

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

А.А. АБЗАЛОВ, Н.А. АБЗАЛОВА

**Область знаний- Социальное обеспечение и здравоохранение –
500000**

Область образования- Здравоохранение - 510000

Учебное пособие

Лабораторные занятия по

**ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
РАСТЕНИЙ**

(модуль по биохимии лекарственных растений)

по предмету

Физиология и биохимия лекарственных растений

Для направлений образования бакалавриата
Профессиональное образование – 5111000 (Фармация –
5510500 (по видам))
Промышленная фармация – 5510600

Ташкент-2020

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

А.А. АБЗАЛОВ, Н.А. АБЗАЛОВА

**Область знаний- Социальное обеспечение и здравоохранение –
500000**

Область образования- Здравоохранение - 510000

Учебное пособие

Лабораторные занятия по

**ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
РАСТЕНИЙ**

(модуль по биохимии лекарственных растений)

по предмету

Физиология и биохимия лекарственных растений

Для направлений образования бакалавриата
Профессиональное образование – 5111000 (Фармация –
5510500 (по видам))

Промышленная фармация – 5510600

Ташкент-2020

Данное учебное пособие, которое называется лабораторные занятия по физиологии и биохимии лекарственных растений (по модулю биохимии растений), составленное по учебному плану, утвержденному за номером Министерством здравоохранения Республики Узбекистан от **10 марта 2014** года, предназначено для студентов направлений промышленной фармации, биотехнологии, метрологии и специального образования.

Данное учебное пособие составлено на основе типовой программы, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Узбекистан за номером **№БД-5510500-2.08 от 10.11. 2014 года**, соответствует типовой и рабочей программ, утвержденным протоколом **№12** Научного совета Ташкентского фармацевтического института от **5 июля 2017 года**.

Данное учебное пособие, подготовленное для студентов всех направлений по предмету "ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ" (модуль по биохимии лекарственных растений), составлено на основе типовой программы, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Узбекистан за номером **№БД-5510500-2.08 от 10.11. 2014 года**, соответствует типовой и рабочей программ, утвержденным протоколом **№12** ученого совета Ташкентского фармацевтического института 5 от июля 2020 года.

**Лабораторные занятия по ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ (модуль по биохимии лекарственных
растений) / Учебное пособие. Абзалов А.А., Абзалова Н.А .- Т,-2020**

Составители: Абзалов А.А.- профессор кафедры медико биологических предметов Ташкентского фармацевтического института.

Абзалова Н.А – старший преподаватель кафедры биотехнологии Ташкентского фармацевтического института.

Рецензенты: доцент кафедры медицины и фармакологии
Ташкентского фармацевтического института д.б.н.
Р.Т.Туляганов

Доцент кафедры физики и химии Ташкентского
государственного аграрного университета к.х.н.
С.Х.Зокиров

Аннотация

ДОРИВОР ЎСИМЛИКЛАР ФИЗИОЛОГИЯСИ ВА БИОКИМЁСИ
(Доривор ўсимликлар биокимёси модули бўйича) фанидан лаборатория
машғулоти

Ушбу ўқув қўлланмада оксиллар молекуласининг структураси, уларни ажратиш олиш, оксилларни тирик организмлардаги алмашинуви, уларни ўсимликларда *in vitro* ва *in vivo* шароитида синтезланиши ва эркин аминокислоталарининг миқдорини аниқлаш усуллари катта аҳамият берилган. Мазкур қўлланмада ферментлар, уларнинг тузилиши, фаоллиги ва уларнинг физик – кимёвий хусусиятларини ўрганиш масалалари ёритилган ҳамда умумий мой ва нуклеин кислоталари, нуклеотидлар, уларни тузилиши, хусусиятини ўрганиш масалалари ва лаборатория машғулоти ҳақида маълумотлар келтирилган.

Ўқув қўлланмада келтирилган лаборатория машғулотларини ўрганиш орқали талабалар ўсимликлар биокимёсига оид ва ўзларини соҳаларига зарур бўлган талайгина фойдали усулларни ўзлаштиришга эришадилар.

Аннотация

Лабораторные занятия по физиологии и биохимии лекарственных растений (модуль по биохимии лекарственных растений)

В данном учебном пособии приведены лабораторные работы о структуре, синтезе, обмене и выделении белковых веществ из растений, а также методика определения содержания аминокислот в тканях лекарственных растений.

В настоящей работе также освещены вопросы о ферментах, их строении, активности и их физико-химических свойствах.

Кроме этого в данной работе рассматриваются вопросы о лабораторных занятиях по определению содержания общего масла, нуклеиновых кислот, нуклеотидов, их строения, свойств и др.

Annotation

Practical lessons in molecular biology

In this training manual, laboratory works on the structure, synthesis, exchange and isolation of proteinaceous substances from plants, as well as a technique for determining the content of amino acids in the tissues of medicinal plants, are presented.

In the present work, questions about enzymes, their structure, activity and physicochemical properties are discussed.

In addition, in this paper, questions about practical exercises to determine the content of total oil, nucleic acids, nucleotides, their structure, properties, etc are considered.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Биохимия растений исследует белки, нуклеиновые кислоты и другие биополимеры, а также структуры, зависящие от них. Данное учебное пособие предназначено для магистрантов и бакалавров фармацевтического института по специальности технологии выращивания растений, а также студентов бакалавриата направлений Биотехнологии, Промышленной фармации специального образования.

Самыми важными и значительными из соединений, составляющих составную часть живых организмов, являются белки. Они выполняют решающую роль во всех процессах жизнедеятельности.

Белки также называются и протеинами (protos-по греческому первичное, важное).

Белки считаются составной частью каждого организма. В растениях их мало по сравнению с углеводами, маслами и другими веществами. Несмотря на это, они имеют большое значение в процессах обмена веществ, происходящих в растениях.

Все основные свойства, присущие жизненным процессам, встречаются в белках. Белки обладают ферментативной особенностью. Все химические процессы, происходящие в процессе обмена веществ, катализируются только под воздействием ферментов. Белки вместе с другими веществами, составляя структуру клетки и ее органоидов, участвуют в управлении свойством полупроницаемости клетки. Еще одним из особенностей, присущих белкам, является сокращаемость - упругость. Некоторые белки, например, актиновые и миозиновые белки, в составе мышц животных и растений мимозы, химическую энергию, накопленную в определенных соединениях, превращает в механическую энергию. Существуют также белки, выполняющие функцию защиты в живых организмах и обладающие несколькими особенностями. То, что белки выполняют разные функции, свидетельствует об их сложнейшем химическом строении. Во всех органах растений содержатся белки. Их особенно много в семенах бобовых растений, а в вегетативных органах - до 5-15%.

Белки являются высокомолекулярным коллоидным соединением и состоят из аминокислот. При гидролизе они расщепляются до аминокислот. Элементарный состав белков состоит из углерода, водорода, кислорода, азота, а также серы. В их составе иногда встречается и фосфор.

Азот, который содержится в белках, является постоянным, и в среднем составляет 16 %. Поэтому, белки, содержащиеся в проверяемых продукциях, например, в кормах и продовольствии, определяются по количеству азота в их составе. Для этого достаточно умножить количество азота в составе белков на 6.25, азот в составе 100 % белков равен 16%, а значит $100:16=6.25$. В составе некоторых белков встречаются также такие металлы, как йод, медь, марганец.

Белки, встречающиеся в природе, бывают разных видов, многие - коллоидными. По своему строению белки подразделяются несколько групп.

К ним например относятся альбумины, глобулины и др. Они отличаются друг от друга своими физико-химическими особенностями и своеобразностью аминокислотного состава. Сложные белки по группе простетиков, не являющихся белками и входящих в их состав, подразделяются на семь видов. Нуклеопротеиды - белки, содержащие ДНК и РНК, фосфопротеиды - белки, содержащие фосфорную кислоту, хромопротеиды—красящие вещества - пигменты, белки, содержащие гель флавин; гликопротеиды, белки, содержащие углеводы, липопротеиды - содержащие масла, металлопротеиды - содержащие металлы, сложные ферменты - содержащие витамины.

Расположение аминокислот ровно по порядку в полипептидной цепи называется первичной структурой белка. Эта структура держится при помощи крепкого пептидного узла. Первичная структура определяет разнообразие белков, то, к какому виду они относятся, их физико-химические свойства и последующие структуры.

Спирализация полипептидной цепи, т.е. образование (альфа) или (бета) витка- называется вторичной структурой белка. Данная структура укрепляется с помощью водородных связей. К глобулярным белкам относится (альфа)- сплетения, к фибриллярным белкам (бета)-сплетения.

Скрученная полипептидная цепь является слабым ионом, складывается, формируется при помощи связей Ван-дер-Ваальс. Формирование пространственных белков называется третичной структурой. При переходе белков в активное или неактивное состояние изменяется пространственное формирование третичной структуры. Некоторые белки состоят из нескольких полипептидных цепей. Каждая полипептидная цепь имеет свои первичную, вторичную и третичную структуры, которые называются протомерами. Несколько этих протомеров образуют единственный олигомер. Это четвертичная структура белка. В результате изменения пространственной конформации четвертичной структуры белка обеспечивается переход олигомерных белков в активное или неактивное состояние. Белки, находясь в коллоидном состоянии, проявляют амфотерные свойства. В результате диссоциации карбоксильных "COOH" и аминовых "NH₂" -групп белков в определенной рН среде они могут иметь "нейтральный" заряд. Белок с нейтральными зарядами не может двигаться в электрическом поле и по направлению к заряду "+". Значит, в определенной рН среде нейтральность заряда белковой молекулы называется состоянием изоэлектрической точки.

У такого белка теряется устойчивость и белок падает в осадок. При этом белок может потерять прежние физико-химические и биологические свойства.

Это зависит от природы воздействующего вещества. В результате таких изменений происходит распад структуры белка. Потеря физико-химических и биологических свойств белка в результате изменения его молекулы и структуры называется денатурацией белка. Денатурация, происходящая с глубокими изменениями, необратимая, при котором водорастворимость белка полностью теряется. При поверхностном изменении - белок,

перерастворяясь в воде, может восстановить свои прежние физико-химические и биологические свойства - денатурация бывает повторной.

Все качественные реакции, проводимые на белках или количественные измерения, основываются на выявление той или иной функциональной группы или на физико-химические свойства.

Как подчеркивалось, изучение биохимии растений приобретает важное теоретическое и практическое значение в повышении урожайности лекарственных растений и улучшении их качества путем управления значением белков, углеводов, липидов и других веществ, их физико-химическими свойствами и биосинтезом.

Лабораторное занятие № 1

Строение и свойства простых и сложных белков, их значение в сельском хозяйстве и лекарственном растениеводстве

Цель занятия:

1. Выделение общих белков из сельскохозяйственных культур и лекарственных растений.
2. Обсуждение с магистрами основ колориметрического и спектрофотометрического анализа.

Вопросы, направленные на определенную цель

Задание 1

1. Для выполнения практических работ необходимо прочитать соответствующую литературу.
2. Охарактеризуйте белки, которые встречаются в растениях, способы выделения белков и аминокислот, содержащихся в них. Классификация и свойства аминокислот, строение пептидов.
3. Уметь объяснять общее строение клетки, выделять компоненты клетки.

