

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича

Робочий зошит з біохімії

студент__ __ курсу _____ групи

(прізвище, ім'я, по-батькові)

Чернівці
Чернівецький національний університет
2016

УДК 577.1 (076)
ББК 28.072я7
К 659

Друкується за ухвалою редакційно-видавничої ради
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича

Робочий зошит з біохімії / Г.П. Копильчук, О.М. Волощук.
– Чернівці : Чернівецький нац. ун-т, 2016. – с. 88.

© Копильчук Г.П., Волощук О.М., 2016

Передмова

Робочий зошит з біохімії підготовлений згідно з програмою нормативного курсу “Біохімія” для студентів денної та заочної форм навчання біологічних спеціальностей університетів.

Лабораторні роботи охоплюють класичні та сучасні методи якісного та кількісного аналізів основних груп біомолекул: нуклеїнових кислот, білків, ферментів, вуглеводів, ліпідів, вітамінів, гормонів. Самостійно виконана лабораторна робота, вчасно оформлений протокол, вичерпна відповідь на запитання по виконанню роботи оцінюються максимальною кількістю балів.

Для закріплення набутих знань після кожної роботи запропоновані контрольні запитання та запитання для самостійного вивчення.

Виконання лабораторних робіт та засвоєння теоретичного матеріалу сприятиме глибшому розумінню студентами теоретичних і практичних проблем сучасної біохімії, полегшить опанування програми нормативного курсу ”Біохімія”.

Лабораторне заняття № 1. **Вступ до біохімії**

Лабораторний практикум з біохімії потребує знань правил техніки безпеки та особливостей роботи в лабораторії з біологічним матеріалом, основних положень міжнародної системи одиниць (SI).

Завдання 1. Особливості роботи в біохімічній лабораторії та інструктаж з техніки безпеки

Вимоги безпеки під час виконання роботи

Дозволяється працювати тільки на заземлених приладах. Забороняється встановлювати запобіжники, що не відповідають номінальному значенню; здійснювати заміну запобіжників при ввімкненому обладнанні; виконувати ремонтні роботи об'єкта без зняття з нього напруги живлення. Не запускати жодного приладу без попередньої перевірки. Не залишати включений прилад без нагляду.

Для попередження трагічних наслідків через можливий викид реакційної суміші не заглядати у пробірку чи колбу зверху. Не виносити з лабораторії прилади, посуд і реактиви.

Роботу з отруйними речовинами проводити під витяжною шафою. Дотримуватися запобіжних заходів під час роботи з вибуховими та легкозаймистими речовинами.

Не виливати до раковини залишки кислот, лугів, вогнебезпечних рідин, а зливати їх у спеціальні склянки під витяжною шафою.

Розчини, що містять кислоти та луги, перед тим як виливати до каналізаційної системи, необхідно нейтралізувати. Речовини з різким запахом, і отруйні речовини повинні бути знешкодовані хімічною обробкою або спалені у спеціально відведеному місці за межами лабораторії, бажано на повітрі.

Не залишати жодних речовин у посуді без етикеток.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

Під час виникнення пожежі негайно вимкніть газ у всій лабораторії, приберіть із помешкання всі горючі речовини, засипте піском або прикрийте ковдрою полум'я та повідомте черговому пожежної охорони про те, що сталося. Дотримуйтесь правил протипожежної безпеки.

Якщо в лабораторії з якихось причин пролита значна кількість легкозаймистої рідини, то необхідно загасити всі горілки та електричні прилади, відчинити вікна та зібрати пролиту рідину ганчіркою або рушником, місце проливу засипати піском, потім зібрати його дерев'яною лопаткою та винести у спеціально відведене місце.

При легких термічних опіках шкіру необхідно промити спиртом, а потім змастити гліцеролом або вазеліном. У випадку сильніших опіків обпечене місце, після промивання концентрованим розчином перманганату калію та спиртом, необхідно змастити засобом від опіків (наприклад, сульфідиновою емульсією).

При опіках сильними кислотами потрібно промити обпечене місце великою кількістю води, а потім 3 % розчином соди.

При опіках сильними лугами шкіру необхідно промити водою, а потім нейтралізувати 1 % розчином борної кислоти. Аміак майже не діє на шкіру, але при попаданні в очі може викликати сильне пошкодження чи навіть сліпоту.

При випадковому попаданні реактивів усередину рекомендується випити більше води. Поряд із цим необхідно:

а) при *отруєнні кислотами* – випити склянку 2 % вуглекислої соди;

б) при *отруєнні лугами* – випити склянку 2 % оцтової або лимонної кислоти.

При отруєнні необхідно вивести того, хто постраждав, на свіже повітря, зробити штучне дихання та викликати лікаря.

При порізах передусім необхідно видалити з рани уламки скла, краї рани продезінфікувати 3 % спиртовим розчином йоду, а потім накласти стерильну пов'язку. При сильних кровотечах потрібно накласти вище рани джгут і викликати лікаря або направити постраждалого до поліклініки.

У випадку загоряння горючої рідини необхідно загасити всі горілки, прикрити полум'я азбестовим рушником або засипати його піском, чи скористатися вогнегасником із вуглекислим газом. Розчинні у воді вогненебезпечні речовини, такі як спирт, ацетон та інші можна загасити водою. Якщо горить нерозчинна у воді речовина (наприклад, ефір, бензол,

бензин, скипидар), то воду використовувати для гасіння пожежі не можна, оскільки вона не лише не буде ліквідована, але може навіть збільшитися. У цьому випадку полум'я потрібно гасити піском і використовувати вогнегасник.

Закінчивши роботу, необхідно:

- привести до ладу робоче місце, прилади й апаратуру;
- вимкнути головний газовий кран, вентиляцію та світло;

- перевірити, чи видалені з приміщення лабораторії надлишки горючих і легкозаймистих речовин, відпрацьовані рідини, сміття, промаслене ганчір'я;

- перевірити, чи весь посуд із реактивами закритий і розміщений на відведених місцях.

Завдання 2. Використання міжнародної системи одиниць (СІ) в біохімічній лабораторній практиці

Маса – величина, що характеризує інерційні та гравітаційні властивості тіла. Масу тіла у стані спокою визначають зважуванням на вагах. Одиницями маси є кілограм (кг), грам (г), частки граму – міліграми (мг), мікрограми (мкг), нанограми (нг). У біохімічних дослідженнях одиницями маси користуються для вираження речовин, відносна молекулярна маса яких невідома.

Кількість речовини – величина, що визначається кількістю структурних елементів (атомів, молекул, іонів, електронів тощо) у досліджуваній речовині. За одиницю кількості речовини приймають моль (моль – це кількість речовини, що містить стільки ж структурних одиниць, скільки міститься атомів в 0,012 кг ізотопу карбону ^{12}C . Вона дорівнює $6,02 \cdot 10^{23}$ і називається “постійною Авогадро”). На практиці використовуються також частки моля – кіломоль (кмоль), мілімоль (ммоль), мікромоль (мкмоль) тощо. Кількість речовини використовують для вираження результатів досліджень речовин, відносна молекулярна маса яких відома.

Молярна маса – це маса речовини в кількості 1 моль. Її виражають в кг/моль або г/моль і зазвичай позначають буквою “М”. Молярна маса речовини, виражена в грамах, чисельно дорівнює його відносній молекулярній (атомній) масі, вираженій в атомних одиницях маси.

Масова концентрація – відношення маси речовини до об'єму суміші. Одиниці в СІ – кг/м^3 , в біохімічних дослідженнях – г/л.

Молярна концентрація – відношення кількості речовини до об'єму суміші. Одиниці в СІ – моль/м^3 , в біохімічних дослідженнях – моль/л .

Нормальна концентрація або нормальність, виражається числом еквівалентів речовини, що міститься в 1 л розчину. Розчин, в 1 л якого міститься один еквівалент розчиненої речовини, називається нормальним.

Швидкість (активність) ферментативної реакції визначають за зміною концентрації субстрату або за утворенням продуктів реакції.

За **одиницю активності (E)** ферменту беруть таку його кількість, яка каталізує перетворення 1 $\mu\text{моль}$ субстрату за 1 хв за оптимальних умов. *Катал* (кат) – це активність ферменту, при якій реакція відбувається зі швидкістю 1 моль/с . 1 катал характеризує досить високу ферментативну активність, яка майже не зустрічається у звичайних умовах. Тому активність ферментів виражають у частках каталу: мілікатолах (1мл-кат = 10^{-3} кат), мікрокатолах (1 мк-кат = 10^{-6} кат), нанокатолах (1н-кат = 10^{-9} кат).

Одна міжнародна одиниця активності (E) = 16,67 н-кат.

Для вираження активності ферментів у практичній роботі часто користуються поняттями питомої та молярної активності. *Питому активність* ферментів виражають числом міжнародних одиниць ферментативної активності на 1 мг білка (або числом каталів на 1 кг білка). Питома активність знаходиться у прямій залежності від ступеня чистоти ферменту.

Кількість молекул субстрату, яка перетворюється однією молекулою ферменту за 1 хв, називають числом оборотів, або *молярною активністю* і виражають у каталах на 1г-моль ферменту.

Показники екскреції досліджуваного компонента з добовим об'ємом сечі визначають за кількістю речовини, що виводиться з сечею за добу (наприклад, ммоль/добу, мкмоль/добу, нмоль/добу).

Лабораторна робота № 1. **Якісні реакції на білки й амінокислоти**

Матеріали дослідження: яєчний білок, желатин.

Реактиви: 1 % CuSO_4 ; 1 % та 30 % NaOH ; концентровані HNO_3 , H_2SO_4 , CH_3COOH ; 0,5 % розчин нінгідрину; 5 % $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 1 % $\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_5(\text{OH})\text{COOH}$ (сульфанілова кислота), 5 % HCl , 0,5 % NaNO_2 , 10 % Na_2CO_3 .

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, водяна баня.

Завдання 1. Біуретова реакція (Шіотровського)

1.1. У пробірку № 1 налити 0,5 мл 1 % розчину яєчного білка, у № 2 – 0,5 мл 1 % розчину желатину.

1.2. У кожную пробірку додати 1 мл 1 % розчину NaOH і по 3 краплі 1 % розчину CuSO_4 .

1.3. Спостерігати зміну забарвлення. Отримані результати занести до таблиці.

Завдання 2. Нінгідрінова реакція на α -амінокислоти

2.1. У пробірку № 1 налити 0,5 мл 1 % розчину яєчного білка, у № 2 – 0,5 мл 1 % розчину желатину.

2.2. У кожную пробірку додати 0,5 мл 0,5 % розчину нінгідрину й нагріти до кипіння.

2.3. Отримані результати спостережень занести до таблиці.

Завдання 3. Ксантопротеїнова реакція (на ароматичні амінокислоти)

3.1. У пробірку № 1 налити 0,5 мл 1 % розчину яєчного білка, у № 2 – 0,5 мл 1 % розчину желатину.

3.2. У кожную пробірку додати по 3 краплі концентрованої HNO_3 й обережно нагріти.

3.3. Після охолодження в пробірки додати по 10 крапель концентрованого NH_3 або 30 % розчину NaOH .

