в хлороформе.

*Оборудование*

1. Штатив с пробирками.
2. Капельницы.

*Техника*

1. К 15—20 каплям раствора жира в хлороформе прибавляют при взбалтывании по одной капле хлороформного раствора брома или йода (окрашен).
2. Вначале наблюдают обесцвечивание растворов брома или йода вследствие присоединения галоидов по месту двойных связей в молекулах жирных кислот. После насыщения всех непредельных связей дальнейшее добавление растворов брома или йода обесцвечивания их не вызывает.

О содержании непредельных жирных кислот в жире можно судить по его «йодному числу», показывающему количество граммовйода, присоединенных к 100 г жира.

***Рекомендации к составлению протокола***

Записать ход и химизм реакции. Сделать вывод о наличии ненасыщенных жирных кислот в исследованном жире.

**Эмульгирование жиров**

Эмульгирование жиров необходимо для ускорения переваривания жиров пищи в полости кишечника ферментом липазой, так как это вызывает увеличение поверхности соприкосновения жира с водным раствором липазы. Эмульгаторами являются поверхностноактивные вещества — белки, соли желчных кислот, мыла. Наибольшей эмульгирующей активностью обладают щелочно-реагирующие соли желчных кислот, которые вместе с желчью изливаются в двенадцатиперстную кишку через желчный проток. Они адсорбируются на поверхности жировых капель, образуя тончайший слой, причем гидрофильные группы желчных кислот обращены в сторону водной фазы, а гидрофобные радикалы направлены к жиру. При этом происходит уменьшение поверхностного натяжения на разделе двух фаз вода/жир, что приводит к распаду капелек жира на более мелкие.

*Реактивы и материалы*

1. Растительное масло (или рыбий жир).
2. Желчь, разведенная в 2 раза.
3. Раствор белка (приготовление см. Приложение, 52).
4. Натриевое мыло, 1% раствор.
5. Натрий углекислый, 1% раствор.

*Оборудование*

1. Штатив с пробирками.
2. Капельницы.

*Техника*

1. Берут 5 пробирок. В первую наливают 15 капель дистиллированной воды, во вторую — 15 капель разведенной желчи, в третью —15 капель раствора белка, в четвертую — 15 капель 1% раствора мыла и в пятую — 15 капель 1% раствора соды.
2. В каждую пробирку добавляют по 3—4 капли растительного масла, одновременно взбалтывают содержимое всех пробирок иготовят их по порядку в штатив.

3. Наблюдают в первой пробирке расслоение неустойчивой эмульсии на жир и воду, а во второй, третьей, четвертой и пятой — образование эмульсии.

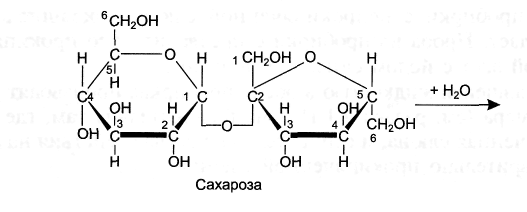
Эмульгирование жира содой обусловлено образованием мыла в результате взаимодействия углекислого натрия с присутствующими в жире свободными жирными кислотами.

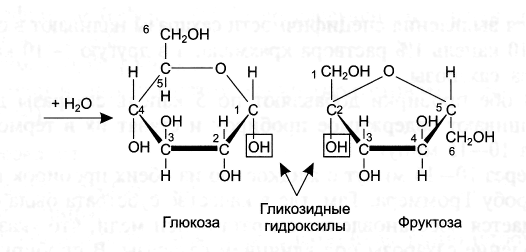
В выводах указать, в присутствии каких эмульгаторов получалась наиболее стойкая эмульсия. Отметить сравнительную значимость разных физиологических эмульгаторов жиров для процессапереваривания их в кишечнике.

**Специфичность а-амилазы слюны и сахарозы дрожжей**

Специфическими субстратами для амилазы являются полисахариды крахмал и гликоген. Субстратом для фермента сахаразы (a-D-фруктофуранозид—фруктогидролаза; КФ 3.2.1.26) служит дисахарид сахароза. Сахароза не дает пробу Троммера, так как в ее молекуле нет свободной альдегидной или кетонной группы вследствие дигликозидной связи между остатками глюкозы и фруктозы. После гидролиза сахарозы освобождается альдегидная группа глюкозы и кетонная группа фруктозы, которые и обусловливают положительную реакцию Троммера. Поэтому с помощью пробы Троммера можно выявить, произошел или не произошел гидролиз сахарозы.

Для исследования специфичности действия ферментов удобно пользоваться сахарозой, содержащейся в вытяжке из дрожжей.





*Реактивы и материалы*

Разбавленная слюна.

Сахароза, источником служит 20% профильтрованная взвесь растертых сухих дрожжей.

Крахмал, 1% раствор, свежеприготовленный.

Сахараза, 2% раствор.

Едкий натр, 10% раствор.

Сернокислая медь, 1% раствор.

*Оборудование*

Штатив с пробирками.

Капельницы.

Термостат или водяная баня, снабженная термометром.

*Техника*

Производят пробу Троммера с раствором сахарозы и убеждаются в том, что она отрицательная.

Наливают в одну пробирку 10 капель 1% раствора крахмала, в другую — 10 капель 2% раствора сахарозы.

В обе пробирки добавляют по 5 капель разбавленной слюны, перемешивают содержимое пробирок и ставят их в термостат при 37°С на 10—15 минут.

Через 10—15 минут с жидкостью из обеих пробирок проделывают пробу Троммера. Там, где в качестве субстрата был крахмал, наблюдается восстановление гидрата окиси меди, что указывает на расщепление крахмала под влиянием а-амилазы. В пробирке с сахарозой восстановления гидрата окиси меди не происходит. Это свидетельствует о том, что сахароза не гидролизовалась и, следовательно, она не является специфическим субстратом для а-амилазы.

Для выявления специфичности сахаразы наливают в одну пробирку 10 капель 1% раствора крахмала, а в другую — 10 капель 2% раствора сахарозы.

В обе пробирки добавляют по 5 капель сахаразы дрожжей, перемешивают содержимое пробирок и ставят их в термостат при37°С на 10—15 минут.

Через 10—15 минут с жидкостью из обеих пробирок проделывают пробу Троммера. Там, где в качестве субстрата была сахароза, наблюдается восстановление гидрата окиси меди, что указывает на расщепление сахарозы под влиянием сахаразы. В пробирке с крахмалом проба Троммера отрицательная; следовательно, крахмал не является субстратом для сахаразы.

***Рекомендации к составлению протокола***

Результаты работы оформить в виде таблицы. В выводах записать, в чем проявляется специфичность ферментов и чем она обусловлена.

Специфичность действия амилазы и сахарозы

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Фермент | Субстрат | Температура гидролиза | Реакция Троммера |
|  |  |  |  |