Задание 2

Для достижения цели студенту следует выполнять следующие работы:

1. Выделять общие белки из сельскохозяйственных и лекарственных растений.
Знать принцип работы фотоэлектроколориметра и спектрофотометра.
2. Определять количества белков в сельскохозяйственных и лекарственных растениях и по методу Лоури.

Задание 3

Для правильной оценки полученных результатов вам потребуются знания по другим предыдущим предметам (анатомия, цитология, физиология, морфология растений и другие):

1. Знать принципы работы на фотоколориметре и спектрофотометре.
2. Знать строения клетки.
3. Уметь выделять компоненты клетки.
4. Знать классификации и функции белков.
5. Знать способы отделения и очищения белков.

6. Знать общие свойства белков.
7. Знать строение молекул белков.
8. Знать строение уровней структуры молекул белков.
9. Знание строения аминокислот.

Вопросы для определения результатов полученных знаний

1. Чему учит биохимия растений, как она связана с другими предметами?
2. Строение клетки и ее состав.
3. Выделение компонентов белка.
4. Классификация и функции белков.
5. Способы выделения и очищения белков.
6. Общие свойства белков.
7. Состав белков, классификация аминокислот, их свойства.
8. Строение молекулы белка.
9. Уровни структуры молекулы белка - первичный, вторичный, третичный, четвертичный.
10. Протеины и протеиды.

Основные этапы определения

1. Знание принципов выделения общих белков из растений.
2. Выделение белков из лекарственных растений.

Выделение общих белков из растений

Для определения качества белков прежде всего следует выделить их в чистом виде. Одним из признаков, характеризующих биологическое значение белков, является их составная часть. Это можно увидеть в методах выделения и очистки белков.

Для выделения белков из растений используем метод Б.П. Плешкова (1985 г.).

Реактивы: растительный материал, жидкий азот, буфер бората (рН-10), 0,2 % ный раствор натрия бисульфата, октиловый спирт, 1% и 10% растворы уксусной кислоты, 0,2 % раствор едкого натрия, 50 % раствор трихлор ацетатной кислоты, ацетон, этиловый спирт, диэтиловый эфир.

Существуют различные методы выделения белков из органов растений. Для выделения белков из растительного материала, то есть из листьев, стеблей, плодов и других вегетативных органов александрийского дерева берут 50-100 г образца и замораживают в холодильнике или при помощи жидкого азота. Затем замороженный образец вместе с раствором буфера бората (рН- 10) в соотношении 1:4 намалывают в гомогенизаторе или в фарфоровой ступке до образования однородной массы.

В течение намалывания для повышения растворимости белков вливается немного 0,2% ного раствора натрия бисульфата и для предотвращения пенообразования - 3-4 капли октилового спирта.

Образовавшийся гомогенат замораживают в холодильнике, затем размораживают и в течение 1-2 часа взбалтывают с помощью качающего

прибора (встряхивател). По истечении времени центрифугируется со скоростью 3000 оборотов в минуту в течение 10-15 минут. Раствор вливают в измерительную колбу до объема 500 мл. А осадок экстрагируют еще 5-6 раз буферным раствором в малом объеме. Каждый раз гомогенат центрифугируется, растворы вливаются в измерительную колбу. Общий объем экстракта дистиллированной водой наполняется до отметки. Количество азота, перешедшее в раствор, должно составлять 90-95% общего азота в составе растения. Для определения белка из раствора берется 20 мл и определяется количество азота по Кьелдалю, этим непосредственно определяется общий азот в исследуемом растительном материале. А для оседания белков, перешедших в раствор, раствор вливается в стакан с объемом в 1000 мл и с помощью 10 % ного раствора уксусной кислоты рН приводится к 4,4-4,5. Раствор определяется рН бумажным индикатором. Если среда станет кислотным, то с помощью щелочи ее рН можно привести к 4,4-4,5. стакан с раствором нагревают в водяной бане до 70°C и осевшие белки, центрифугируя, выделяют. Осевшие белки смываются уксусной кислотой. Для этого в пробирку центрифугируют 1% ным раствором уксусной кислоты и осадок смешивают, центрифугируют и отливают жидкость над осадком.

Чтобы выделить белки еще чище, им дают переоседать. Для этого пробирку центрифуги промывают 0,2 N раствором едкого натрия и их также добавляют в жидкость в стакане. Жидкость в стакане в водяной бане смешивают до полного растворения 50% белков. Не растворившиеся частицы отделяются путем центрифугирования. Чтобы белки переоседали, в стакан с белковым раствором берут 50% ной трихлор уксусной кислоты и добавляют до конца, до получения концентрации 5% ного раствора. При этом белки, которые осели, промывают в пробирке центрифуги ацетоном (5-6 раз), теплым этиловым спиртом (1-2 раза) и эфиром (2-3 раза) (при центрифугировании эфиром крышка центрифуги должна быть открытой). Каждый раз после центрифугирования жидкость над осадком выливают. Белковые препараты, полученные этим путем, сушат и хранят при комнатной температуре в вакуумном эксикаторе. Общий азот в составе белковых препаратов определили по методу Кьелдаля. Полученные белковые препараты являются белым или светло-серым порошком, который содержит 14-16% азота.

Определение количества свободных аминокислот методом хроматографии на бумаге (по Г.Н.Зайцевой и Н.П.Тюленевой)

Исследования проводились на опытных участках с типичным сероземом Ташкентского фармацевтического института и Ташкентского фармацевтического института. Исследования выполнялись в 4 повторностях. Количество свободных аминокислот в листьях растений определялись нижеуказанным методом Г.Н.Зайцевой и Н.П.Тюленевой (1958). Для этого листья растений фиксируются в этиловом спирте. Как утверждают эти авторы, растительный материал можно фиксировать и в водяном паре, а

затем сушить на воздухе. После этого берется экстракт из растительного материала, постепенно добавляя 80% ный раствор этанола, и при помощи насоса Комовского пропускается через стеклянный фильтр за номером 3. Полученный раствор с помощью раствора смеси хлороформа и воды в соотношении 3:0,5 очищается от липидов, белков и пигментов. Очищенный раствор сушат в фарфоровой чашке на воздухе. Высушенный остаток сжижают в 10% ном (1 мл) растворе изопропилового спирта, приготовленного в 0,05 % ном растворе соляной кислоты. Полученный раствор накапывают с помощью калиброванного капилляра на хроматографическую бумагу. Диаметр капли должен составлять 3-4 мм. При этом на хроматографическую бумагу накапывают только 0,10-0.15 мл приготовленного в 1 мл раствора. Вкапывание раствора на хроматографическую бумагу осуществляют в специальном приборе, произведенном в Республике Венгрия для хроматографических и электрофорезных работ. Данный стол оборудован феном (электрическая плита+ вентилятор и электрические лампы). В исследованиях используется хроматографическая бумага Schleier und Schuhl, изготовленная в Германии или хроматографических бумаг других марок (хроматографическая бумага, на которой медленно движется раствор) Разделение аминокислот растений, которые в смешанном виде в составе капли, находятся на хроматографической бумаге, осуществляют в специальных камерах, изготовленных на заводе "Дружная горка" Российской Федерации.

При разделении аминокислот друг от друга по качеству используют восходящий хроматографический метод. При этом используется смесь Н-бутилового спирта, замороженной уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:5. Для четкого разделения аминокислот друг от друга смесь вышеуказанных растворов 3 раза выгоняют через хроматографическую бумагу. После полной выгонки растворов в составе смеси каждый раз сушат в воздухе при комнатной температуре. Затем хроматографические бумаги пропускают через смесь 0,4% ного нингидрина с уксусной кислотой (1%), приготовленной в ацетоне. В результате каждое аминокислотное пятно в хроматорамме под воздействием нингидрина приобретает синевато-розовый оттенок. Каждое цветное пятно данных аминокислот по отдельности растворяют в растворах 0,005% ного медного купороса с объемом 5 мл, приготовленного в 75 % ном этаноле (элюат).

Затем оптическая плотность в сульфате меди раствора каждой аминокислоты, влитой в кюветы с толщиной в 10 мм, определяется через синий светофильтр (ФЕК-56М) фотоэлектроколориметра. Rf величины растительных аминокислот определяются с помощью стандартных растворов. В хроматограммах аминокислоты могут расположиться в следующем порядке:

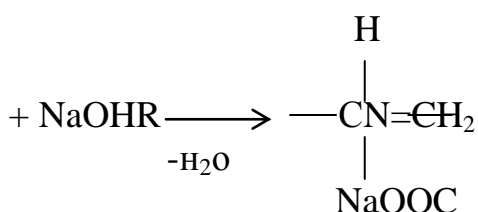
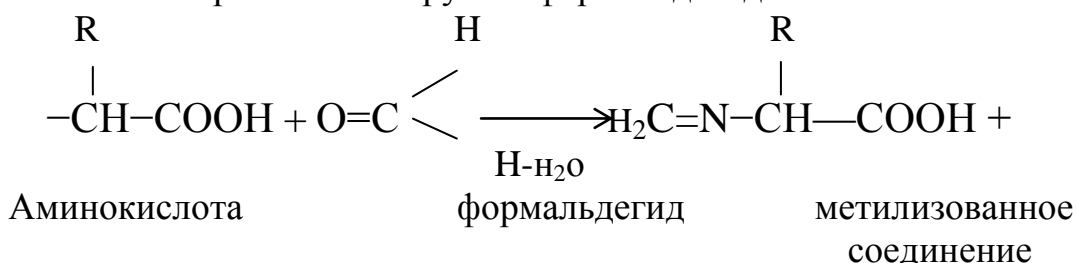
1. Лизин
2. Аргинин
3. Цистеин +гистидин
4. Аспарагин кислотаси +Аспарагин

5. Серин
6. Глутамин кислотаси
7. Глутамин
8. Треонин
9. Цистин +аланин
10. Валин +метионин
11. Триптофан
12. Лейцин

Зачастую 18 аминокислот, выявляющиеся в исследованиях, могут образовать 12 пятен, так как выделяется цистеин с гистидином, аспарагиновая кислота + аспарагин, цистин + аланин, валин + метионин.

Определение количества аминокислот с помощью формальдегида (метод Сёрнсена)

Аминокислоты, вступая в реакцию с формальдегидом, образуют метилизованные соединения. При этом взаимодействуют аминная группа аминокислот и карбонильная группа формальдегида.



В результате этой реакции аминная группа теряет свое щелочное свойство, а карбоксильная группа остается открытой. В связи с этим метилизованное соединение приобретает кислотное свойство. Карбоксильную группу в соединении можно титровать щелочью. Количество щелочи, израсходованное для титрования, бывает эквивалентным количеству аминной группы, связанной с формальдегидом.

Порядок работы:

Берут 5 граммов прорастающего соевого растения и тщательно намалывают в ступке с помощью измельченного стекла с 5-10 мл водой. Смесь в ступке через фильтр переливают в колбу с объемом в 50 мл. В ступке с помощью 5-10 мл воды 2-3 раза промывают и через фильтр

вливают в колбу. После того, как раствор полностью фильтровали, в колбу до краев вливают дистиллированную воду.