3.4. Спостерігати зміну забарвлення.

3.5. Результати спостережень занести до таблиці.

Завдання 4. Реакція Адамкевича

4.1. У пробірку № 1 налити 0,5 мл яєчного білка, у № 2 – 0,5 мл желатину.

4.2. У кожену пробірку додати по 0,5 мл концентрованої CH_3COOH .

4.3. Розчин трохи підігріти, потім охолодити й по стінці обережно долити 1 мл концентрованої H_2SO_4 . Пробірки помістити в киплячу водяну баню на 10 хв.

4.4. Результати спостережень занести до таблиці.

Завдання 5. Реакція Фоля

5.1. У три пробірки налити по 0,2 мл розчину $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

5.2. По краплях додати 30 % розчину NaOH до розчинення утвореного осаду $\text{Pb}(\text{ONa})_2$.

5.3. У пробірку № 1 налити 1 мл яєчного білка, № 2 – 1 мл желатину, № 3 – помістити 1 – 2 волосини.

5.4. Суміш обережно нагріти. При позитивній реакції розчин починає темніти.

5.5. Результати спостережень занести до таблиці.

Оформлення роботи

Результати спостережень занести до таблиці:

Назва реакції	Матеріали досліді	Спостереження	Принцип реакції
Біуретова	Яєчний білок		
	Желатин		

Нінгідринова	Яечний Білок		
	Желатин		
Ксантопротейнова	Яечний білок		
	Желатин		
Адамкевича	Яечний білок		
	Желатин		
Фоля	Яечний білок		
	Желатин		
	Волосся		

Лабораторна робота № 3. Виділення білків із біологічних рідин

Матеріали дослідження: розчин слини, молоко, кров.

Реактиви: 1 % CH_3COOH , біуретовий реактив, β -нафтол, концентрована H_2SO_4 , HNO_3 , 0,1 % та 1 % HCl , 10 % NaOH , 5 % бензидин, 3% H_2O_2 , $\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_5(\text{OH})\text{COOH}$.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, скляні палички, фільтрувальний папір, зворотний холодильник, водяна баня.

Завдання 1. Виділення муцину зі слини та вивчення його властивостей

1.1. Внести в 2 пробірки по 10 крапель крапель слини і додати по краплях 1 % розчину CH_3COOH до появи згустків муцину.

1.2. Промити осад муцину в пробірках водою, притримуючи згусток скляною паличкою.

1.3. Із вмістом 1-шої пробірки провести біуретову реакцію.

1.4. У пробірку № 2 додати 5-6 крапель розчину β -нафтолу, перемішати й обережно нашарувати 1 мл концентрованої H_2SO_4 . На межі двох шарів спостерігати появу фіолетового кільця.

1.5. Пояснити, природа якої компоненти даного глікопротеїну доводиться кожною реакцією.

Компонента гліко-протеїну	Реактиви	Спостереження	Пояснення

--	--	--	--

Завдання 2. Вивчення хімічної природи гемопротеїнів

2.1. У пробірку налити розведеної в 5000 раз крові, прокип'ятити на водяній бані кілька хвилин. Охолодити.

2.2. Додати 5 крапель 5 % свіжоприготованого в CH_3COOH бензидину і 5 крапель 3 % H_2O_2 . За дії на гемоглобін концентрованої CH_3COOH гем перетворюється в гемін, який каталізує реакцію окислення бензидину пероксидом водню.

2.3. Спостерігати зміну забарвлення.

Компонента гемопротеїну	Спостереження	Пояснення

Завдання 3. Виявлення білка в сечі

3.1. Осадження кип'ятінням

3.1.1. Попередньо перевірити реакцію сечі універсальним індикатором. Якщо сеча має кислу реакцію, то її (2-3 мл) зразу прокип'ятити у пробірці, а якщо основну – прокип'ятити після додавання по краплях 1 % розчину

CH_3COOH до слабкокислої реакції за універсальним індикатором.

3.1.2. Спостерігати появу помутніння або осаду в присутності білка.

3.1.3. Додати 5 крапель 10 % CH_3COOH і повторно прокип'ятити. Осад білка за цих умов не розчиняється, на відміну від осаду фосфатів і карбонатів кальцію та магнію, які також випадають в осад у слабкокислому середовищі, але розчиняються під час нагрівання у більш кислому розчині CH_3COOH . Записати результати спостережень.

3.2. Проба Хеллера

3.2.1. У пробірку налити 1 мл концентрованої HNO_3 і обережно з піпетки по стінці пробірки нашарувати сечу.

3.2.2. Спостерігати через 2-4 хв на межі обох рідин появу аморфного шару (білкового кільця) у випадку присутності в пробі білка. За відсутності білка у сечі на межі рідин спостерігається поява прозорого кольорового кільця, зумовленого зміною пігментів сечі під впливом HNO_3 .

3.3. Проба з сульфосаліциловою кислотою

3.3.1. До 1 мл сечі додати 2 краплі свіжоприготованого 20 % розчину $\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_5(\text{OH})\text{COOH}$.

3.3.2. При наявності білка у сечі спостерігати появу білого осаду або помутніння.

Метод виявлення	Спостереження	Пояснення

Висновок:

(підпис викладача)

Лабораторна робота № 4. Методи очищення білків

Матеріали дослідження: 1 % розчин яєчного білка.

Реактиви: 10 % AgNO_3 , біуретовий реактив.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, водяна баня.

Завдання 1. Діаліз

1.1. У діалізний мішечок налити 5 мл сольового розчину білка.

1.2. Верхній край мішечка закріпити між двома суміжними паличками, скріпити їх краї гумовими кільцями і занурити діалізний мішечок у склянку з дистиллятом на одну годину.

1.3. Після закінчення діалізу вміст мішечка вилити в пробірку № 1 (діалізат), у пробірку № 2 налити рідину зі склянки, у пробірку № 3 – дистилят. Вміст трьох пробірок використати для аналізу на хлориди й білок. Для цього провести подані нижче реакції.

1.4. У три пробірки налити по 1 мл відповідно діалізату (№ 1), розчину зі склянки (№ 2) та дистиляту (№ 3). У кожену пробірку додати по 3 краплі 10 % розчину AgNO_3 . Проаналізувати, у якій пробірці випадає осад аргентум хлориду.

1.5. У три інші пробірки налити по 1 мл відповідно діалізату (№ 1), рідини зі склянки (№ 2) та дистиляту (№ 3). В усі пробірки додати по 2 мл біуретового реактиву. Червоно-фіолетове забарвлення свідчить про наявність білка в розчині.

Оформлення роботи. Занести результати спостережень до таблиці.

Розчини, що досліджуються	Реакція з AgNO_3	Біуретова реакція	Чим зумовлена реакція
Діалізат			
Рідина зі склянки			
Дистилят			

Висновок:

_____ (підпис викладача)

Лабораторна робота № 6.

Осадження білків

Матеріали дослідження: 1 % розчин яєчного білка.

Реактиви: 1 %, 10 % розчини та концентрована CH_3COOH ; 5 % CuSO_4 ; 10 % NaOH ; насичений розчин NaCl ; концентрована HCl , H_2SO_4 , HNO_3 ; 10 % сульфанілова кислота; 10 % CCl_3COOH , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (ацетон); 10 % розчин пікринової кислоти; 5 % $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; 5 % $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; 5 % розчин таніну; 5 % AgNO_3 ; 1 % NaCl ; порошок і насичений розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки.

Незворотне осадження білків

1. Осадження білків неорганічними осаджувачами

Завдання 1. Осадження білків мінеральними кислотами

1.1. У три пробірки налити по 1 мл відповідно концентрованої HCl , H_2SO_4 та HNO_3 .

1.2. Акуратно по стінці в усі пробірки додати по 1 мл розчину білка. На межі двох шарів рідин утворюється осад білка у вигляді тонкої плівки.

1.3. Результати спостережень занести до таблиці.

Завдання 2. Осадження білків солями важких металів

2.1. У три пробірки налити по 1 мл 1 % розчину яєчного білка. Потім у першу пробірку додати 5 крапель 5 % розчину CuSO_4 , у другу – 5 % розчину $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, у третю – 5 % розчину AgNO_3 .

2.2. Спостерігати утворення в усіх пробірках осаду.

2. Осадження білків органічними осаджувачами

Завдання 1. Осадження білків органічними кислотами

1.1. У дві пробірки налити по 1 мл 1 % розчину білка.

1.2. Додати по кілька крапель в пробірку № 1 10 % розчину $\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_5(\text{OH})\text{COOH}$ і стільки ж розчину CCl_3COOH – в пробірку № 2. У пробірках утворюється осад білка.

1.3. Результати спостережень занести до таблиці.

Завдання 2. Осадження білків органічними розчинниками

2.1. У пробірку налити 1 мл 1 % розчину яєчного білка та додати 1 мл ацетону або спирту. Спостерігати помутніння.

2.2. Додати до пробірки кілька крапель NaCl.

2.3. Результати спостережень занести до таблиці.

Завдання 3. Осадження білків алкалоїдними реактивами

3.1. У три пробірки налити по 1 мл 1 % розчину яєчного білка та додати по краплі 1 % розчину CH_3COOH .

3.2. Налити в пробірку № 1 2 – 3 краплі 10 % розчину пікринової кислоти, у № 2 – 5 % розчину таніну, у № 3 – 5 % розчину калію заліzosиньородистого.

3.3. Результати спостережень занести до таблиці.

3. Осадження білків під час нагрівання

Завдання 1. Осадження білків під час нагрівання та вплив рН на осадження білка

1.1. У 5 пронумерованих пробірок налити по 1 мл 1 % розчину яєчного білка.

1.2. У пробірку № 2 додати 2 краплі 1 % розчину CH_3COOH , в пробірку № 3 – 2 краплі 10 % розчину CH_3COOH , № 4 – 1 мл концентрованої CH_3COOH і 5-6 крапель насиченого розчину NaCl, № 5 – 1 мл 10 % розчину NaOH.

1.3. Усі пробірки нагріти до кипіння.

1.4. Записати в таблицю результати осадження білків під час кип'ятіння в різних середовищах

Зворотне осадження білків

Завдання 1. Висолювання білків натрій хлоридом

1.1. У пробірку налити 2 мл розчину яєчного білка та додати порошок NaCl до повного насичення розчину (поки нова порція порошку не залишиться нерозчинною). Через декілька хвилин з'являється осад глобулінів.

1.2. Вміст пробірки відфільтрувати. У фільтраті залишаються альбуміни, які в нейтральних розчинах не випадають в осад навіть при додаванні натрій хлориду до повного насичення.

1.3. До фільтрату додати 1 мл 1 % розчину CH_3COOH й прокип'ятити. У слабкокисломому середовищі альбуміни випадають в осад.

1.4. Через 2 хвилини альбуміни відфільтрувати та перевірити фільтрат на відсутність білка за допомогою кип'ятіння та біуретової реакції.

1.5. Для цього у дві пробірки додати по 1 мл фільтрату. Пробірку № 1 поставити на киплячу баню, а в пробірку № 2 додати біуретового реактиву.