Берут два объёмом стакана по 50 мл, в первый стакан вливают 20 мл кипяченой охлажденной воды, а во вторую - 20 мл исследуемого раствора. В оба стакана добавляют по 10 мл формальной смеси, сверху добавляют в избытке количество 0,2 N NaOH раствора (до образования темно-красного, фиолетового цвета). Затем лишняя щелочь в обеих колбах титруется при помощи раствора 0,2 N HCl до получения светло-розового цвета. Рассчитав количества израсходованных растворов NaOH и HCl, определяется количество азота аминной группы.

Например, для контроля добавляют всего 5 мл NaOH с 0,2 N. Для титрования расходуется 4,5 мл 0,2 N HCl, значит их разница NaOH с 5-4,5=0,5 мл 0,2 N.

А для опыта добавляют 9 мл 0,2 N NaOH, для его титрования расходуется 1,5 мл 0,2 N HCl. Значит, количество израсходованного для опыта NaOH с 0,2 N равно к 9-1,5=7,5 мл 0,2 N NaOH. Разница между опытом и контролем равна к 7,5-0,5=7 мл 0,2 N NaOH.

Известно, что 14 мг количеству азота в нормальном 1 мл растворе NaOH или раствору 1 мл 0,2 N NaOH равен 2,8 мг азота.

$$7,0 * 2,8 = 19,60 \text{ мг}$$

От полученных первичных сведений процентный расчет будет следующим:

$$\frac{19,60 - 50 - 10}{20 - 5 \cdot 100} = 0,98\%$$

Здесь:

50 мл- общий объем фильтрата.

20 мл- количество фильтрата, взятое для титрования,

5 г- количество полученных первичных материалов,

Реактивы:

5 дневная прорастающая соя, раствор 0,2 N NaOH, раствор 0,2 N HCl, формальная смесь (к 500 мл 40 % ному формалину добавляется 1 мл фенолфталеина. В смесь до получения светло-розового цвета добавляют 0,2 N HCl.)

Вопросы для подготовки ко 2-занятию

1. Простые и сложные белки, разница между ними и их значение.
2. Антитела и антигены, их значение.
3. Гибридомы, их значение.
4. Усвоение растениями молекулярного азота.
5. Усвоение растениями нитратов.
6. Реакции усвоения аммиака.
7. Обмен некоторых аминокислот, их значение.
8. Хлорофилл, его значение.
9. Хромопротеиды, их значение.
10. Глюкопротеиды, их значение.

Лабораторное занятие № 2

Методы определения содержания азотных соединений (по Б.П.Плешкову)

Определение количества общего азота.

Общее количество азота в растениях определяется по методу микро Кьелдаля следующим образом. Для этого растительные материалы (содержащие 5-10 мг азота) переносят в Кьельда левую колбу с объемом 50-100 мл и вливают в нее 5 мл серной кислоты с удельным весом 1,84. Для ускорения процесса сжижения в колбу кладут катализатор.

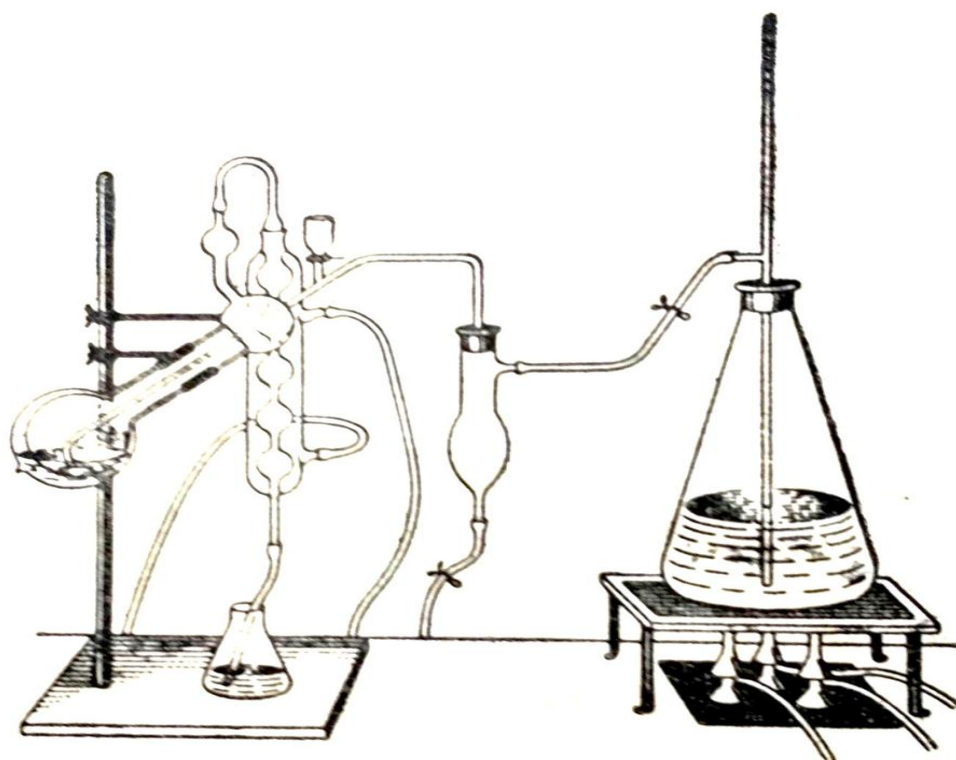
Использование в качестве катализатора смеси $K_2SO_4: CuSO_4: Se$ (100:10:1) (0,5г) дает хороший результат. В качестве катализатора можно также использовать только металл селен (0,05г). После добавления катализатора смесь в колбе нагревают до кипячения. Затем раствор кипятят в медленном огне до полного обесцвечивания.

После окончания процесса сжижения колба охлаждается, в нее вливают немного воды и смесь переливают в колбу с объемом в 50 или 100 мл. Объем раствора в колбе дополняют дистиллированной водой до отметки 50 мл или 100 мл.

Затем, как показано на рисунке 1, на аппарате Кьелдаля приступают к отгонке аммиака. Аппарат Кьелдаля состоит из парообразователя, Кьелдалевой колбы, холодильника и приёмника. На дно колбы проведена трубка с несколько изогнутым вниз концом, через которую в колбу вливают щелочный раствор.

При отгонке аммиака из мерной колбы берут 10 мл раствора и вливают в Кьелдалеву колбу. Затем в приёмник аппарата вливают 10 мл 2 % ного раствора борной кислоты. В этой борной кислоте содержится 10мл\л индикатора Конвеи. Этот реактив готовится следующим образом:

20 мг борной кислоты растворяется в смеси 200 мл спирта - 700мл воды. Этому раствору добавляют 10 мл смешанного индикатора, растворенного из 0,033 г зеленого бромкрезола и 0,066 г метилрота в 100 мл абсолютном спирте. После смешивания борной кислоты с индикатором в эту смесь добавляют несколько капель натриевой щелочи с 0,05 Н до приобретения раствором слабо-розового цвета. После приготовления приёмника в Кьелдалеву колбу вливают 5 мл 30-40% ной натриевой щелочи и пускается пар из заранее нагретого парообразовательного прибора. После этого выделяется аммиак и переходит в приёмник.



1-рисунок. Определение количества общего азота по методу микрокьелдаля

Отгонка аммиака продолжается 15-20 минут. После завершения отгонки аммиака приёмник отделяется от аппарата Кьелдаля и раствор в приёмнике титруется 0,01 Н серной кислотой в микробюретке. Каждый миллилитр 0,01 Н раствора серной кислоты прикрепляет к себе 0,14 мг азота. При расчете полученных результатов число миллилитров израсходованной серной кислоты умножают к вышеприведенному коэффициенту, то есть к 0,14 и таким образом можно определить, сколько азота содержится в растворе:

$$X = \frac{(a \times t \times 0.14 \times 100 \times 100)}{(H \cdot 10)}$$

Здесь: X-количество азота в процентах.

a-число миллилитров серной кислоты с 01 Н, израсходованное для титрования.

t- «Поправка» к титру серной кислоты с 0,01.

100-коэффициент для перевода на проценты;

H-образец растения в абсолютно сухой массе в мг.

Определение количества белкового азота

Часто при определении количества белкового азота используют метод осаждения белка. Затем по методу Кьелдаля осадок сжигают серной кислотой и определяют количество азота.

Порядок работы: Хорошо измельченные растительные материалы, в которых содержится 3-5 мг белка, переносят в стакан с объемом 100 мл и добавляют в них 25 мл воды, затем, смешивая стеклянной палочкой, нагревают до кипения. После кратковременного нагревания белки падают в осадок в 5% ном растворе трихлоруксусной кислоты. Для этого в стакан, одновременно смешивая раствор, добавляют 5 мл 50 % ного раствора трихлоруксусной кислоты. Через 30-40 минут раствор в стакане фильтровали через ослабленный обеззоленной фильтровальной бумаги, стакан и осадок на фильтровальной бумаге несколько раз промыли 2 % ным раствором трихлоруксусной кислоты. После окончания фильтрования фильтровальную бумагу с воронкой ставят на термостат и сушат в течение 1-2 часов при температуре 50-60°C. После высыхания фильтровальная бумага отделяют от воронки, затем вместе с осадком переносят в Кьелдалеву колбу, туда добавляют 5-7 мл концентрированной серной кислоты и катализатор, и потом сжигают. И при этом отгонка аммиака и определение количества белкового азота выполняется как при определении количества общего азота. Количество белкового азота устанавливается относительно сухой массы в процентах.

Определение количества аммиачного азота

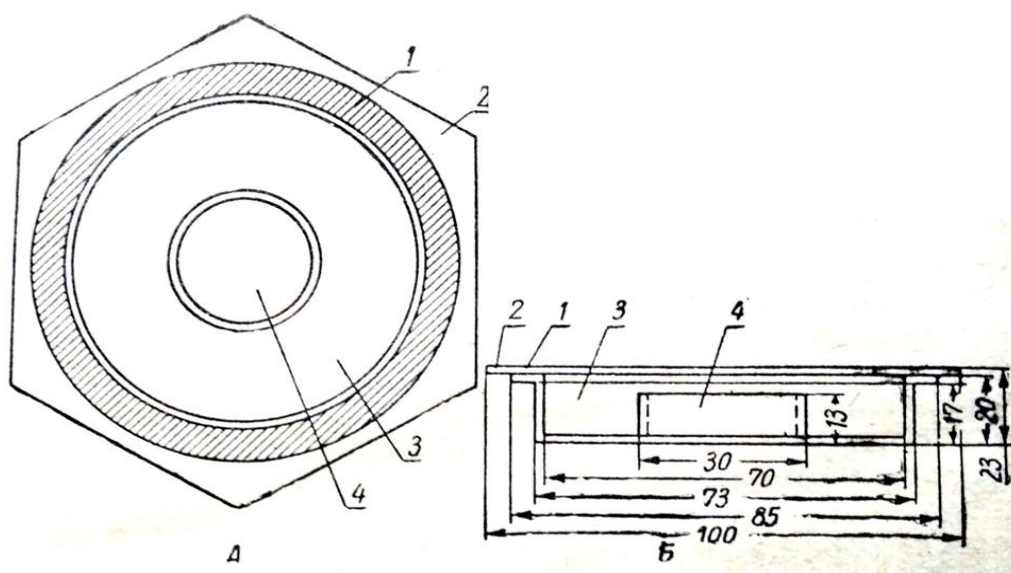
Количество азота, не входившего в состав белка, в семенах многих растений составляет 5-15% общего азота, в листьях - 10-30%, в корнеплодах и клубнях картофеля - до 50%.

Аммиачный азот считается первичным и последним азотным соединением в обмене азотных соединений в растениях.

Аммиачный азот в растениях встречается в очень малом количестве, обычно он, то есть аммиачный азот встречается в форме соли органических кислот.

Аммиачный азот является одной из самых подвижных и изменчивых азотных фракций в растениях. Поэтому аммиачный азот следует определять в свежесобранном растительном материале.

Аммиак обычно определяют из фильтрата после осаждения белковых веществ или в водном выделении тщательно измельченного растительного материала. Аммиак в растворе отгоняют в среде со слабощелочной реакцией в условиях низких температур. При отгонке аммиака таким способом не гидролизуются амид и аммиачный азот. При отгонке аммиака его количество определяется путем титрования или колориметрирования. Зачастую количество аммиака определяют микродиффузионным методом. Принцип метода. Аммиак, выделяемый при хранении в слабощелочных условиях фильтрата, последующего после оседания белковых веществ раствора, исследуемого в закрытой сверху посуде, удерживается с помощью титрованной кислоты. При этом реакция происходят в стеклянных чашках Конвеи которые состоят из двух отделов.



2 –Рисунок. Чашка Конвеи

А. Вид сверху.

Б. Поперечный разрез.

1. Площадь шлифа чашки

2. Крышка

3. Внешний отдел чашки

4. Внутренний отдел чашки

Аммиак, выделяемый при хранении в слабощелочных условиях фильтрата, последующего после оседания белковых веществ, величина которых измеряется в мм, удерживается с помощью титрированной кислоты. При этом реакция проводится в стеклянной чашке Конвеи, обладающей двумя отделами.

Порядок работы: во внешний отдел чашки Конвеи добавляют 5-10мл исследуемого раствора (2-рисунок). А во второй отдел чашки с помощью микробюретки вливают 1 мл серной кислоты с 0,01 Н. В растворы обоих отделов добавляют 3-5 капель смешанного индикатора. При этом растворы отделов приобретают красный цвет. Шлифы чашки закрывают крышкой, смазанной вазелином. При этом в крышке оставались открытые щели, через которые во внешний отдел чашки вливали 1 мл насыщенного раствора «поташа» и чашку немедленно закрывают крышкой. В результате этого из-за усиления щелочности раствора внешнего отдела чашки Конвеи раствор приобретает зеленый оттенок. С целью вместить раствор в чашку и для усиления поглощения аммиака чашку медленно вертят на столе и оставляют до конца реакции. Срок такого покоя чашки зависит от количества аммиака в исследуемом растворе и температуры, которые находят посредством опыта. Например, чашка в комнатной температуре оставляется до утра, а в термостате с температурой 35-40° С – на 1,5-2 часа. Как только титруемой кислотой поглощается выделяемый аммиак и заканчивается реакция во

внутреннем отделе, не использованная кислота при помощи микробюретки титруется с натриевой щелочью с 0,01 Н до становления розового цвета сначала фиолетовым, а затем темно-зеленым. Учет результатов осуществляется при помощи следующего уравнения:

$$X = \frac{(a \times v \times 0.14 \times 100)}{H}$$

Здесь:

X-количество аммиачного азота в процентах

a-количество серной кислоты с 0,01 Н в мл, израсходованной для связывания аммиака;

100- коэффициент, применяемый для перевода на проценты;

0,14-количество аммиачного азота, поглощенного израсходованной для связывания аммиака серной кислотой, мл 0,01, в мл;

H-количество навески в мг для определения аммиака

Определение количества нитратного азота колориметрическим методом с применением дисульфифеноловой кислоты

Обычно растения содержат мало нитратов. Нитраты уже в корнях восстанавливаются до аммиака. При замедлении редукции нитратов и резком повышении питания нитратами в тканях растений может повышаться количество нитратного азота. С помощью воды можно полностью отделить нитраты от растений. Поэтому от свежесобранных живых растительных органов или высушенных в воздухе растительных материалов нитраты можно отделить в их водных выделениях. Учитывая высокую подвижность нитратного азота в растениях, количество нитратов в полученных от растений образцах определяется в тот же день, когда собран растительный материал.

Для определения нитратного азота в растениях зачастую используют колориметрический метод, который протекает с применением дисульфифеноловой кислоты. Данный способ основан на образовании нитрофенольных соединений, которые в результате взаимодействия с дисульфифенольной кислотой нитратов в нейтральной или слабощелочной среде, дают зеленовато-желтый цвет. Интенсивность цвета определяет количество нитратного азота в исследуемом растворе.

ПОРЯДОК РАБОТЫ: Из материалов сухой массы растения берут 50 мг и для полного высыхания выделения водной вытяжки переносят в фарфоровую чашку. Если в исследованиях используются водные экстракты, не очищенные от органических веществ, выделения вытяжки, предварительно для полного расщепления органических веществ, хранят в 30 % ном растворе перекиси водорода. Осадок в фарфоровой чашке охлаждают и увлажняют 1 мл раствором дисульфифенольной кислоты. Данный осадок полностью растворяют, перемешивая стеклянной палочкой. После растворения осадка спустя 5-10 минут в чашку вливают 5-10мл воды и нейтрализуют 10% ной щелочью (NaOH или KOH). При этом реакция среды определяется лакмусовой бумагой. Раствор в чашке переливают в

мерную колбу с объемом 100мл и колориметруют под воздействием голубого светофильтра фотоэлектроколориметра. Количество нитратов в исследованном растворе определяют, пользуясь данными калибровочной кривой, на фотоэлектроколориметре. В калибровочной кривой используются стандартные растворы нитратного азота от 0,1 до 5мг. При этом содержание нитратного азота растворяют в растворе 0,1мг 1 л, стандартные растворы готовят из калия нитрата. Здесь, чтобы в 1 мл растворе было 0,01 мг нитратного азота, в мерной колбе, где находится 0,163 г KNO_3 , объем раствора, добавляя дистиллированную воду, доводят до 1 л.

Определение количества нитратного азота с помощью использования перокси водорода

Известно, что в последние годы как в сельском хозяйстве особое внимание уделяется применению в большом количестве органических удобрений при выращивании так и лекарственных растений, по меньшей мере 50 % урожая различных видов растений, выращиваемых в мировом масштабе, получают за счет применяемых азотных и других удобрений.

Следует также учитывать, что при определении эффективности применения минеральных удобрений и различных токсических химических веществ, необходимо обратить внимание не только на их влияние на урожайность растений, но и на их влияние на качество урожая. Это особенно приобретает большое практическое значение при выращивании овощных, бахчевых, плодовых культур и лекарственных растений, а также получении из них экологически чистых продуктов.

При выращивании этих растений часто встречаются случаи неправильного применения азотных удобрений.

В случае неправильного применения азотных удобрений при выращивании растений наблюдается накопление в их составе в большом количестве нитратов и нитритов.

Чрезмерное содержание нитратов в сельскохозяйственных продуктах и продуктах лекарственных растений слишком опасно для человеческого организма и организма животных.

В связи с этим, выявление нитратов и нитритов, встречающихся в растительных организмах, и которые могут нанести вред здоровью человека, приобретает важное практическое значение. Нитратные соединения, усвоенные растениями, расщепляются до аммиака в их корнях, стеблях, плодах и других органах, и могут участвовать в процессах обмена различных веществ. В различных органах растений количество нитратов может значительно повыситься при замедлении в растениях обратных процессов или подкормке азотными удобрениями в процессе выращивания всходов. Известно, что в связи с тем, что нитраты и нитриты весьма изменчивы с метаболической точки зрения, целесообразно их количество определять в свежесобранных растительных материалах.

Количество нитратных и нитритных соединений, которые содержатся в растениях, можно определить различными методами. Для определения количества нитратов рекомендуются следующие методы.

Обычно в растениях нитраты встречаются в очень малом количестве. Нитраты уже в корнях восстанавливаются до аммиака. При замедлении редукции нитратов и резком повышении подкормки нитратами в тканях растений может повыситься количество нитратного азота. Нитраты можно полностью отделить от растений с помощью воды. Поэтому от свежесобранных живых растительных органов или высушенных на воздухе растительных материалов нитраты можно отделить в их водных выделениях. Учитывая высокую подвижность нитратного азота в растениях, количество нитратов в полученных от растений образцах определяется в тот же день, когда собран растительный материал.

Для определения нитратного азота в растениях зачастую используют колориметрический метод, который протекает с применением дисульфобензойной кислоты. Данный способ основан на образовании нитробензоновых соединений, которые в результате взаимодействия с дисульфобензойной кислотой нитратов в нейтральной или слабощелочной среде дают зеленовато-желтый цвет. Интенсивность цвета определяет количество нитратного азота в исследуемом растворе.

ПОРЯДОК РАБОТЫ: Из материалов сухой массы растения берут 50 мг и для полного высыхания выделения водной вытяжки переносят в фарфоровую чашку. Если в исследованиях используются водные экстракты, не очищенные от органических веществ, выделения вытяжки предварительно, для полного расщепления органических веществ, хранят в 30 % ном растворе перекиси водорода. Осадок в фарфоровой чашке охлаждают и увлажняют 1 мл раствором дисульфобензойной кислоты. Данный осадок полностью растворяют при перемешивании стеклянной палочкой. После растворения осадка спустя 5-10 минут в чашку вливают 5-10 мл воды и нейтрализуют 10% ной щелочью (NaOH или KOH). При этом реакция среды определяется лакмусовой бумагой. Раствор в чашке переливают в мерную колбу с объемом 100 мл и колориметруют под воздействием голубого светофильтра фотоэлектроколориметра. Количество нитратов в исследованном растворе определяют, пользуясь данными калибровочной кривой, на фотоэлектроколориметре. В калибровочной кривой используются стандартные растворы нитратного азота от 0,1 до 5 мг. При этом содержание нитратного азота растворяют в растворе 0,1 мг 1 л, стандартные растворы готовят из азотнокислого калия. Здесь, чтобы в 1 мл растворе было 0,01 мг нитратного азота, в мерной колбе, где находится 0,163 г KNO_3 , объем раствора, добавляя дистиллированную воду, доводят до 1 л.

Определение нитратов по методу Починок-Грисса (по модификацию А.Зикиряйева и П.Мирхамидовой)

Этот метод основанна восстановление в слабокислотной среде нитратов до нитритов с помощью цинка. Образовавшиеся нитриты в зависимости от интенсивности цветов раствора (розово-красный) измеряют на ФЭК.