1.6. Через 3 хвилини провести спостереження. Негативна реакція (№ 1 – прозорий, № 2 – блакитний) в обох випадках вказує на відсутність білка.

Завдання 2. Висолювання білка амоній сульфатом

2.1. До 2 мл білка додати 2 мл насиченого розчину $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і перемішати. Утворюється напівнасичений розчин амоній сульфату, у якому випадає осад глобулінів.

2.2. Через 5 хв відфільтрувати вміст пробірки. У фільтраті залишається інша фракція – альбуміни.

2.3. До фільтрату додати порошок амоній сульфату до повного насичення. Випадає осад яєчного альбуміну.

2.4. Осад відфільтрувати й перевірити фільтрат на відсутність білка за допомогою кип'ятіння та біуретової реакції (див. 1.4.)

2.5. Результат 1 – 2 завдань занести до таблиці.

Оформлення роботи

1. Записати результати реакцій незворотного осадження білка при дії неорганічних і органічних осаджувачів у вигляді таблиці:

Назва речовин, які осаджують білки	Використані реактиви	Характер і колір осаду	Чим зумовлена реакція
Мінеральні кислоти			

Солі важких металів			

Органічні кислоти			
Органічні розчинники			
Алкалоїдні реактиви			

2. Результати спостережень дослідів з осадження білків під час нагрівання оформити у вигляді таблиці:

№ пробірки	Середовище	Результати спостережень	Чим зумовлена реакція
1.	Нейтральне середовище		
2.	Слабкокисле середовище (1 % CH_3COOH)		
3.	Кисле середовище (конц. CH_3COOH)		
4.	Кисле середовище + електроліт (конц. $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NaCl}$)		
5.	Лужне середовище (10 % NaOH)		

Завдання 2. Метод Лоурі

2.1. Узяти 0,1 мл досліджуваного розчину білка, довести до 1 мл дистиллятом, додати 2 мл розчину С, перемішати. Через 2 хв додати 0,2 мл розведеного реактиву Фоліна (дослід).

2.2. До 1 мл води додати 2 мл розчину С, перемішати. Через 2 хв додати 0,2 мл розведеного реактиву Фоліна (контроль). Залишити на 30 хв у темряві.

2.3. Виміряти інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі за довжини хвилі 750 нм.

2.4. Кількість білка в розчині знайти за калібрувальним графіком.

2.5. Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка приготувати 50 мл стандартного розчину білка, що містить 1 мг білка у 1 мл розчину. У серію пробірок відібрати по 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 мл стандартного розчину білка й довести об'єм кожної пробірки до 10 мл водою. З кожної пробірки відібрати по 0,1 мл і провести реакцію, як описано вище. Виміряти інтенсивність забарвлення кожної проби на спектрофотометрі. Калібрувальний графік побудувати, відкладаючи на осі абсцис концентрації використаних розчинів білка, а на осі ординат – відповідні їм значення оптичної густини.

Місце для вклеювання калібрувального графіка

8. Що таке зворотне і незворотне осадження білків? Який механізм осадження білків?
9. Що таке денатурація білка, і які фактори її викликають?
10. Які речовини використовують для осадження білків і який принцип їх дії?
11. Що таке висолювання білків і в чому його принцип?
12. Охарактеризуйте білки як амфотерні електроліти.
13. Чим зумовлено випадання білка в осад в ізоелектричній точці?
14. Наведіть порівняльну характеристику основних методів кількісного визначення білка.

Лабораторна робота № 8. Вивчення властивостей ферментів

Матеріали дослідження: 10 % розчин амілази, розчин сахарози

Реактиви: 0,25 %, 0,5 % та 1 % розчин крохмалю; розчин I₂; розчин Фелінга; 1 % розчин сахарози; 1 % NaCl; 1 % CuSO₄; 1 % розчин KI; буферні розчини з pH 1,2; 6,8; 10,0; 0,1 н HCl; 1 % Pb(CH₃COO)₂; 1 % I₂, 5 % HCOH (формальдегід).

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, водяні бані з різною температурою

Завдання 1. Вплив температури на активність ферментів

1.1. У 4 пробірки налити по 10 крапель 0,5 % розчину крохмалю.

1.2. Пробірку № 1 поставити в лід (0⁰), № 2 – у штатив за кімнатної температури (25⁰), № 3 – у водяну баню за температури 45⁰, № 4 – у водяну баню за температури 75⁰ і залишити на п'ять хвилин.

1.3. Через 5 хв у пробірки з крохмалем додати по 10 крапель розчину амілази (розведена слина) і залишити за вищезазначених температур на 10 хв.

1.4. В інші чотири пробірки налити по 2 мл дистильату й по 2 краплі розчину йоду.

1.5. У заготовлені пробірки з йодом додати по 5 крапель інкубаційного середовища після ферментативної реакції з пробірок № 1, № 2, № 3, № 4 і перемішати. Результати зафіксувати в таблиці:

№ проб	Температура, °С	Забарвлення розчину
1.	0	
2.	20	
3.	37	
4.	75	

Завдання 2. Вплив рН на активність ферментів

2.1. У 3 пробірки налити по 3 мл буферного розчину з рН 1,2; 6,8; 10,0.

2.2. У кожну пробірку додати по 1 мл розчину слини і по 2 мл 0,5 % розчину крохмалю. Перемішати й інкубувати за 37°C 10 хв.

2.3. Після інкубації до вмісту 2 і 3 пробірки додати відповідно 1 і 2 мл 0,1 н НСІ (реакція на крохмаль позитивна лише в кислому середовищі) і провести пробу Люголя.

2.4. До 10 крапель досліджуваного розчину додати 2 краплі розчину йоду в йодиді калію.

2.5. Порівняти інтенсивність розпаду крохмалю в залежності від рН і зробити висновки.

№ проб	рН	Забарвлення розчину
1.	1,2	
2.	6,8	
3.	10,0	

Завдання 3. Специфічність дії ферментів

3.1. Приготувати 4 пробірки: № 1, № 2, № 3, № 4. У перші дві пробірки налити по 10 крапель розчину крохмалю, а дві інші – по 10 крапель розчину сахарози.

3.2. У пробірку № 1 додати 5 крапель препарату амілази (розчин слини), а в № 2 – 5 крапель препарату сахарози (витяжки з дріжджів). Обидві пробірки поставити у водяну баню за 38°C на 10 хв.

3.3. У пробірку № 3 додати 5 крапель препарату сахарози (витяжка з дріжджів), а № 4 – 5 крапель препарату амілази (розведена слина). Обидві пробірки поставити у водяну баню за 38°C на 10 хв.

3.4. Через зазначений час у пробірки № 1 і № 2 додати по 2 краплі розчину йоду й відмітити забарвлення, а з вмістом пробірок № 3 і № 4 проробити реакцію Фелінга.

3.5. Для цього до вмісту пробірок № 3, № 4 додати 5 крапель розчину Фелінга і підігріти на киплячій бані 5 – 7 хв.

3.6. Результати дослідження занести до таблиці.

№	Фермент	Субстрат	Реакція з йодом	Реакція Фелінга
1.	Амілаза	Крохмаль		
2.	Сахароза	Крохмаль		
3.	Амілаза	Сахароза		
4.	Сахароза	Сахароза		

Завдання 4. Вплив активаторів та інгібіторів на активність ферментів

4.1. У три пробірки налити по 3 мл препарату амілази (розведена слина). У № 1 додати 2 краплі 1 % розчину NaCl, у № 2 – 2 краплі 1 % розчину CuSO₄, у № 3 – 2 краплі дистилляту.

4.2. До кожної пробірки додати по 5 крапель розчину 1 % крохмалю та поставити на водяну баню за 38°C на 10 хв.

4.3. Після зазначеного часу до вмісту кожної пробірки додати по 2 краплі розчину йоду. Спостерігати зміну забарвлення.

4.4. Результати занести до таблиці.

№	Субстрат	Фермент	Додана речовина	Реакція з йодом (колір)
1.	Крохмаль	Амілаза	NaCl	
2.	Крохмаль	Амілаза	CuSO ₄	
3.	Крохмаль	Амілаза	H ₂ O	

Завдання 5. Білки як протиотрута для іонів важких металів

5.1. У дві пробірки налити по 1 мл розчину амілази, 1 % розчину крохмалю, 1 % Pb(CH₃COO)₂.

5.2. У пробірку № 1 додати 1 мл молока (дослід), у № 2 – 1 мл води (контроль). Пробірки стряхнути і витримати 20 хв за температури 30 °С.

5.3. Після інкубації в обидві пробірки додати по 1 краплі 1% розчину йоду. В обох пробірках є іони Pb²⁺, які інактивують амілазу. Проте в присутності молока активність амілази зберігається, про що свідчить відсутність синього забарвлення при додаванні йоду.

Спостереження:

Спостереження:

Завдання 2. Виявлення ферментів класу оксидоредуктаз у молоці

2.1. У пробірку № 1 налити 5 крапель свіжого молока, у № 2 – 5 крапель кип'яченого молока.

2.2. В обидві пробірки додати по 3 краплі формальдегіду і по 3 краплі 0,1 %-го спиртового розчину метиленової сині.

2.3. Обидві пробірки нагріти на водяній бані за 70 °С. Спостерігати знебарвлення розчину метиленової сині лише в одній із пробірок. Пояснити отримані результати.

Спостереження:

Завдання 3. Виявлення тирозинази в картоплі

3.1. Очищений шматочок картоплі масою 3-4 г подрібнити і розтерти у фарфоровій ступці з 10 мл дистилляту. Відфільтрувати.

3.2. Відібрати у дві пробірки по 1 мл отриманого фільтрату. Пробірку № 1 прокип'ятити 1-2 хв, охолодити під струменем холодної води.

3.3. У обидві пробірки додати по 1 мл 0,1 % розчину тирозину, перемішати, поставити на водяну баню за 37 °С.

3.4. Пробірки періодично стряхувати для взаємодії з повітрям. Поступово в одній пробірці під дією тирозинази розчин темнішає за рахунок утворення продуктів окислення типу меланінів чорного кольору. У контрольній пробірці, в якій фермент інактивований нагріванням, колір рідини не змінюється.

Спостереження:

Висновок:

(підпис викладача)

Лабораторна робота № 10. Кількісне визначення активності ферментів

Матеріали дослідження: мука.

Реактиви: 1 % розчин NaCl; 0,2 н ацетатний буфер рН 5,5; 2 % розчин крохмалю; 1 н HCl; 0,3 % розчин йоду у 3 % розчині KI; 25 % розчин казеїну; 10 % розчин ТХО.

Посуд і обладнання: фарфорові ступки, пробірки, штативи, піпетки, бані з різною температурою, центрифуга, скляні палички, ФЕК, СФ.

Завдання 1. Отримання ферментного препарату амілази

1.1. Наважку муки в кількості 3 г розтерти з піском у фарфоровій ступці з 1% розчином NaCl (1:5) і гомогенат перенести в колбу.

1.2. Колбу з гомогенатом поставити на 1 – 1,5 год у холодильник; періодично перемішувати скляною паличкою для екстракції білків.