Порядок работы. Взвешивают 0,5 г растительного материала и при помощи 10-15 мл 0,5% ного раствора уксусной кислоты намалывают в фарфоровой ступке. Экстракт в ступне переливают в колбу с объемом 50 мл. Ступку промывают и добавляют к смеси в колбе, колба до отметки наполняется 0,5% ным раствором уксусной кислоты. Смесь фильтруется и 4 мл из фильтрата вливают в сухую пробирку. В пробирку добавляют еще 4 мл нитрита, 0,4 мл уксусного раствора и 10 мг цинкового порошка. Смесь в течение 10 минут раз в некоторое время взбалтывается или ставится на качающий прибор (встряхиватель). По истечении времени берут 4 мл фильтрата и добавляют 1 мг реактива Грисса, через 10 минут на колориметре измеряется интенсивность цвета раствора (540нм). Для того, чтобы увидеть темные растворы на фотокалориметре, их следуют сжижать. Например, берут 2 млраствора и сжижают до 5 мл. Количество нитратов определяется по следующей формуле:

$$X = \frac{0.1 * Va}{V1 * v2 * H}$$

X- количество нитратов в растительном материале, мг;

0,1- коэффициент перечисления;

a- количество нитрата, найденное по калибровке;

V- общий объем материала, взятого на опыт, мл;

V1- объем жидкости для восстановления нитратов, мл;

V2- объем жидкости, взятой для определения на фотокалориметре, мл;

H-масса материала, г.

Реактивы: реактив Грисса, 0,10 г нафтоламин нагревают в 60 мл воде и растворяют. После полного растворения реактивы переливают в колбу с объемом 100 мл и, добавляя 40 мл уксусной кислоты, наполняют водой до отметки. Раствор хранится в цветной посуде.

0,4 М раствор натрий ацетата. Порошок цинка 20 г. Порошок добавляют. Затем промывают дистиллированной водой и сушат на воздухе.

Определение количества аминного азота по методу Ван Сляйка

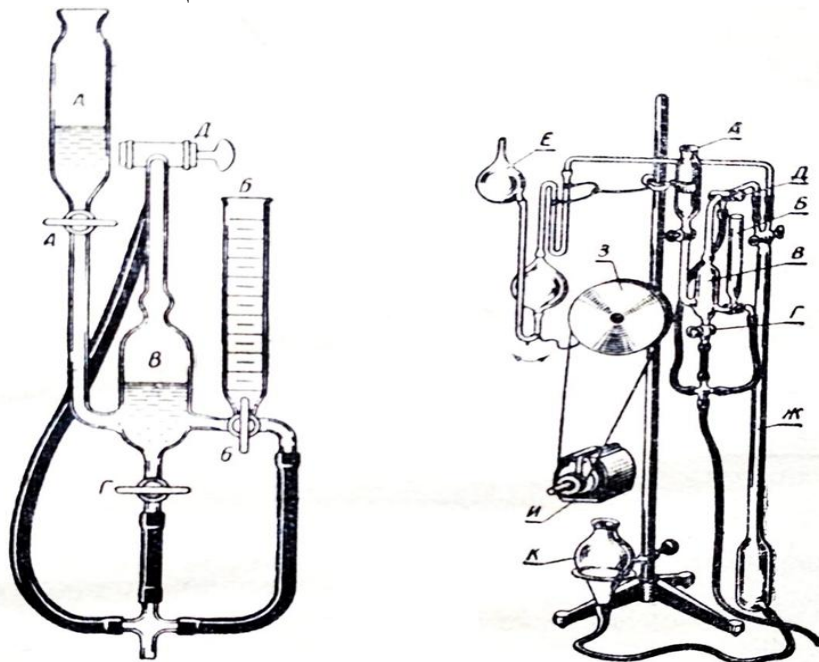
При анализе форм азотových соединений в растениях методом Ван-Сляйка необходимо определить не только общее количество азота, не являющегося белком, но даже и количество аминного азота. Особенно при определении активности протеолитических ферментов, а также уровня гидролитического расщепления белков под воздействием кислот и щелочей, определение количества аминного азота приобретает важное значение. При

определении количества аминного азота во многих методах приходится использовать растительные материалы в большом количестве. При микроспособе с применением меди, разработанном Войбудом и модифицированном Т.А. Глаголевой, при определении количества аминного азота берется очень мало растительного материала.

ПРИНЦИПЫ СПОСОБА: Значение определения количества аминного азота путем применения меди основано на образовании аминокислотами растворимого медного комплекса, вступая в реакцию с медными солями. При этом лишняя медь в растворе удаляется и количество меди в растворе определяется йодометрическим способом или с помощью диэтилдитиоуглекислого натрия. Диэтилдитиоуглекислого натрия, образуя желтый цвет, расщепляет соединения аминокислот, образовавшиеся вместе с медью. В этом методе прямая связь между количеством многих аминокислот хранится в промежутке 1-3 микрограмм.

ПОРЯДОК РАБОТЫ: В исследуемый 1 мл раствор, содержащий 10-60 мкг аминного азота, добавляют 2,5 мл Na_2HPO_4 (25,6 г Na_2HPO_4 , растворяют в 1 л воды) и 2,5 мл фосфорнокислой суспензии меди.

Данная суспензия готовится следующим образом: Сначала готовят раствор Na_3PO_4 . Для этого 25,6 г Na_2HPO_4 растворяют в 500 мл дистиллированной воды, добавляют 180 мл 1Н NaOH и, добавляя воду, ее объем доводят до 1 л. В 1 часть полученного Na_3PO_4 раствора добавляют 1 часть (то есть в соотношении 1:1) CuCl_2 раствора (27,3 г CuCl_2 растворяют в 1 литре воды) и эту смесь тщательно перемешивают. Затем, добавив в него 4 части 2,56% ного раствора Na_2HPO_4 , смесь с помощью обратного холодильника нагревают в течение 1 часа. Такую суспензию фосфорнокислой меди следует готовить минимум за 24 часа перед употреблением. Такая суспензия сохраняет свойства использования в течение 1-2 месяца.



3-рисунок. Прибор Ван-Сляйка

Смесь в пробирке с фосфорнокислой суспензией меди тщательно перемешивают и затем оставляют на 30 минут. В это время между медью и аминокислотами идет реакция.

После этого удаляется лишняя медь из раствора. Для этого раствор фильтруют через толстый фильтр в чистую пробирку сухой центрифуги или раствор вращают в центрифуге со скоростью 1000 раз в минуту. При этом достигается полной ликвидации из раствора даже следов фосфорнокислого осадка меди, в обратном случае эти следы могут препятствовать правильным результатам опыта. Таким способом берут потерянный фильтрат меди или половина центрифугата (3мл) и вливают в грудцированную пробирку. Объем раствора в пробирке, добавляя воду, доводят до 8 мл, к нему добавляют 0,1 мл 2 % ного диэтилдитиолированного раствора и, доведя водой объем раствора в пробирке до 10мл, тщательно перемешивают. В результате этого раствор окрашивается в желтый цвет. Эта работа осуществляется через 10 минут в амиловом спирте, в соединении, окрашивающем в желтый цвет, или в 10 мл растворе бутилового спирта.

Смесь центрифугируется в центрифуге (вращается 10000 об/мин). Оптическая плотность полученного (центрифугат) желтого раствора определяется на голубовато-желтом светофильтре фотоэлектроколориметра. Одновременно, то есть параллельно с оптической плотностью опытного раствора определяется также оптическая плотность и контрольного раствора (воды).

Вычисление результатов. Используя калибровочные кривые, смотря на величину оптической плотности, находят количество аминного азота. При этом оптическая плотность конторольного раствора отнимается от оптической плотности опытного раствора.

Количество амидного азота в составе растения определяют относительно сухой массы в процентах.

Определение количества амидного азота

Известно, что при последнем этапе определения аммиачного азота после завершения насыщения кислоты путем поглощения ею выделяемого аммиака, приёмник снимается с экстрактора и неизрасходованная кислота в нем вливают в микробюретку, затем розовый раствор титрируется с NaOH с 0,01 Н сначала до появления фиолетового, а потом зеленого цвета.

После завершения титрирования в сосуд приёмника вливают 10 мл H_2SO_4 с 0,01 Н и заново помещают в эксикатор. Крышку эксикатора закрывают, оставляя маленькую щель, вливают во внешнюю чашку. Затем крышка эксикатора закрывают герметично и оставляют на 1-2 сутки. При этом под воздействием щелочей амиды гидролизуются и выделяется аммиак.

Поле завершения гидролиза амидов и поглощения выделяемого аммиака, оставшаяся в «приёмнике» лишняя кислота титрируется 0,01 Н

1 мл раствором NaOH как при определении аминного азота. Количество всех азотов, не входивших в состав белка, определяется следующей формулой

$$X = \frac{ato,14 \times 14 \times 100 \times 100}{n20}$$

Здесь x- количество азота, не входящей в состав определяемого белка, в процентах.

a-количество 0,01N раствора H₂SO₄ в мл, из расходуемого для прикрепления выделяемого аммиака.

T- дополнительное число, включаемое для титрования 0,01 N раствора H₂SO₄ (поправка):

N- масса расходуемого материала изучаемого растения для проведения опыта в мг: 100- коэффициент, применяемый для перевода на процентное количество: 100 и 20- в величине для сжижения несколько раз: количество азота в мг, связываемого со стороны H₂SO₄ с 0,01 N в форме аммиака в точности 0.14-1мл.

Приборы и реактивы:

Эксикаторы, фарфоровые ступки, фарфоровые и стеклянные чашки, стаканы, мерные колбы в 100мл, микробюретка, пипетки, комбинированный индикатор, насыщенный раствор 40% ного NaOH, K₂CO₃, оксид магния, смесь меди, цинка и алюминия в соотношении 50:5:45.

Лабораторное занятие № 3

Обмен простых и сложных белков, их синтез в растениях в условиях invitro и invivo

Цель занятия:

1. Научить студентов определять количество белков в растениях по методу Лоури.
2. Научить определять колориметрическим методом концентрацию белка в растворе и пользоваться колориметром.

Задачи, направленные на определенную цель

Задание 1

1. Для выполнения практических заданий следует читать соответствующую литературу.
2. Знать правильно хранить препараты белкового характера.
3. Знать объяснять состояние белковых структур в растворе.

Задание 2

1. Знать обмен сложных белков, уметь объяснять значение их синтеза в условиях invitro и invivo в растениях.

2. Знать, какие вещества могут быть небелковыми частями сложных белков.

3. Какими методами можно определить количество белков, уметь объяснить их преимущества.

Задание 3

Для достижения цели следует знать и выполнять следующие практические работы.

1. Определять количества белков методом Лоури.
2. Определять количества белков методом Биурет.
3. Уметь провести линию калибровки.

Задание 4

Для правильной оценки полученных результатов вам потребуются знания по другим предметам.

1. Классификация сложных белков, их задачи.
2. Хромопротеиды, их задачи, строение.
3. Хлорофилл, его задачи.
4. Что такое антитела и антигены, их задачи.
5. Усвоение растениями нитратов, его значение.
6. Реакции усвоения аммиака.
7. Обмен некоторых аминокислоты их значение.
8. Значение синтеза белков в условиях *invitro* и *invivo* в растениях.

Вопросы для проверки результатов полученных знаний.

1. Как построены сложные белки?
2. Хромопротеиды, их строение, задачи.
3. Гликопротеиды, их строение, значение.
4. Липопротеиды, их значение.
5. Фосфопротеиды, их значение.
6. Определение количества белков.
7. Обмен некоторых аминокислот, их значение.
8. Реакции усвоения аммиака.
9. Трансаминизация и дезаминизация, их значение.
10. Азотный обмен в растениях и его значение.
11. Определение количества белка по методу Лоури.
12. Определение количества белка по методу Биурет.

Определение количества белка методом Лоури

При определении количества белка широко применяется этот метод. Данный метод обладает высокой чувствительностью, вследствие чего можно определить количество белка 10-100 мкг в образцах. Метод основан на цвет, который образуют ароматические аминокислоты реактивом Фолиназа счет пептидных пучков. Для определения количества белка составляется график калибрования. Для составления используются стандартные растворы альбумина.

Нужные приборы: штатив, пробирки, пипетки в 0,1, 1,5 и 10 мл, ФЭК, спектрофотометр.

Реактивы:

1. 0,1 раствор натриевой щелочи.
2. А раствор: раствор 2% ного натрия углекислого в 0,1% ной натриевой щелочи.
3. В раствор: раствор 0,5% ного сернокислой меди 1% ном растворе тартарате натрия. Для приготовления раствора 10 г соли тартарата натрия растворяют в 300 мл воды. Затем в раствор добавляют 5 г сернокислой меди и объем доводят до 1 литра.
4. С раствор: для приготовления этого раствора в 49 мл А раствора добавляют 1 мл В раствора. Этот раствор готовят перед анализом.
5. Фолинов реактив или Е раствор. Для приготовления раствора в 2 литровую колбу 100 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ соли, растворяют в 700 мл воды. Затем в раствор добавляют 50 мл 85 % ной H_3PO_4 кислоты и 100 мл концентрированной HCl кислоты.

После этого колбу с этой смесью присоединяют с обратным холодильником и кипятят 10-12 часов. После кипячения вливают 150 г сернокислого лития, 50 мл воды, несколько капель бромной воды. Чтобы вывести лишний бром 15 минут кипятят без холодильника. Смесью охлаждается до комнатной температуры, фильтруется и объем ее доводят до 1 литра. Кислотность Фолинова реактива определяется с участием фенолфталеина через титрование 0,1 н ной натриевой щелочью. Реактив хранится в сосуде в темном месте. При определении белка применяется реактив Фолина с кислотностью 1 н.

Порядок работы:

Для составления калибровочного графика готовится стандартный раствор альбумина. Для этого 4 мл альбумина растворяется в 10 мл воды. 0,1 мл этого раствора содержит 40 мкг белка. В пробирки вливают по 10-120 мкг раствора альбуминового белка. Изготовление этого показано в следующей таблице.

Пробирка №	Количество белка, мкг	Раствор белка, мл	Дистиллированная вода, мл
1	120	0,3	0,1
2	110	0,275	0,125
3	100	0,250	0,150
4	90	0,225	0,175
5	80	0,2	0,2
6	70	0,175	0,225
7	60	0,150	0,250
8	50	0,125	0,275
9	40	0,1	0,3

10	30	0,075	0,325
11	20	0,05	0,350
12	10	0,025	0,375
13	-	-	0,4

В каждую пробирку вливают по 2 мл раствора С, тщательно перемешивают и на 10 минут оставляют в комнатной температуре. Затем добавляют 0,2 мл реактива Фолина, пробирки взбалтывают, на 30 минут оставляют в комнате. Потом в спектрофотометре в 750 нм длине волны измеряется небелковой пробой. Из полученных данных составляется график.

Для этого на ординатную ось ставят величину оптической плотности, на абсциссную ось - количество белка в мкг. Для определения количества белка в биологическом объекте в пробирку вливают 0,4 мл исследуемого белка (сжиженного 50 или 100 раз), ведется работа в вышеописанных условиях. Смотря на оптическую плотность по графику определяется количество белка. Затем количество белка в не сжиженном объекте измеряется в мг.

График калибрования на абсциссной оси—количество белков в образцах мкг (С); на ординатной оси - показатель оптической плотности (Е).

Определение количества белка по реакции Биурета

Белки в щелочной среде вступают в реакцию с атомами меди и образуют синевато-сиреневый цвет. Густота этого цвета меняется в зависимости от количества белка в растворе. Этот метод применяется только при исследовании материалов с высоким количеством белка.

Порядок работы:

Берут 1-1,5 г муки Кассии остролистного растения Сано, к ней добавляют 1 мл ацетона, намалывают в фарфоровой ступке с помощью 3 мл буфера бората. Затем опять добавляют 1 мл буфера и продолжают намалывать. Смесь, приготовленную таким способом, оставляют на 30 минут. Затем центрифугируют и определяют количество в растворе. В пробирку вливают 1 мл раствора, сверху добавляют 1,5 мл реактива биурета. Смесь взбалтывают, оставляют на 30 минут. Затем рассматривается на фотозлектроколориметре с помощью кювета на 1 см в 540 нм длине волны (зеленый фильтр). Количество белка находят по калибровочной кривой, выявленной при помощи стандартного белка. Для составления калибровочной кривой берут 100 мг чистого кристаллического белка и растворяют в 10 мл дистиллированной воды и из него готовят стандартные растворы, в которых в 1 мл раствора бывает от 1 мг до 10 мг белка, и, рассматривая на фотоколориметре, определяют значение. На основе этого значения чертят калибровочную кривую.

Реактивы: порошок растения Кассии остролистного с ацетоном, реактив биурета—в 1 литре растворяют 9 г сегнетной соли, 3 г сернистой меди, 5 мг йодид калия. Сегнетную соль растворяют в 400 мл едкого натрия с 0,2 н,

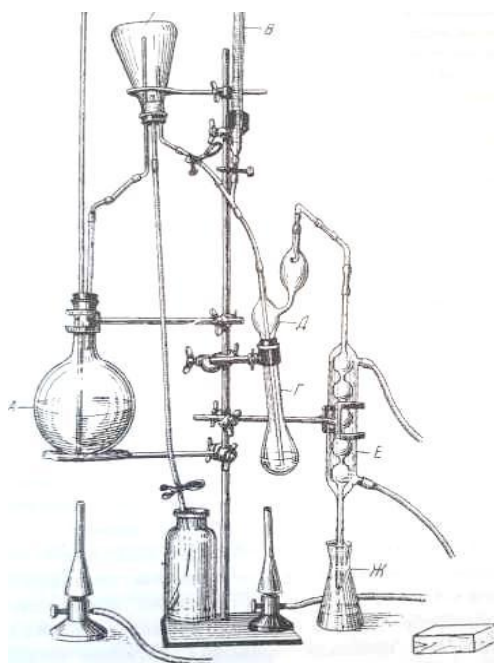
добавляют сернокислой меди. Когда соли хорошо растворились, добавляют йодид калия и объем раствора доводят до 1 л.

Определение количества белка по содержанию азота (способ Микрокьельдаля)

Определение количества белка по содержанию азота является самым удобным и точным способом.

Для этого белок в растительном материале с помощью одного из известных методов осаждают. Затем определяется общий азот в осадке и растворе. Если азот в осадке обозначает количество белка, то азот в растворе обозначает количество других веществ, не являющихся белком. Если известен общий азот в растительном материале, то определив азот в осадке или растворе, путем вычитания от общего азота, можно вычислить количество азотных веществ, не являющихся белком.

Одним из методов, широко применяемых при определении азота в составе биологического материала, является метод Кьельдаля. В большинстве же случаев используется метод микрокьельдаля, который дает возможность определить азот в очень малых количествах. Вещество, исследуемое способом Кьельдаля, сжигают концентрированной серной кислотой и приводят в минеральное состояние. При этом в качестве катализатора используются перекис водорода, сернокислый мед и другие вещества. Аммиак, образовавшийся в процессе минерализации, соединяется с серной кислотой.



4-Рисунок.

Прибор для отгонки аммиака по методу Кьельдаля.

Затем с помощью щелочи выделяется аммиак. В зависимости от количества аммиака определяется количество азота. Количество азота, выявленное при определении количества белковых веществ, умножается на соответствующий коэффициент. Для многих белков этот коэффициент равен к 6,25.

При методе Микрокьельдаля используется прибор, показанный на рисунке 4.

Парообразующая колба (1), дистиллированная вода наполняется с помощью воронки (2). К ней присоединяется вакуумобразующий сосуд (3) с щипцами (4, 11). Колба Кьельдаля (5) с одной стороны присоединяется к сосуду с воронкой (7) через трубку (6) в сосуд (3), с другой стороны - через приспособление, удерживающее капли воды, (8) к холодильнику (9). Один конец холодильника бывает погруженным в жидкость, находящейся в колбе Эрленмейер (10). Перед определением азота прибор в течение 15-20 минут очищается пропариванием.

Порядок работы:

Белок, который содержит 5-10 мг азота переносят в колбу Кьельдаля и нагревают, добавив 5 мл концентрированной серной кислоты. С истечением некоторого времени прекращается выход белого пара и смесь в колбе начинает медленно кипеть. В это время для ускорения реакции добавляется 2-3 капли перекиси водорода или 100 мг сернокислого калия и 3-4 кристаллов сернокислой меди. Раствор кипятят до бесцветного состояния. Затем колбу Кьельдаля охлаждают, присоединяют к прибору.

Смесь в колбе сжижается с помощью дистиллированной воды, в которую добавлено 10-15 мл (1-2 капли) метилрота. Сверх этого вливают 5-6 мл раствора 30 % ного едкого натрия. Вода и щелочь вливают через воронку (7), проход воронки преграждается щипцами. Изменение цвета смеси свидетельствует о щелочности среды. Затем выход пара через сосуд (3) преграждается щипцами (4) и пар проходит в колбу Кьельдаля и начинает кипеть в смеси. При этом выделяется аммиак и через холодильник начинает поступать в колбу Эрленмейера.

Выделение аммиака заканчивается за 15-20 минут. В течение последних 5 минут кончик холодильника не должен касаться кислоты, поэтому колбу следует спустить вниз. После завершения реакции, кончик холодильника, контактировавший с кислотой, промывают дистиллированной водой, затем, добавив 1-2 капли метилрота, лишняя кислота в колбе титруется с помощью 0,05 N ного едкого натрия до изменения цвета. Для контроля вместо материала берут дистиллированную воду и весь вышеописанный процесс повторяется еще раз. При определении количества выделенного азота 1 мл 0,05 N едкого натрия принимают как равный 0,7 мг азоту. Количество азота в процентах определяется по следующему.

$$X = \frac{(a - b) \cdot 7 \cdot 0,7 - 100}{N \cdot 10}$$

X-количество азота, в процентах (в граммах), а-количество раствора 0,05 N едкого натрия, израсходованного для титрования контроля,

T- поправка титру 0,05 N едкого натрия,

100- коэффициент перевода в проценты,

N- количество полученного вещества в мг.

Этим же способом можно определить азот в составе веществ, не являющихся белком, и общий азот в растительном материале.

Реактивы:

Белок растения Кассия остролистного, концентрированная серная кислота, перекись водорода, сернистой калии, сернистый медь, 0,05 г метилрота растворяют в 150 мл этиловом спирте и водой доводят до 250 мл, 30% ный раствор едкого натрия, 0,05 N раствор едкого натрия.

Определение количества растительных белков с помощью реактива амидошварц 10В

Фенолы и их образования, которые часто встречаются в растениях, могут препятствовать определению белка в количественном отношении с помощью метода Лоури. Поэтому этот метод применяется и при определении растительных белков в количественном плане. В последнее время широко распространяются методы количественного определения, основанные на образовании белками комплексов с различными красками. Одним из таких методов является определение количества белка с помощью амидошварца.