1.3. Після зазначеного терміну провести центрифугування розчину при 5000 об/хв протягом 10 хв.

1.4. Отриману прозору речовину (супернатант) використати як ферментний препарат для визначення амілазної активності.

Завдання 2. Кількісне визначення активності амілаз

2.1. У дві сухі пробірки (№ 1 – контроль, № 2 – дослід) внести по 2 мл 0,2 н ацетатного буферу рН 5,5 і по 2 мл 2 % розчину крохмалю. Суміш нагріти у водяній бані до 40°C.

2.2. У дослідну пробірку додати 1 мл ферментного препарату й перемішати. У контрольну пробірку налити 1 мл води.

2.3. Пробірки поставити в термостат за 40°C на 30 хв. За цей час крохмаль гідролізується під дією амілаз.

2.4. Після інкубації в кожну пробірку налити по 2 мл 1н розчину НСІ для припинення дії ферменту.

2.5. З кожної пробірки взяти по 0,5 мл суміші й додати в мірні колбочки на 50 мл, у які попередньо помістити 30 – 40 мл води, 1 мл 1 н НСІ і 5 крапель 0,3 % розчину йоду в 3 % розчині йодистого калію.

2.6. Колби довести до мітки водою, розмішати й поміряти інтенсивність забарвлення контрольної та дослідної проб на ФЕКу при довжині хвилі 600 – 650 нм проти ацетатного буферу.

2.7. Активність амілази визначити за формулою:

$$A = (E_k - E_d) \cdot C \cdot 15 \cdot 7 \cdot 50 / 3 \cdot 0,5,$$

де А – активність амілази;

Ек – оптична густина контрольного розчину;

Ед – оптична густина дослідного розчину;

С – кількість внесеного крохмалю в мг (2 мл 2% розчину крохмалю дорівнюють 40 мг).

Розрахунок:

Висновок:

(підпис викладача)

Контрольні запитання

1. Які Ви знаєте види амілаз, який механізм їх дії? Яку реакцію каталізує амілаза слини? Які продукти утворюються в результаті дії амілази слини на крохмаль? Які речовини є активаторами та інгібіторами амілази слини?
2. Що таке специфічність дії ферменту і які види специфічності Вам відомі? У чому полягає специфічність дії амілази й сахарози?
3. Чим зумовлена зміна активності ферменту при зміні рН середовища? Як визначити оптимум рН дії ферменту?
4. Чим можна пояснити залежність швидкості ферментативної реакції від температури?
5. У чому полягає відмінність між активним та алостеричним центрами ферменту?
6. Що називають активністю ферменту? Охарактеризуйте одиниці ферментативної активності.
7. Яке клінічне значення має визначення активності ферментів у біологічних рідинах?

Запитання для самостійного вивчення

1. Опишіть метали як кофактори ферментів.
2. Охарактеризуйте шляхи регуляції активності ферментів.
3. Розкрийте сучасні уявлення про механізм дії ферментів.
4. Охарактеризуйте фактори, що впливають на швидкість ферментативної реакції.
5. Опишіть види інгібування: зворотне і незворотне, конкурентне і неконкурентне.
6. Охарактеризуйте роль алостеричних ефектів у метаболізмі.
7. Опишіть клітинну компартменталізацію ферментів основних біохімічних процесів у клітині.
8. Що Ви вкладаєте в поняття “органоспецифічність ферментів”?
9. Що таке іммобілізовані ферменти та як їх викорис-товують у промисловості?

Лабораторна робота № 11. Якісне визначення вітамінів

Матеріали дослідження: розчини вітамінів В₁ (тіаміну), В₂ (рибофлавіну), В₆ (піридоксину), Р (рутину), РР (нікотинаміду), Е (токоферолу), витяжка лимону, сік картоплі або капусти, риб'ячий жир.

Реактиви: 5 % розчин $K_3Fe(CN)_6$; 30 % розчин NaOH; ізобутиловий спирт; 1 % сульфанілова кислота; 5 % $NaNO_3$; 10 % Na_2CO_3 ; 10 % CH_3COOH ; 5 % оцтовокислий купрум; концентрована HCl, H_2SO_4 , HNO_3 ; металічний цинк; 1 % та 5 % $FeCl_3$; 5 % $NaHSO_3$; 0,1 % I_2 ; 2,6-дихлорфеноліндофенол; хлороформ; 33 % хлороформний розчин стибію; бром; анілін.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, лійки.

Якісні реакції на водорозчинні вітаміни

Завдання 1. Реакція окислення вітаміну В₁ (тіаміну) в тіохром

1.1. До 1 мл розчину вітаміну В₁ (5 мкг) додати 2 мл 5 % розчину $K_3Fe(CN)_6$ і 1 мл 30% розчину NaOH, добре перемішати й проекстрагувати ізобутиловим спиртом. Пробірку нагріти.

1.2. Спостерігати в ультрафіолеті інтенсивно синню флуорисценцію ізобутилового екстракту тіохрому.

Завдання 2. Діазореакція на В₁ (тіамін)

2.1. До 5 крапель 1 % розчину сульфанілової кислоти додати 5 крапель 5 розчину $NaNO_3$. Отримують діазореактив.

2.2. До діазореактиву додати невелику кількість порошку тіаміну (на кінчику скляної палички) і 5 – 7 крапель 10 % розчину Na_2CO_3 .

2.3. Спостерігати забарвлення розчину в помаранчевий або червоний колір.

Завдання 3. Реакція відновлення вітаміну В₂ (рибофлавіну)

3.1. Налити в пробірку 1 мл 0,025 % розчину рибофлавіну й додати 0,5 мл концентрованої HCl, а також невеликий шматочок металічного цинку.

3.2. Спостерігати зміну забарвлення розчину з жовтого до червоного, рожевого, а потім безбарвного за рахунок водню, що виділяється з рибофлавіну.

Завдання 4. Феррихлоридна проба на вітамін В₆ (піридоксин)

4.1. До 5 крапель 5 % водного розчину піридоксину додати 1 краплю 5 % розчину ферум хлориду й стряхнути.

4.2. Спостерігати забарвлення рідини в червоний колір.

Завдання 5. Реакція на вітамін Р (рутин) із ферум хлоридом

5.1. До 10 крапель насиченого водного розчину рутину додати 2 – 3 краплі 1 % розчину ферум хлориду.

5.2. Спостерігати появу зеленого забарвлення.

Завдання 6. Реакція вітаміну РР із натрій гідросульфідом

6.1. У пробірку помістити 5 – 10 мг вітаміну РР й додати 1,5 мл 10 % розчину натрій бікарбонату.

6.2. Перемішати й додати 1,5 мл свіжоприготованого 5 % розчину натрій гідросульфіді.

6.3. Спостерігати появу жовтого забарвлення.

Завдання 7. Проба з міддю на нікотинову кислоту

7.1. Розчинити 10 мг нікотинової кислоти в 20 краплях 10 % ацетату під час нагрівання.

7.2. До нагрітого до кипіння розчину додати рівний об'єм 5 % розчину оцтовокислого купрум (II).

7.3. При поступовому охолодженні спостерігати появу синього осаду мідної солі нікотинової кислоти.

Завдання 8. Відновлення аскорбіною кислотою (вітамін С) молекулярного йоду

8.1. У 2 пробірки налити по 10 крапель дистилляту і по 1 – 2 краплі 0,1 % розчину J₂.

8.2. У першу пробірку додати 10 крапель дистилляту, у другу – 10 крапель витяжки лимону.

8.3. Спостерігати знебарвлення розчину йоду в пробірці з витяжкою лимону.

Завдання 9. Відновлення 2,6-дихлорфеноліндофенолу вітаміном С

9.1. До 2 – 3 крапель соку капусти або картоплі долити по краплях свіжоприготованого розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу.

9.2. Спостерігається знебарвлення розчину при наявності вітаміну С.

Досліджувана сполука	Реактиви	Спостереження	Пояснення
Вітамін В ₁			
Вітамін В ₂			

Вітамін В ₆			
Вітамін Р			
Вітамін РР			

Нікотинова кислота			
Вітамін С			

Якісні реакції на жиророзчинні вітаміни

Завдання 1. Реакція на ретинол (вітамін А) з концентрованою сульфатною кислотою (проба Друммонда)

1.1. У суху пробірку внести 1 краплю риб'ячого жиру й 5 крапель хлороформу, перемішати й додати 1 краплю концентрованої сульфатної кислоти.

1.2. Спостерігається забарвлення рідини в буро-червоний колір.

Завдання 2. Реакція вітаміну А зі стибій трихлористим

2.1. У суху пробірку помістити 1 краплю свіжого риб'ячого жиру або хлороформного розчину вітаміну А.

2.2. Додати 4 – 5 крапель 33 % хлороформного розчину стибію та перемішати.

2.3. Спостерігати появу інтенсивного синього кольору.

Завдання 3. Бромхлороформна проба на кальциферолі (вітамін D)

3.1. У суху пробірку внести 1 – 3 краплі риб'ячого жиру і 2 – 4 краплі розчину бром у хлороформі (1:60).

3.2. Спостерігати поступове забарвлення рідини в зеленувато-блакитний колір.

Завдання 4. Анілінова проба на кальциферол

4.1. У суху пробірку внести 1 краплю риб'ячого жиру й 5 крапель хлороформу, перемішати та додати 1 краплю анілінового реактиву (15 частин аніліну та 1 частину концентрованої HCl).

4.2. Під час нагрівання жовта емульсія набуває червоного забарвлення.

Завдання 5. Якісна реакція на вітамін E (токоферол)

5.1. У суху пробірку внести 5 крапель спиртового розчину вітаміну E, додати 0,5 мл 5 % розчину ферум хлориду й інтенсивно стряхнути.

5.2. Спостерігати поступову появу червоного забарвлення.

Досліджувана сполука	Реактиви	Спостереження	Пояснення
Вітамін А			

Вітамін D			
Вітамін E			

Висновок:

(підпис викладача)

Завдання 2. Кількісне визначення вітаміну С у сечі

2.1. У колбу внести 10 мл сечі та 10 мл дистильованої води, перемішати.

2.2. У колбу внести 20 крапель 10 % НСІ і титрувати 2,6-дихлорфеноліндофенолом до появи рожевого забарвлення.

2.3. Вирахувати вміст вітаміну С у 100 г капусти за формулою:

$$x = \frac{0,088 \cdot A \cdot B}{B}, \text{ де}$$

x – вміст вітаміну С, мг/добу;

A – кількість титранту, мл;

B – об'єм сечі, взятої для титрування, мл;

B – середньодобова кількість сечі (для чоловіків – 1500 мл, для жінок – 1200 мл).

У нормі кількість вітаміну С у сечі складає 2-30 мг/добу.

Розрахунок:

Завдання 3. Кількісне визначення рутину в чаї

3.1. У дві колби внести по 100 мг чаю (зеленого та чорного чаю), додати по 50 мл гарячої дистильованої води і залишити на 5 хв для екстракції.

3.2. До 10 мл екстракту чаю додати 10 мл дистильованої води і 5 крапель індигокарміну.

3.3. Титрувати 0,05 н KMnO_4 до появи жовтого забарвлення.

3.4. Розраховують відсотковий вміст рутину у чаї за формулою:

$$X = (3,2 \times A \times V_1 \times 100) / (V_2 \times P \times 1000), \text{ де}$$

X – вміст вітаміну Р у чаї, %;

3,2 – коефіцієнт перерахунку;

A – кількість титранту, мл;

V_1 – об'єм гарячої дистильованої води, мл;

V_1 – об'єм розчину, взятого для титрування, мл;

P – наважка чаю, мг.

3.5. Порівняти вміст рутину і зеленого та чорному чаї.

Розрахунок:

Висновок:

(підпис викладача)

Контрольні запитання

1. Наведіть приклади якісних реакцій на вітаміни. У чому полягає їх принцип?
2. Охарактеризуйте структуру, властивості та біологічну роль водорозчинних вітамінів.

3. Дайте загальну характеристику жиророзчинних вітамінів.

4. Перерахуйте причини, які призводять до авітамінозів, гіповітамінозів і гіпервітамінозів.

5. Які ознаки авітамінозів, викликаних відсутністю в їжі тіаміну, рибофлавіну, нікотинаміду, піридоксину? Яка хімічна природа цих вітамінів, до складу яких ферментів входить кожний з них?

6. На чому ґрунтується метод кількісного визначення вітаміну С і рутину?

Лабораторна робота № 13.

Визначення компонентного складу нуклеотидів

Матеріали дослідження: свіжі пекарські дріжджі.

Реактиви: 10 % розчин H_2SO_4 ; 30 % розчин $NaOH$; 7 % $CuSO_4$; концентрований NH_3 ; 5 % $AgNO_3$; дифеніламін; концентрована H_2SO_4 та CH_3COOH ; молібденовий реактив.

Посуд і обладнання: пробірки зі зворотним холодильником, штативи, водяна баня.

Завдання 1. Гідроліз нуклеопротейнів

1.1. У пробірку для гідролізу помістити 2,5 г дріжджів, долити 20 мл 10 % розчину H_2SO_4 , закрити корком зі зворотним холодильником і поставити на водяну баню. Гідроліз проводити при нагріванні протягом 1 год.

1.2. Гідролізат охолодити, профільтрувати й використовувати для визначення складових компонент нуклеотидів.

Завдання 2. Якісні реакції на складові компоненти нуклеотидів

Гідролізат об'ємом 1 мл нейтралізувати 10 % розчином $NaOH$ (до появи рожевого забарвлення за фенолфталеїном).

2.1. *Срібна проба на пуринові основи*

2.1.1. До 1 мл гідролізату додати 1 краплю концентрованого розчину NH_3 для нейтралізації, 5 крапель 5 % аміачного розчину $AgNO_3$ і залишити на 3 – 5 хв.

2.1.2. Спостерігати утворення крихкого осаду світло-коричневого (бурого) кольору, зумовленого появою срібних сполук пуринових основ.

2.2. *Проба Тромера на пентози*

2.2.1. До 0,5 мл нейтралізованого гідролізату додати 1 мл 30 % розчину NaOH і 1 – 3 краплі 7 % розчину CuSO_4 , до появи стійкого помутніння купрум(II) гідроксиду ($\text{Cu}(\text{OH})_2$).

2.2.2. Пробірку помістити на водяну баню та нагріти до появи осаду червоного або жовтого кольору внаслідок окислення пентози та відновлення $\text{Cu}(\text{OH})_2$ до Cu_2O .

2.3. *Якісна реакція на рибозу і дезоксирибозу з дифеніламіном (реакція Діше)*

2.3.1. До 1 мл гідролізату додати 1 мл дифеніламінового реактиву. Вміст пробірки перемішати і нагріти на водяній бані протягом 15 хв. Спостерігати зміну забарвлення.

2.4. *Молібденова проба на фосфатну кислоту*

2.4.1. До 0,5 мл гідролізату додати 1,5 мл молібденового реактиву і прокип'ятити. У присутності фосфатної кислоти рідина забарвлюється у лимонний колір. Під час охолодження пробірки під струменем холодної води випадає кристалічний осад комплексної сполуки фосфорно-молібденового амонію.

Отримані результати занести до таблиці:

Компонента нуклео-протеїну	Спостереження	Принцип реакції
Азотисті основи		

Лабораторна робота № 14. Кількісне визначення нуклеїнових кислот

Матеріали дослідження: розчин ДНК невідомої концентрації.

Реактиви: дифеніламіновий реактив; дистилат; розчин ДНК (10-100 мкг).

Посуд і обладнання: пробірки, піпетки, фотоелектроколориметр, водяна баня.

Завдання 1. Кількісне визначення ДНК колориметричним методом

1.1. У пробірку № 1 (дослідну) налити 1 мл розчину ДНК та 2 мл дифеніламінового реактиву. У пробірку № 2 (контрольну) додати 1 мл дистилату та 2 мл дифеніламінового реактиву.

1.2. Обидві пробірки помістити в киплячу водяну баню на 10 хв. Через зазначений термін пробірки вийняти, охолодити та виміряти інтенсивність забарвлення на ФЕК у порівнянні з контролем (світлофільтр червоний).

1.3. Знаючи оптичну густину дослідної проби, за калібрувальним графіком знаходять вміст у ній ДНК.

1.4. Побудова калібрувального графіка. У п'ять пробірок налити по 1 мл розчину ДНК різної концентрації (10, 25, 50, 75, 100 мкг/мл) і по 2 мл дифеніламінового реактиву.

1.5. Помістити пробірки на 10 хв у киплячу водяну баню і після цього виміряти оптичну густину кожного з розчинів. Результати колориметрії занести до таблиці.

1.6. Калібрувальний графік побудувати, відкладаючи на осі абсцис концентрації використаних розчинів ДНК, а на осі ординат – відповідні їм значення оптичної густини.

№ проби	Концентрація ДНК, мкг/мл	Показник ФЕК
1.	10	
2.	25	
3.	50	
4.	75	
5.	100	
6.	дослідна проба	

1.7. За допомогою калібрувального графіка знайти концентрацію ДНК у дослідній пробі.

Місце для вклеювання калібрувального графіка

Висновок:

_____ (підпис викладача)

Контрольні запитання

1. Назвіть риси подібності та відмінності структури молекул ДНК і РНК.
2. Назвіть відмінності між нуклеотидом і нуклеозидом.
3. Напишіть формули AMP, GMP, UMP, TMP, CMP, dAMP, dGMP, АТФ, цитидину, уридину, тимідину, аденозину, гуанозину.
4. Якими якісними реакціями можна визначити структурні компоненти нуклеотиду?
5. На чому ґрунтуються методи кількісного визначення нуклеїнових кислот?

Лабораторна робота № 15.

Якісні реакції на гормони

Матеріали дослідження: таблетки тиреоїдину або висушена тканина щитоподібної залози, 0,1% розчин адреналіну, розчин адреналіну (вміст ампули розчиняють у 100 мл H_2O), інсулін, естрон, концентрована H_2SO_4 .

Реактиви: 10 % NaOH; 10 % H_2SO_4 ; 1 % розчин крохмалю; 2 % та 10 % KJO_3 ; лакмус; 1 % $FeCl_3$; 10 % Na_2CO_3 ; 10 % CH_3COOH ; 1 % сульфонілова кислота; 5 % $NaNO_3$.

Посуд і обладнання: фарфорова ступка, пробірки, штативи, лійки, газова горілка, водяна баня.

Завдання 1. Якісні реакції на білково-пептидні гормони

Інсулін виявляють за допомогою якісних реакцій на білок. Для якісних реакцій використовують інсулін в ампулах і беруть для кожної реакції по 5 крапель.

Провести біуретову, нінгідринову, ксантопротеїнову реакції.

Спостереження:

Завдання 2. Якісні реакції на гормони – похідні амінокислот

1. Якісна реакція на гормони щитоподібної залози (тироксин)

1.1. У пробірку помістити кілька кристалів тиреоїдину, додати 10 крапель концентрованої HNO_3 і нагріти 3-5 хв у киплячій водяній бані.

1.2. Додати 20 крапель 1 % KJO_3 . Вміст пробірок перемішати й охолодити.

1.3. Додати 1 мл хлороформу, стряхнути і спостерігати зміну забарвлення.

Спостереження:

2. Якісні реакції на гормони мозкового шару наднирників (адреналін)

1. Реакція з $FeCl_3$

2.1.1. У пробірку додати 1 мл адреналіну.

2.1.2. Додати 1 краплю розчину $FeCl_3$ і розмішати. Спостерігати появу зеленого забарвлення.

2.1.3. Додати 1 краплю розчину лугу і спостерігати появу вишнево-червоного забарвлення.

Спостереження:

2. Реакція з KJO_3

2.2.1. До 0,5 мл розчину адреналіну додати 1 мл розчину KJO_3 , 10 крапель розчину CH_3COOH .

2.2.2. Суміш підігріти до температури 60 – 65°C. Спостерігати зміну забарвлення.

Спостереження:

1.6. Вміст пробірок перемішати й забарвлення досліджуваного розчину міряти на колориметрі у порівнянні з контролем, який містить 1 мл дистилляту, 4 мл розчину Na_2CO_3 і по 0,5 мл реактиву Фоліна.

1.7. Масову концентрацію адреналіну в досліджуваному розчині (мг/мл) розрахувати за формулою:

$$C_x = C_{ст} \cdot E_x / E_{ст},$$

де C_x – концентрація адреналіну, мг/мл;

$C_{ст}$ – масова концентрація адреналіну в стандартному розчині (0,04 мг/мл);

E_x – оптична густина дослідної проби;

$E_{ст}$ – оптична густина стандартної проби.

Розрахунок:

Висновок:

_____ (підпис викладача)

Контрольні запитання

1. Які речовини називаються гормонами?
2. На чому базуються існуючі класифікації гормонів?
3. Поясніть механізм дії гормонів.
4. Які якісні реакції на адреналін ви знаєте? Чим відрізняються ці реакції?
5. На чому базується метод кількісного визначення адреналіну?
6. Охарактеризуйте гормони стероїдної природи.
7. Охарактеризуйте гормони білково-пептидної природи.

Лабораторна робота № 17.
Визначення продуктів обміну білків

Матеріали дослідження: сеча.

Реактиви: панкреатин, 10 % NaNO_3 , 10 % HCl , NaBrO_3 , 5 % нітропрусид натрію, 10 % NaOH , 1 % спиртовий розчин I_2 , 15 % BaCl_2 , 5 % та 25 % T XO , 10 % FeCl_3 , насичений розчин CuSO_4 , хлороформ, концентрована HCl , H_2SO_4 , 2 % KMnO_4 .

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки.

Завдання 1. Розщеплення харчового білка пепсином

1.1. У дві пробірки внести по 1 мл 10 % розчину яєчного білка.

1.2. У контрольну пробірку внести 1 мл дистильованої води, у дослідну – 1 мл ферментного препарату. Пробірки поставити на 20 хв на водяну баню при 37 °С.

1.3. Після інкубації з вмістом пробірок провести біуретову реакцію.

1.4. За результатами спостережень сформулювати висновки.