С помощью этого способа количество белка может определяться в тканях и неочищенных экстрактах. Амидошварц при помощи своей сульфогруппы связывается с белками. В результате выходят белки, а это дает возможность измерить разницу между цветами жидкости, исследуемой контрольным образцом в реакционной смеси.

Реактивы: лист растения, 1% ный раствор амидошварца 10 В в 7 % ной уксусной кислоте, реактив, который дает в осадок.

Порядок работы:

0,5 г листа растения намалывают в ступке с 5 мл водой. Гомогенат сжижают, добавив 5-45 мл воды. Берут 1 мл гомогената, приготовленного для анализа, сверх него вливают падающий в осадок реактив и тщательно перемешивают, затем оставляют в комнатной температуре на 10 минут. После этого в течение 15 минут центрифугируют, вращая со скоростью 5000 оборотов в минуту. Берут 1 мл из жидкости над осадком и вливают в мерную колбу с объемом 25 мл, добавляют 10мл воды и доводят объем до 25 мл. Оптическая плотность сжиженного раствора определяется на ФЭК — 56 Мс помощью 8-светофильтра (600 ± 10 нм) или на спектрофотометре 615 нм.

Для проведения калибровочной кривой используют альбумин сыворотки крови крупного рогатого скота. 25 мл альбумина сыворотки крови растворяют в 25 мл бидистиллированной воды и путем сжижения этого раствора готовят растворы с концентрацией в 0,75 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,25 мг/мл. Для этого из приготовленного белкового раствора в ранжированные пробирки кладут по 7,5; 5,0; 2,5 мл, вливают до 10 мл бидистиллироапнной воды. С приготовленными стандартными растворами различной концентрации выполняются вышеописанные операции и на основе полученных значений оптической плотности проводят калибровочную кривую. Для этого на ось абциссы ставится концентрация белка, на ось ординаты - оптическая плотность.

Вопросы для подготовки к 3 занятию

1. Строение и значение ферментов.
2. Физико-химические свойства ферментов.
3. Аллостерический центр, строение и значение ферментов.
4. Кинетика ферментативных реакций.
5. Активация и ингибирование ферментов.
6. Механизмы воздействия ферментов.
7. Номенклатура и классификация ферментов.

Лабораторное занятие № 4

Ферменты, их строение, свойства, задачи и определение специфичности ферментов

Цель занятия:

1. Строение ферментов, определение задач.
2. Изучение связи между структурой ферментов и ферментативной кинетикой.
3. Изучение специфичности ферментов.
4. Научиться определять активность ферментов.

Фермент или энзим являются каталитическим белком. Почти 90 % клеточных белков составляют ферменты, некоторые структурные белки, например, миофибриллярные, но имеющие свойство сокращения актинимиозина, также служат катализаторами в реакциях. Живые организмы содержат огромное множество различных ферментов, которые сконцентрированы в клеточном соке и клеточных органоидах (ядро, митохондрий, хлоропласт, эндоплазматическая сеть). Количество ферментов разных частей растений бывает разным. Ферментов особенно очень много в прорастающих семенах и зёрнах, поэтому при их выделении считается оптимальным источником. Например, в семенах сои часто встречается фермент уреазы, расщепляющий мочевины, в клубнях картофеля - фермент фосфорилазы, который участвует в синтезе крахмала. Ферменты, как и другие белки, при нагревании под воздействием химических факторов и других, подвергаются денатурации. Ферменты, как и белки, обладают группами, несущими в своих молекулах множество положительных и отрицательных зарядов, в естественном состоянии определенной изоэлектрической точкой, действует в электрическом поле. Существуют рН оптимум с максимальным воздействием ферментов и оптимум температуры. Но самым удивительным их свойством является специфичность. Этим свойством ферменты резко отличаются от других катализаторов. Они катализируют реакции, совершенно отличительные относительно стереоизомеров одного или несколько очень близких соединений. Специфичность ферментативных реакций уже давно описывают в форме модели замок-ключ. По этой модели, фермент соответствует только похожему, только имеющему точную форму, ключу (субстрату). По современным понятиям, старые отношения "замок-ключ" несколько усовершенствовали и превратили в индуцированную модель замка-ключа.

Смысл в том, что замок, после связи с субстратом, изменяет свою конформацию и переходит в форму, совершенно соответствующую ключу.

В ходе ферментативной реакции прежде всего фермент (E) вступает в контакт с субстратом (S) и образует энзимно — субстратный комплекс (ES). Граничащая часть фермента, связывающая субстрат и обеспечивающая его химические изменения, называется активным центром. В этом же центре кусок, временно связывающий субстрат, составляет связывающую часть, группы, участвующие в химических изменениях молекулы, - каталитическую часть. Активный центр формируется с участием радикалов в боковых ветвях некоторых аминокислот в молекуле фермента. Эти аминокислоты могут располагаться в отдаленных друг - от друга частях, но в белковой конформации молекулы они приблизились друг к другу. Активный центр с участием кофермента, присутствующего при реакции, и в процессе образования комплекса фермента-субстрата формируется окончательно.

Ферменты, состоящие из простых белков, то есть из одних аминокислот, называются однокомпонентными ферментами. Например, рибонуклеаза, трипсин. Если ферменты состоят из сложных белков, то есть если в их составе кроме аминокислот встречаются и другие соединения, то они называются двухкомпонентными. Ферменты, участвующие в реакциях окисления - восстановления, являются двухкомпонентными ферментами. Если дополнительная молекула, называемая кофактором, соединена с белком довольно прочно, то при анализе она не отделяется от полипептидной цепи, связанная часть молекулы фермента называется простетической группой.

Белковая часть двухкомпонентного фермента называется апоферментом, диссоциируемое малое молекулярное дополнение, легко отделяемое от него, - коферментом. В связи с тем, что апофермент является белком, он высокомолекулярен, портящийся при нагревании термолabile, не диализующийся компонент, а кофермент является низкомолекулярным, стойким к высокой температуре - термостабильным и диализующимся компонентом. Только в случае соединения апофермента с коферментом образуется полноактивный фермент-холофермент.

Кофермент в активном центре фермента является основным элементом каталитической части, обеспечивающей химические изменения субстрата. Большинство коферментов состоят из витаминов и их несколько изменившихся, зачастую фосфоризированных форм, различных нуклеотидов.

Кроме активного центра в молекуле фермента выявлено также существование аллостерического центра.

Этот центр, являясь определенной частью молекулы фермента, объединяет отдельные, в большинстве не субстратные, не похожие на него вещества, так называемые низкомолекулярные эффекторы или модификаторы.

Присоединение эффектора к аллостерическому центру изменяет троичную, в большинстве случаев четвертичную структуру фермента,

следовательно, конформацию активного центра, и становится причиной усиления или ослабления ферментативного свойства.

Ферменты обладают рядом своеобразных особенностей. К ним относятся термолабильность ферментов, их специфичность, чувствительность среды pH по отношению к изменениям, восприимчивость к влиянию активаторов и ингибиторов. Влияние ферментов и их активность устанавливается, смотря на уменьшение вещества, участвующего в реакции, или на постепенный рост образуемого вещества. Обычно в качестве ферментативного препарата используются соки растительных тканей. В таких соках ферменты бывают растворенными. Ферменты, известные до наших дней, подразделяются на 6 классов:

1. Оксидоредуктазы - катализируют реакции окисления и восстановления.

2. Трансферазы - обеспечивают переход определенных химических групп из одного соединения в другое.

3. Гидролазы-катализируют реакции расщепления сложных органических веществ с помощью воды.

4. Лиазы - катализируют отделение от субстрата без участия воды определенных групп. Благодаря активности этих ферментов образуются парные связи или обеспечивается присоединение определенных групп в парные связи.

5. Изомеразы - катализируют реакции изомеризации различных органических соединений.

6. Лигазы (или сигпетазы) - за счет энергии АТФ или тому подобных нуклеозидтрифосфатов катализируют реакции образования сложных соединений из простых молекул.

Характер всех организмов, метаболических процессов тканей некоторых органов многоклеточных организмов, следовательно, различаются совокупностью ферментов, обеспечивающих данный тип метаболизма. Основные процессы, являющиеся общими для всех типов клеток, - окисление клетки или гликолиз, брожение, синтез белка, окисление масляных кислот катализируются одинаковыми ферментами.

Но совокупность специальных ферментов для фотосинтеза, который происходит в зеленых листьях, существует исключительно в растительных тканях, где происходит данный процесс, и в животных клетках не бывает, ферменты мускулатурных сокращений совершенно отличаются от пищеварительных ферментов желудочно-кишечной системы.

Ферменты и внутри клетки располагаются различным образом, исходя из функции, выполняемой органами клетки. Например, ферменты, обеспечивающие гликолиз, располагаются в цитоплазме, ферменты, фосфорлируемые путем окисления, во внутренней мембране митохондрий, ферменты, обеспечивающие синтез нуклеиновых кислот, - исключительно в ядре. Большинство гидролитических ферментов расположены в лизосомах и обеспечивают происходящие в них гидролитические процессы.

Чисто кристаллические ферменты, то есть ферментные препараты, микробные клетки, богатые ферментами (закваска), широко применяются в технике при переработке биологического сырья (хлебопечение, виноделие, табак, чай), в медицине при лечении (рассасывание шрамов), в сельском хозяйстве при заготовлении силоса, размягчая солому и кусты хлопчатника; в научных лабораториях для аналитических целей.

Амилаза – влияние температуры на активность фермента диастазы

Необходимое оборудование для занятия: ячменный солод, 1% ный раствор крахмала, слабый раствор йода в йодиде калия (раствор в 1 литре воды 20 мл сильного раствора йода), весы с гирями, цилиндр, колба с объемом 150 мл, фильтровальная бумага, воронка, термометр, морозильная водяная баня, штатив с пробирками, 1-2 и 10 мл пипетки.

Скорость какой-либо химической реакции, происходящей с участием катализатора, во многом зависит от температуры. Влияние температуры также относится и к ферментам, которые считаются биологическими катализаторами. Цель занятия состоит в изучении влияния температуры на активность фермента амилазы. Для определения этого в 2 пробирки переносят по 10 мл раствора крахмала, добавляют по 1 мл раствора, приготовленного из солода, который содержит фермент активной амилазы. Если эти две пробирки на определенное время хранить в условиях разных температур, то, что для полного расщепления крахмала требуются разные промежутки времени, определяется воздействием на них раствором йода.

Ход работы. Фермент активной амилазы можно выделить из состава солода с помощью воды. Для этого в колбу переносят 10 г солода, сверху вливают 50 мл теплой воды 35-40°C температуры, 3 минуты тщательно взбалтывают и оставляют на полчаса. Через полчаса колбу опять взбалтывают и содержимое пропускают через фильтр. Если раствор мутный, перефильтруется. Все студенты группы разделяются и определяют активность фермента амилазы в какой-то из следующих температур (5, 15, 25, 35, 45, 55, 56°C). Каждый студент группы вливает по 10 мл слабого йодного раствора в 15-20 пробирок, в одну пробирку - 10 мл раствора крахмала. В штативе при необходимой температуре через определенное время, в пробирки с раствором крахмала добавляют 1 мл солодового раствора и перемешивают и в тот же час с помощью пипетки накапают в 1-пробирку, куда закапали 1 каплю раствора йода. Крахмал полностью расщепляется под воздействием фермента амилазы в составе солода. Это можно увидеть в том, что при накапывании в йодовый раствор крахмального раствора не образуется синий цвет. Для правильного поставления опыта температура должна быть одинаковой, а образец крахмала следует достать по истечении точного времени.