Спостереження:

Завдання 2. Якісна реакція на сечовину

2.1. До 2 мл сечі додати таку ж кількість 10 % розчину NaNO_3 і 2-3 краплі 10 % розчину HCl . Спостерігати виділення вуглекислого натрію та азоту.

Спостереження:

Завдання 3. Якісна реакція на креатинін у сечі (реакція Вейля)

3.1. До 10 крапель сечі додати 2 краплі 5 % свіжо-приготованого розчину нітропрусиду натрію і 4 краплі 10 % розчину NaOH.

3.2. Спостерігати появу червоного забарвлення, яке при підкисленні оцтовою кислотою переходить у жовте.

Спостереження:

Завдання 4. Виявлення амонійних солей

4.1 До 2 мл сечі додати 1 мл насиченого розчину гідроксиду кальцію. Вміст пробірки перемішати.

4.2. До отвору пробірки, не торкаючись стінок пробірки, піднести смужку індикаторного паперу, попередньо змочену водою.

4.3. Спостерігати посиніння індикаторного паперу внаслідок виділення аміаку згідно реакції:



Завдання 5. Проба Розіна на жовчеві пігменти в сечі

5.1. У пробірку внести 5 мл сечі та обережно нашарувати 1 % спиртовий розчин йоду.

5.2. Спостерігати появу на межі двох рідин кільця зеленого кольору у випадку, якщо в сечі присутній білірубін.

Спостереження:

Завдання 6. Реакція Фуше на жовчеві пігменти в сечі

6.1. У пробірку налити 4 мл сечі і 2 мл 15 % розчину BaCl_2 , перемішати і відфільтрувати.

6.2. Фільтр з осадом перенести в чашку Петрі. На фільтр нанести 2-3 краплі реактиву Фуше (суміш 100 мл 25 % розчину ТХО і 10 мл 10 % розчину FeCl_3).

6.3. За наявності жовчевих пігментів (проба Фуше позитивна) на фільтрі з'являються синьо-зелені плями різної інтенсивності.

Спостереження:

Завдання 7. Проба Богомолова

7.1. Пробу проводять у прозорій сечі. Якщо сеча мутна, то її необхідно відфільтрувати.

7.2. У пробірку налити 10 мл сечі та додати 1 мл насиченого розчину сульфату міді. Якщо з'явиться помутніння, то додати 3-4 краплі концентрованої HCl для просвітління. Залишити на 5 хв.

7.3. Додати 2 мл хлороформу. Вміст пробірки перемішати і відстояти. У нижньому шарі знаходиться хлороформ, який за наявності великої кількості уробіліну забарвлюється в рожевий колір. При нормальному вмісті уробіліну в сечі проба негативна.

Спостереження:

Завдання 8. Якісна реакція на індикан

8.1. У пробірку налити 2 мл сечі та додати при перемішуванні рівний об'єм концентрованої H_2SO_4 .

8.2. Додати 3 краплі 2 % KMnO_4 і 2 мл хлороформу. Пробірку закрити корком і кілька разів перевернути, не стяхуючи.

8.3. Пробірку покласти у штатив і спостерігати за появою синього забарвлення нижнього хлороформного шару.

Запитання для самостійного вивчення

1. Як здійснюється гормональна регуляція білкового обміну?
2. Як здійснюється гормональна регуляція ліпідного обміну?
3. Які гормони беруть участь у регуляції вуглеводного обміну?
4. Опишіть рівні організації нейроендокринної системи.
5. Охарактеризуйте взаємодію гормонів між собою: синергізм, антагонізм.
6. Опишіть механізм внутрішньоклітинної рецепції.
7. Розкрийте роль аденілатциклази, цАМФ і цГМФ у гормональній регуляції.
8. Що таке тканинні гормони?
9. Що Ви вкладаєте у поняття гіпо- і гіперпродукція гормонів?

Лабораторна робота № 18.

Якісне та кількісне визначення сечової кислоти

Матеріали дослідження: сеча.

Реактиви: сечова кислота, концентрована HNO_3 , NH_3 , 10 % NaOH , 20 % Na_2CO_3 , 0,01 н $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, реактив Фоліна.

Посуд і обладнання: пробірки, піпетки, фотоелектроколориметр, водяна баня.

Завдання 1. Якісна реакція на сечову кислоту (мурексидна проба)

1.1. На предметне скло помістити незначну кількість (на кінчику шпателя) сечової кислоти і 1 краплю концентрованої HNO_3 .

1.2. Обережно випарувати на полум'ї горілки.

1.3. Спостерігати появу помаранчевої або бурої плями, яка під час змочування концентрованим NH_3 забарвлюється в пурпурово-червоний колір унаслідок утворення мурексиду.

1.4. Якщо замість аміаку додати краплю 10 % NaOH , то з'являється фіолетове забарвлення внаслідок утворення солей пурпурової кислоти.

Спостереження:

Завдання 2. Кількісне визначення вмісту сечової кислоти

2.1. До 1,5 мл сечі додати 1 мл 20 % розчину карбонату натрію і 1 мл фосфорно-вольфрамового реактиву Фоліна, перемішати.

2.2. Титрувати 0,01 н розчином $K_3[Fe(CN)_6]$ до зникнення синього забарвлення.

2.3. Для розрахунку вмісту сечової кислоти в сечі необхідно знати, яка кількість сечової кислоти відповідає 1 мл 0,01 н $K_3[Fe(CN)_6]$.

Наприклад, на титрування стандартної проби, де до 1,5 мл додали 1 мл 20 % Na_2CO_3 і 1 мл фосфорно-вольфрамового реактиву, який містить 0,5 мл сечової кислоти в 1 мл (або 0,75 мг в 1,5 мл), пішло 0,81 мл ферицианіду калію. Тоді 1 мл ферицианіду (X) дорівнює:

$$X = 0,75 / 0,81 = 0,8 \text{ мг сечової кислоти}$$

Розрахунок. Вміст сечової кислоти (в мг) у добовій сечі розраховують за формулою:

$$X = 0,8 \cdot a \cdot v / 10,5 \text{ мг/добу, де}$$

0,8 мг сечової кислоти відповідає 1 мл 0,01 н $K_3[Fe(CN)_6]$;

a – кількість 0,01 н $K_3[Fe(CN)_6]$, використаного на титрування, мл;

v – добовий діурез, мл.

Коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (ммоль/добу) дорівнює 0,0059.

Розрахунок:

Висновок:

_____ (підпис викладача)

Контрольні запитання

1. Опишіть механізм утворення сечової кислоти у людини.
2. Яка кількість сечової кислоти виділяється з сечею за добу в нормі?
3. Від яких факторів залежить рівень сечової кислоти у сечі?
4. При яких станах виникає гіпоурикорія та гіперурикорія?
5. На чому базується кількісне визначення вмісту сечової кислоти?

Запитання для самостійного вивчення

1. Охарактеризуйте значення ферментів нуклеаз, діестераз і фосфатаз у розщепленні полінуклеотидів.
2. Опишіть шляхи утилізації азотистих основ у організмі.
3. Опишіть походження атомів пуринового і піримідинового кільця.
4. Патологія обміну пуринових і піримідинових основ.

Лабораторна робота № 19.

Виявлення вуглеводів у продуктах харчування

Матеріали дослідження: молоко, мука, хліб, картопля, рис, кефір, печінка щура.

Реактиви: концентрована CH_3COOH ; Фелінгова рідина; 1 % розчин J_2 в 2 % розчині KJ ; реактив Селіванова; 10 % та 30

% NaOH; 7 % CuSO₄; 2 % NaOH; 5 % NaF; 0,04 M I₂; 5 % HCl; 0,05 M Na₂S₂O₃; 1 % розчин крохмалю, 5 % ТХО.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, фарфорові ступки, водяна баня.

Завдання 1. Виявлення лактози у молоці

1.1. Налити в пробірку 2 мл молока, додати 10 крапель ацетату для денатурації білка. Відфільтувати.

1.2. До фільтрату додати 2 мл Фелінгової рідини. Вміст пробірки перемішати і нагріти.

1.3. Спостерігати зміну забарвлення у верхній частині розчину.

Спостереження:

Завдання 2. Визначення концентрації лактози в молоці

1.1. У дві мірні колби внести по 5 мл розчину CuSO₄, по 5 мл розчину 2 % NaOH та по 2,5 мл розчину NaF. В одну з них (проба) додати 5 мл молока, в іншу (контроль) – 5 мл дистилляту, перемішати, долити дистиллят до об'єму 50 мл і через 30 хв відфільтувати. Потім у конічні колби перенести по 20 мл фільтрату проби й контролю, влити по 20 мл розчину йоду і, безперервно перемішуючи, додати по 10 мл розчину NaOH. Колби ретельно закрити, через 20 хв до їх вмісту додати по 10 мл розчину 5 % HCl, по три краплі розчину крохмалю й титрувати розчином Na₂S₂O₃ до зникнення забарвлення, яке утворилося внаслідок додавання крохмалю.

Масову концентрацію лактози в молоці, мг/мл, розраховують за формулою:

$$C = (A-B) \cdot f \cdot Q \cdot V_0 / V_1 \cdot V_2,$$

де

A і B – об'єм розчину натрій тіосульфату, витрачений на титрування проби та контролю;

f – коефіцієнт поправки на титр 0,05 моль/л розчину натрій тіосульфату (0,97);

Q – маса лактози (18,1 мг), еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину натрій тіосульфату;

V_0 – загальний об'єм проби;

V_1 і V_2 – об'єми фільтрату та молока, взяті для дослідження.

Розрахунок:

Завдання 3. Виявлення крохмалю у хлібі, картоплі, рисі

3.1. На шматочки білого хліба, сирі картоплі та рису нанести піпеткою 1 краплю 1 % розчину йоду в 2 % розчині КІ.

3.2. За появою характерного темно-синього забарвлення зробити висновок про наявність крохмалю у досліджуваних зразках.

Спостереження:

Завдання 4. Виявлення глікогену в печінці

4.1. 0,5 г печінки щура розтерти з 3 мл 5 % ТХО у фарфоровій ступці.

4.2. Додати 5 мл дистильованої води, перемішати та відфільтрувати.

4.3. З фільтратом провести реакцію Люголя.

4.4. За результатами спостережень сформулювати висновок.

Спостереження:

Завдання 5. Виявлення етанолу в кефірі

5.1. Відфільтрувати 2 мл кефіру.

5.2. Відібрати в пробірку 5 крапель фільтрату кефіру, додати по 5 крапель 10 % розчину NaOH, також кілька крапель

1 % розчину йоду в 2 % розчині КJ. У присутності етанолу рідина мутніє, спостерігається поява запаху йодоформу:



Спостереження:

Висновок:

_____ (підпис викладача)

Лабораторна робота № 20.

Кількісне визначення глюкози в крові

Матеріали дослідження: сеча, сироватка крові.

Реактиви: 10 ммоль/л глюкоза, буферний розчин, розчин ензимів.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, ФЕК.

Завдання 1. Виявлення глюкози у сечі

1.1. У ступці розтерти в тонкий порошок 1 г CuSO_4 і 10 г Na_2CO_3 .

1.2. На предметне скло насипати невелику кількість порошку і нанести кілька крапель сечі. Підігріти до кипіння. Синій колір означає, що глюкози немає, жовто-зелений – глюкози не більше 0,5 %, зелений – не більше 1 %, коричнево-червоний – до 2 %, інтенсивно червоний – більше 2 %.

Спостереження:

Завдання 2. Кількісне визначення глюкози глюкозооксидазним методом

2.1. У пробірку № 1 налити 0, 01 мл сироватки крові (дослідна проба), в пробірку № 2 – 0,01 мл калібрувального розчину глюкози (калібрувальна проба), в пробірку № 3 – фізіологічного розчину (контрольна проба).

2.2. У три пробірки додати по 0,5 мл буферного розчину і 0,5 мл стандартного розчину ензимів.

2.3. Вміст пробірок перемішати і витримати 20 хв за кімнатної температури або 12 хв за температури 37 °С.

2.4. Виміряти оптичну густину калібрувальної (Екал) та дослідної проби (Едосл) у порівнянні з контрольною.

2.5. Розрахувати кількість глюкози у сироватці крові за формулою:

$$C = 10,0 \cdot K \text{ (коеф. розведення)} \cdot \text{Едосл/Екал (ммоль/л)}$$

Розрахунок:

Завдання 3. Дослідження впливу інсуліну та адреналіну на вміст глюкози у плазмі крові

Для вивчення впливу гормонів на рівень глюкози у крові пропонується 3 дослідні проби плазми крові. Одна з них взята до введення гормонів, інша – після введення інсуліну, третя – після введення адреналіну.

3.1. Розрахувати вміст глюкози у кожній пробі, використовуючи глюкозооксидазний метод.

3.3. Заповніть таблицю.

Гормон	Місце синтезу	Хімічна природа	Вплив на обмін вуглеводів	Вплив на концентрацію глюкози у крові
Інсулін				
Адреналін				

Висновок:

(підпис викладача)

Лабораторна робота № 21.

Кількісне визначення піровиноградної кислоти у сечі

Матеріали дослідження: сеча.

Реактиви: 1 % 2,4-динітрофенілгідразин, спиртовий розчин КОН.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, ФЕК.

1.1. До 1 мл сечі додати 1 мл 2,5 % спиртового розчину КОН і через 1 хв - 0,5 мл 0,1 % 2,4-динітрофенілгідразину, перемішати.

1.2. Через 15 хв проби фотометрувати у порівнянні з контролем при довжині хвилі 400-415 нм на ФЕК.

Контрольна проба готується як дослідна, але замість сечі додати 1 мл води.

Стандартну пробу з 1 мл пірувату обробляють як дослідну і контрольну.

1.4. Розрахувати вміст ПВК у сечі за формулою:

$$X = (E_0 \cdot 50 \text{ мг/Ес}), \text{ де}$$

E_0 – екстинкція досліду,

E_c – екстинкція стандарту,

50 мг – концентрація стандарту піровиноградної кислоти,

X – концентрація пірувату в сечі.

Розрахунок:

Висновок:

(підпис викладача)

Контрольні запитання

1. Наведіть порівняльну характеристику крохмалю, глікогену й целюлози. Поясніть, чим зумовлені відмінності властивостей цих полісахаридів?
2. Поясніть, чим зумовлені редуруючі властивості лактози? Наведіть приклади редууючи вуглеводів.
3. Поясніть механізми підтримання постійного рівня глюкози у крові?
4. Яке діагностичне значення має визначення вмісту глюкози в крові? Чи завжди гіперглікемія свідчить про патологію в організмі? Поясніть відмінності між термінами “гіпоглікемія” та “гіперглікемія”.
5. Охарактеризуйте будову піруватдегідрогеназного комплексу.
6. Опишіть стадії окислювального декарбокسيلювання ПВК.
7. Яке значення реакцій окислювального декарбокسيلювання у організмі?
8. Опишіть роль і шляхи утилізації ацетил-КоА в організмі.
9. На чому базується реакція кількісного визначення ПВК?

Запитання для самостійного вивчення

1. Охарактеризуйте основні шляхи утилізації глюкози в організмі.
2. Що Ви вкладаете у поняття “гліколітична оксидоредукція”?
3. Розкрийте механізм фосфоролітичного розщеплення глікогену.
4. Опишіть біологічну роль ферменту глюкозо-6-фосфатази.
5. Охарактеризуйте біологічну роль циклу Корі (глюкозо-лактатного циклу).
6. Опишіть особливості обміну галактози та фруктози, біологічну роль цих моносахаридів для організму.
7. Охарактеризуйте роль інсуліну та інших гормонів у регуляції гомеостазу глюкози.

Лабораторна робота № 22. Вивчення властивостей жирів

Матеріали дослідження: рослинна олія, віск, вершкове масло.

Реактиви: спирт; ефір; ацетон; хлороформ; мило; жовч; яєчний білок; 1 % та 10 % Na_2CO_3 ; 50 % спиртовий розчин KOH ; концентрована HCl , H_2SO_4 ; 5 % розчин CaCl_2 ; кислий калій сульфат; бромна вода; 20 % розчин сахарози; фенолфталеїн.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, лійки, прилад для омилення, фільтрувальний папір.

Завдання 1. Розчинність жирів

- 1.1. У п'ять пробірок налити по 3 краплі (0,5 мл) олії.
- 1.2. Додати по 1 мл розчинника в пробірки: № 1 – води, № 2 – спирту, № 3 – ефіру, № 4 – ацетону, № 5 – хлороформу.
- 1.3. Усі пробірки струшувати протягом 1 хв.
- 1.4. Результати записати в таблицю.

Вода	Спирт	Ефір	Ацетон	Хлороформ

Завдання 2. Утворення емульсії

- 2.1. У п'ять пробірок налити по 3 краплі олії.
- 2.2. Додати по 1,5 мл у пробірки: № 1 – H_2O , № 2 – жовч, № 3 – 1 % розчин яєчного білка, № 4 – розчин мила, № 5 – 1 % розчин Na_2CO_3 .
- 2.3. Усі пробірки інтенсивно струшувати протягом 2 хв, потім поставити у штатив для відстоювання.
- 2.4. Через 5 хв спостерігати збереження емульсії.
- 2.5. Результати записати в таблицю.

H_2O	Жовч	Яєчний білок	Мило	Na_2CO_3

Завдання 3. Омилення жиру лугом

3.1. У пробірку ємністю 25 – 50 мл налити 0,5 мл олії, 10 мл 50 % спиртового розчину КОН.

3.2. Перемішати й кип'ятити зі зворотним холодильником 1 год.

3.3. Омилений розчин розвести водою до 20 мл. Розчин калієвого мила використовувати у подальших реакціях (завдання 4, 5).

Завдання 4. Утворення вільних жирних кислот

4.1. Налити в пробірку 5 мл калієвого мила та додати 1 мл концентрованої HCl.

4.2. Відфільтрувати утворений осад жирних кислот і промити його дистильованою водою до нейтральної реакції промивних вод на лакмус.

4.3. Перенести осад скляною паличкою в пробірку й розчинити його в ефірі.

4.4. До 1 мл ефірного розчину жирних кислот додати 1 мл спирту, який містить 1 краплю 10 % розчину соди й 2 – 3 краплі фенолфталеїну.

4.5. Записати результати зміни забарвлення.

Спостереження:

Завдання 5. Утворення нерозчинних кальцієвих мил

5.1. У пробірку налити 3 мл розчину калієвого мила й додати 1 мл 5 % розчину CaCl₂.

5.2. Записати результати спостереження.

Спостереження:

Завдання 6. Виявлення гліцероловмісних ліпідів (акролеїнова реакція)

6.1. У пробірку № 1 додати 2 – 3 краплі олії, у пробірку № 2 – шматочок воску.

6.2. В обидві пробірки додати 100 – 200 мг (кілька кристалів) кислого калій сульфату.

6.3. Ретельно перемішати й нагріти під тягою (обов'язково).

6.4. Утворення акролеїну визначають за неприємним запахом вмісту пробірок або за допомогою фільтрувального паперу, змоченого аміачним розчином срібла.

6.5. Результати записати й пояснити.

Спостереження:

Завдання 7. Виявлення ненасиченості ліпідів

7.1. У пробірку № 1 внести 1 мл розчину олії в хлороформі, у № 2 – 1 мл вершкового масла в хлороформі.

7.2. У кожену пробірку додати краплями бромну воду до знебарвлення.

7.3. Зафіксувати кількість бромної води, внесеної в кожену пробірку.

Спостереження:

Завдання 8. Виявлення холестеролу

8.1. Реакція Сальковського

8.1.1. У суху пробірку внести 1 мл хлороформного розчину холестеролу або рослинної олії та обережно по стінці додати 0,5 мл концентрованої H_2SO_4 .

8.1.2. На межі рідин спостерігати появу червоного кільця.

8.2. Реакція Лібермана-Бурхардта

8.2.1. У суху пробірку внести 1 мл 1 % розчину холестеролу або рослинної олії у хлороформі, 5 крапель оцтового ангідриду і нашарувати по стінці 2-3 краплі концентрованої H_2SO_4 .

8.2.2. Пробірку помістити на 20 хв у темне місце. Спостерігати появу синьо-зеленого забарвлення.

Реакція	Реактиви	Спостереження
Сальковського		
Лібермана-Бурхардта		

Завдання 9. Якісна реакція на жовчеві кислоти (реакція Петенкофера)

9.1. На суху чашку Петрі нанести дві краплі жовчі, дві краплі розчину сахарози й добре перемішати скляною паличкою.

9.2. Долити сім краплин концентрованої H_2SO_4 й знову перемішати скляною паличкою. Через кілька хвилин спостерігати утворення червоного забарвлення, яке з часом змінюється на червоно-фіолетове.

9.3. Записати результати спостережень.

Спостереження:

Висновок:

_____ (підпис викладача)

Лабораторна робота № 23. Визначення основних констант жиру

Матеріали дослідження: рослинна олія.

Реактиви: спирт; 0,1 % розчин фенолфталеїну; 0,1 н КОН; 0,5 н спиртовий розчин КОН; 0,5 н НСІ; 0,1 н спиртовий розчин J_2 ; 0,1 н та 0,01 н $Na_2S_2O_3$; хлороформ; ацетат; насичений розчин КJ; розчин крохмалю.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, бюретки, прилад для омилення жиру, водяна баня.

Завдання 1. Визначення кислотного числа

1.1. У чисту суху пробірку додати 0,5 мл олії і 2,5 мл попередньо нейтралізованого спирту. Перемішати протягом 5 хв для розчинення олії. Якщо олія розчиняється погано, суміш у колбі добре перемішати й слабо нагріти в гарячій воді при струшуванні.

1.2. Після розчинення жиру в колбу додати декілька крапель 1 % розчину фенолфталеїну.

1.3. Титрувати вміст колби 0,1 н водним розчином КОН до появи яскраво-рожевого забарвлення. Якщо для дослідження був узятий темнозабарвлений жир, у якому важко спостерігати появу рожевого забарвлення, замість фенолфталеїну взяти 1 % розчин тимолфталеїну й титрувати до появи синього забарвлення.

1.4. Величину кислотного числа вирахувати за формулою:

$$X = A \cdot 5,6 \cdot T / a,$$

де

A – кількість 0,1 н розчину КОН, яка пішла на титрування, мл;

T – поправка до титру КОН;

a – наважка олії, взята для аналізу.

1 мл 0,1 н розчину КОН відповідає 5,6 мг КОН.

Розрахунок:

Завдання 2. Визначення числа омилення

2.1. У пробірку № 1 додати 0,5 мл олії, в № 2 – 0,5 мл води.

2.2. В обидві пробірки додати 10 мл 0,5 н спиртового розчину КОН і кип'ятити на водяній бані зі зворотним холодильником 50 хв. Омилення вважається завершеним, коли рідина у пробірках стане прозорою.

2.3. В обидві пробірки додати 3 – 4 краплі 0,1 % розчину фенолфталеїну й титрувати 0,5 н розчином хлоридної кислоти до зміни забарвлення.

2.4. Розрахунки результатів провести за формулою:

$$C = (A - B) \cdot T \cdot 28,055 / a,$$

де C – число омилення;

A – кількість 0,5 н HCl, використаної на титрування контрольної проби (колба з водою), мл;

B – кількість 0,5 н HCl, витраченої на титрування дослідної проби, мл;

T – поправка до титру HCl;

a – наважка жиру, г.

1 мл 0,5 н розчину КОН відповідає 28,055 мг КОН.

Розрахунок:

Завдання 3. Визначення ефірного числа
Розрахунок:

Кількість гліцеролу:

Завдання 4. Визначення йодного числа

4.1. Пронумерувати дві пробірки: у пробірку № 1 додати наважку олії 0,5 мг (дослід), у № 2 – 0,5 мл води (контроль).

4.2. У обидві пробірки долити 10 мл 0,1 н спиртового розчину йоду, перемішати і залишити на 15 хв.

4.3. Через 15 хв вміст пробірок титрувати 0,1 н розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, спочатку до появи слабко-жовтого забарвлення, а потім, додаючи 1 мл 1 % розчину крохмалю, титрувати до зникнення синього забарвлення.

4.4. Розрахувати результати за формулою:

$$C = 1,0 \cdot (B-A) \cdot T \cdot 100 \cdot 12,69 / a \cdot 1000,$$

де С – йодне число;

В – кількість 0,1 н розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, яка пішла на титрування контролю, мл;

А – кількість 0,1 н розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, яка пішла на титрування проби, мл;

Т – коефіцієнт поправки на титр 0,1 н розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

а – наважка олії, г.

1 мл 0,1 н розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ відповідає 12,69 мг I_2 .

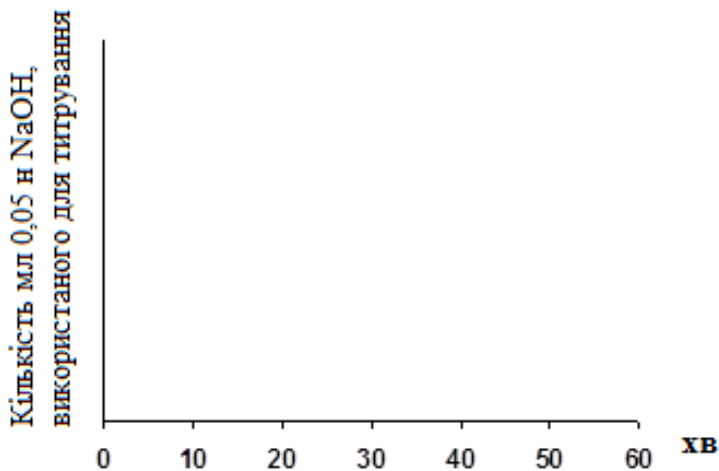
1.1. У дві пробірки внести по 5 мл молока і по 1 мл 5 % розчину панкреатину. У одну пробірку додати 1 мл води, а у другу – 1 мл жовчі. Вміст пробірок ретельно перемішати.

1.2. З кожної пробірки відібрати по 1 мл суміші у колбу, додати 1-2 краплі 0,5 % розчину фенолфталеїну та титрувати 0,05 н NaOH до появи слабко рожевого забарвлення, стійкого протягом 30 с.

1.3. Обидві пробірки поставити на водяну баню при 38°C. Через кожні 10 хв з пробірок відбирати по 1 мл суміші та титрувати 0,05 н NaOH у присутності фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення. Провести 6 визначень.

1.4. На основі отриманих даних побудувати дві криві, що відображатимуть процес гідролізу жиру за дії панкреатичної ліпази у часі та в залежності від наявності чи відсутності жовчі.

Спостереження:



Сформулювати висновки про умови роботи ліпази.

Лабораторна робота № 26. Виявлення кетонів тїл

Матеріали дослідження: сеча.

Реактиви: ацетон, 10 % NaOH, 1 % J₂ в 2 % KJ, 10 % FeCl₃, 10 % нітропрूसид натрію, концентрована CH₃COOH.

Посуд та обладнання: пробірки, штативи, лійки.

Завдання 1. Реакція на утворення йодоформу (проба Лібена)

1.1. У пробірку внести 10 крапель ацетону, 10 крапель 10 % розчину NaOH і кілька крапель розчину Люголя – 1 % розчину I₂ в 2 % розчині KI.

1.2. Спостерігати появу жовтого осаду йодоформу, який володіє характерним запахом:



1.3. Провести аналогічну реакцію з 2-3 мл сечі. При наявності ацетону в сечі спостерігається помутніння.

Спостереження:

Завдання 2. Реакція на ацетооцтову кислоту (реакція Герхарда)

2.1. В пробірку налити 1 мл сечі, додати 5-8 крапель 10 % FeCl₃.

2.2. Спостерігати появу вишнево-червоного забарвлення. Поступово забарвлення світлішає внаслідок самовільного декарбоксілювання ацетооцтової кислоти.

Спостереження:

Завдання 3. Проба Легалья на ацетон і ацетооцтову кислоту

3.1. В одну пробірку налити 10 крапель сечі, а в другу – 10 крапель ацетону. Додати 2 краплі свіжоприготованого розчину 10 % нітропрусиду натрію і 4 краплі 10 % розчину NaOH.

3.2. Спостерігати появу помаранчево-червого забарвлення.

3.3. Внести у пробірку 10 крапель концентрованого ацетату і спостерігати за зміною забарвлення. Спостереження порівняти.

Спостереження:

Висновок:

_____ (підпис викладача)

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте фізико-хімічні властивості ліпідів.
2. Опишіть принцип реакції утворення вільних жирних кислот.
3. На чому ґрунтується принцип реакції утворення нерозчинних кальцієвих мил?
4. Яка залежність між жирнокислотним складом і фізико-хімічними властивостями триацилгліцеролів?
5. З якою метою визначають основні константи жиру?
6. Що таке йодне та пероксидне число?
7. У чому полягає відмінність між кислотним числом і числом омилення?

8. Як визначити ефірне число жиру?
9. Як змінюються характеристики жиру при зміні агрегатного стану?
10. Охарактеризуйте холестерол та його ефіри. Напишіть формули.
11. Який принцип кількісного визначення холестеролу в сироватці крові?
12. Чому шкідливо вживати велику кількість тваринних жирів?
13. Опишіть біологічне значення холестеролу.
14. Охарактеризуйте етапи перетравлення та всмоктування ліпідів у організмі.
15. Особливості будови, функцій транспортних форм ліпідів.

Запитання для самостійного вивчення

1. Наведіть характеристику нейтральних жирів.
2. Охарактеризуйте воски, їх структуру та біологічну роль.
3. Охарактеризуйте жирні кислоти, наведіть їх класифікацію, властивості та роль у побудові природних ліпідів.
4. Які ліпіди називаються складними? Яка їх біологічна роль?
5. Які причини порушення ліпідного обміну Ви знаєте?
6. Порахуйте енергетичний баланс окислення триацилгліцеролів (на прикладі тристеарину).
7. Опишіть особливості перетравлення жирів у новонароджених і дітей раннього віку.
8. Охарактеризуйте обмін гліцеролу. Опишіть шляхи його синтезу та використання в організмі.
9. Назвіть кінцеві продукти окислення жирних кислот. Як відбувається їх утилізація в організмі?
10. Охарактеризуйте основні функції жирових депо організму. Особливості метаболізму в жировій тканині.
11. Охарактеризуйте біосинтез жирних кислот: локалізація процесу, будова мультиферментного комплексу синтази жирних кислот.
12. Опишіть шляхи використання ацетил-КоА: використання в ЦТК, у кетогенезі, в синтезі вищих жирних кислот.

Зміст

Передмова	3
Лабораторне заняття № 1. Вступ до біохімії.....	4
Лабораторна робота № 1. Якісні реакції на білки й амінокислоти.....	8
Лабораторна робота № 2. Визначення ізоелектричної точки білка.....	11
Лабораторна робота № 3. Виділення білків із біологічних рідин.....	12
Лабораторна робота № 4. Методи очищення білків.....	16
Лабораторна робота № 5. Кислотний гідроліз білків.....	17
Лабораторна робота № 6. Осадження білків.....	18
Лабораторна робота № 7. Кількісне визначення білків.....	25
Лабораторна робота № 8. Вивчення властивостей ферментів.....	29
Лабораторна робота № 9. Виявлення ферментів у продуктах харчування.....	33
Лабораторна робота № 10. Кількісне визначення активності ферментів.....	35
Лабораторна робота № 11. Якісне визначення вітамінів.....	38
Лабораторна робота № 12. Кількісне визначення вітамінів.....	45
Лабораторна робота № 13. Визначення компонентного складу нуклеотидів.....	49
Лабораторна робота № 14. Кількісне визначення нуклеїнових кислот	51
Лабораторна робота № 15. Якісні реакції на гормони.....	54
Лабораторна робота № 16. Кількісне визначення гормонів.....	56
Лабораторна робота № 17. Визначення продуктів обміну білків.....	59
Лабораторна робота № 18. Якісне та кількісне визначення сечової кислоти.....	63
Лабораторна робота № 19. Виявлення вуглеводів у продуктах харчування	67

Лабораторна робота №20. Кількісне визначення глюкози у крові.....	70
Лабораторна робота № 21. Кількісне визначення піровиноградної кислоти у сечі.....	73
Лабораторна робота № 22. Вивчення властивостей жирів.....	75
Лабораторна робота № 23. Визначення основних констант жиру.....	80
Лабораторна робота № 24. Ферментативний гідроліз жиру молока.....	83
Лабораторна робота № 25. Визначення загального холестеролу у сироватці крові.....	85
Лабораторна робота № 26. Виявлення кетонових тіл.....	86
Зміст.....	90

Навчально-методичне видання

Галина Петрівна **Копильчук**
Оксана Миколаївна **Волощук**

РОБОЧИЙ ЗОШИТ З БІОХІМІЇ

Відповідальний за випуск ***Копильчук Г.П.***

Комп'ютерний набір та верстка ***Волощук О.М.***