Задачи, направленные на определенную цель

Задание 1

1. Для выполнения практических работ следует прочитать соответствующую литературу.

2. Ферменты-каталитические белки, знать их строение, свойства.
3. Знать физико-химические свойства ферментов.

Задание 2

1. Знать специфичность и виды ферментов.
2. Знать механизмы действия ферментов.
3. Из чего состоит активный центр ферментов, что такое кофермент?

Задание 3

Для достижения цели вам следует знать и выполнять следующие практические работы.

1. Определять специфичность ферментов.
2. Определять активность ферментов.

Задание 4

Для правильной оценки полученных результатов вам необходимы ваши знания по другим предметам.

- 1) Что называется ферментами, чем они отличаются от других веществ?
- 2) Назовите структурно - функциональные срывы ферментов.
- 3) Что такое Холофермент?
- 4) Что такое кофермент и что такое кофактор?
- 5) Механизм воздействия ферментов?

Вопросы для проверки результатов полученных знаний

1. Как построен активный центр ферментов?
2. Специфичность ферментов, их виды.
3. На какие гипотезы основываются специфичность ферментов?
4. Активизация и ингибирование ферментов.
5. Как построен аллостерический центр ферментов, его значение?
6. На чем основываются механизмы действия ферментов?
7. От чего зависит кинетика ферментативной реакции?
8. Номенклатура и классификация ферментов.
9. Расположение, значение, применение ферментов.
10. Основные этапы определения.
11. Определение специфичности ферментов.
12. Определение активности ферментов.

Определение специфичности ферментов

Ферменты являются биологическими катализаторами, обладают своеобразными особенностями воздействия. Такое их своеобразие считается одной из важных особенностей, присущих живым организмам. В каталитических процессах образование ферментно-субстратного комплекса, строение ферментов зависят от строения белковых молекул, образования химических связей между их активными частями и соответствующими группами субстрата. Каждый фермент оказывает влияние на определенный субстрат или на определенный вид химической связи в молекуле.

Необходимое оборудование: пробирки, штатив, пипетки, термостат.

Реактивы: 1 % ный раствор крахмала, 2 % ный раствор сахарозы, сжиженная слюна-амилаза, сахароза (10 г дрожжей гомогенизируют в 100 мл

дистиллированной воды), 20 % ный раствор едкого натрия, 1% ный раствор йода в калиевом йоде.

Порядок работы:

Берут четыре пробирки, в первую и вторую пробирки вливают 2-4 мл раствора крахмала, в третью и четвертую пробирки - 2-4 мл сжиженной слюны-амилазы, во вторую и четвертую пробирки - 2-4 мл фермента сахаразы, после чего пробирки взбалтывают и на 20 минут помещают в термостат с температурой 37°C для инкубации. После инкубации в 1-и 2-пробирки закапывают 1-2 капли раствора йода в калиевом йоде, в 3-и 4-пробирки - 2-4 мл 20 % ного раствора едкого натрия, 2-4 капли 5 % ного сернокислой меди и нагревают.

В результате амилаза гидролизует крахмал и сахараза расщепляет сахарозу до Дглюкозы и Дфруктозы.

Определение активности фермента Тирозиназы

Фермент Тирозиназы относится к ферментам, которые катализируют реакции окисления-восстановления, широко распространен в составе растений. Они имеют важное значение при образовании в растительных продуктах цветных веществ-меланинов.

Реактивы: картошка, 0,1% ный раствор тирозина – 0,1 г тирозина, слегка разогревая, растворяют в 100 мл 0,01 н Na_2CO_3 раствора.

Ход работы. Картошку пропускают через терку, отцеживая с помощью 2- 3 слоев марли, получают сок. В две пробирки вливают по 1 мл картофельного сока. В 1-пробирку добавляют 2-3 капли воды, во 2-пробирку 2-3 капли 0,5% ного раствора тирозина. Жидкость в пробирке тщательно взбалтывают и на 60 минут помещают в инкубацию с температурой 40° С. Время от времени 3-4 раза пробирки тщательно взбалтывают. С истечением времени, в пробирке с тирозином образовывается черный цвет. Этот цвет присущ меланину, образовавшемуся из тирозина под воздействием фермента тирозиназы.

Амилаза – влияние температуры на активность фермента диастазы. (по модификации К.Г.Третьякова и А.С.Сулаймонова)

Необходимое оборудование для занятия: солод (мука пророщенного ячменя), слабый раствор йода в йодиде калия (раствор в 1 литре воды 20 мл сильного раствора йода), весы с гирями,цилиндр , колба с объемом 150 мл,фильтровальная бумага,воронка, термометр, морозильная водяная баня, штатив с пробирками,1-2 и 10 мл пипетки.

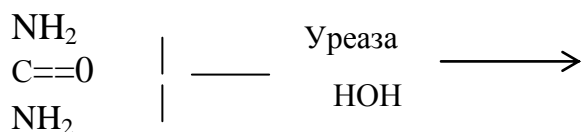
Скорость какой-либо химической реакции, происходящей с участием катализатора, во многом зависит от температуры. Влияние температуры также относится и к ферментам, которые считаются биологическими катализаторами. Цель занятия состоит в изучении влияния температуры на активность фермента амилазы. Для определения этого в 2 пробирки переносят по 10 мл раствора крахмала, добавляют по 1 мл раствора,

приготовленного из солода, который содержит фермент активной амилазы. Если эти две пробирки на определенное время хранить в условиях разных температур, то, что для полного расщепления крахмала требуются разные промежутки времени, определяется воздействием на них раствором йода.

Ход работы. Фермент активной амилазы можно выделить из состава солодас помощью воды. Для этого в колбу помещают 10 г солода, сверху вливают 50 мл теплой воды 35-40°C температуры, 3 минуты тщательно взбалтывают и оставляют на полчаса. Через полчаса колбу опять взбалтывают и содержимое пропускают через фильтр. Если раствор мутный, перефильтруется. Все студенты группы разделяются и определяют активность фермента амилазы в какой-то из следующих температур (5,15, 25, 35, 45, 55, 56°C). Каждый студент группы вливает по 10 мл слабого йодного раствора в 15-20 пробирок, в одну пробирку - 10 мл раствора крахмала. Пробирки в штативе при необходимой температуре через определенное время, в пробирки с раствором крахмала добавляют 1 мл солодового раствора и перемешивают и в тот же час с помощью пипетки капают в 1-пробирку, куда закапали 1 каплю раствора йода. Крахмал полностью расщепляется под воздействием фермента амилазы в составе солода. Это можно увидеть в том, что при закапывании в йодовый раствор крахмального раствора не образуется синий цвет. Для правильного поставления опыта температура должна быть одинаковой, а образец крахмала следует достать по истечении точного времени.

Определение активности фермента уреазы в ядрах семян арбуза

Фермент уреазы широко распространен в бобовых культурах. Их особенно много в сое, горохе. Они также часто встречаются в семенах арбуза. Фермент уреазы расщепляет мочевины до углекислого газа и аммиака.



Фермент уреазы расщепляет мочевины до углекислого газа и аммиака.

Порядок работы: Берут 5 г сои или ядра семян арбуза, тщательно намалывают в фарфоровой ступке до получения муки. Затем берут 2 пробирки, в каждую из которых помещают по 1 г муки сои или семян арбуза. В 1-пробирку вливают 1мл воды, во 2-пробирку - 1мл 1 % ного раствора мочевины. Пробирки переносят на 15 минут в термостат при температуре 40° С.

Затем в обе пробирки закапывают по 1-2 капли фенолфталеина.

Среда во 2-пробирке, являясь щелочной средой, образовавшейся за счет аммиака, который образовался под воздействием фермента, приобретает розовый цвет.

Реактивы: семена сои или арбуза, 1 % ный раствор мочевины, фенолфталеин.

Влияние амилазы на крахмал

Фермент амилазы расщепляет крахмал до сахара. Одним из важных источников фермента амилазы считаются зерновые растения. Они в большом количестве накапливаются в сухом зерне и особенно в составе прорастающих зерен. Ферменты в составе прорастающих зерен обладают самой высокой активностью.

Крахмал вместе с йодом дает синий цвет, декстриновые частицы, образованные в результате его расщепления, в зависимости от размера меняется с йодом до фиолетового, буро-красного, желтоватого и желтого цвета (цвет йода в воде). Поэтому, если в раствор крахмала добавляют фермент амилазы, в определенном промежутке времени под воздействием йода смесь меняется сначала в синий, потом в фиолетовый, красный, желтоватый и до желтого цвета.

Порядок работы. берут 9 пробирок, в каждую из них вливают по 2-3 мл дистиллированной воды и по одной капле 1% ного раствора йода. Установив время, смесь в пробирке тщательно взбалтывают. Затем с помощью пипетки 1 капля смеси закапывают в первую пробирку. Жидкость в пробирке дает синий цвет. Таким образом, через каждые 30 секунды 2-, 3-, 4-..... и т.д. в 9-пробирку капают по одной капле из смеси в 10-пробирке. Жидкость в пробирках тщательно перемешивают и образуют соответствующие цвета. Если жидкость во второй пробирке дает синий цвет, то в следующие пробирки следует капать немного позже, например, через одну минуту. Если во второй пробирке появляется фиолетовый или красноватый цвет, то следует ускорять время, то есть следует капать каждые 15 секунд. Если в одной из пробирок желтый цвет не меняется, то это свидетельствует о завершении гидролиза крахмала. Результат опыта пишут на таблицу.

Реактивы: ферментный сок (5-10 грамм муки или тщательно измельченные 5 дневные всходы зерна ячменя помещают в колбу и сверху вливают 100 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешивают и оставляют на 30 минут, затем фильтруют (жидкость, прошедший через фильтр, считается ферментным соком). 1% ный раствор йода, 0,5% ный раствор крахмала.

Вопросы для подготовки к 4 -занятию

1. Строение клетки, составные части.
2. Строение белков, их свойства.
3. Уровни строения белков.
4. Протеины и протеиды.
5. Ферменты, строение, свойства.
6. Значение белков и ферментов в биотехнологии растений.
7. Номенклатура и классификация ферментов.
8. Кинетика ферментативной реакции.
9. Механизм действия ферментов.
10. Антителы и антигены.

Лабораторное занятие №5. Ферменты, их значение в обмене веществ, определение активности и значение в биохимии растений (итоговое занятие)

Цель занятия:

Изучение вопросов итогового занятия.

1. Задачи предмета биохимии растений.
2. Общее строение клеток.
3. Из чего состоят органеллы клеток?
4. Выделение компонентов клетки.
5. Классификация белков, их функция.
6. Методы выделения и очищения белков.
7. Физико-химические свойства белков.
8. Состав белков, их строение, аминокислоты.
9. Свойства аминокислот.
10. Уровни структурного строения молекулы белка (первичный, вторичный, третичный, четвертичный).
11. Протеины и протеиды.
12. Антитела и антигены.
13. Строение ферментов, их задачи, значение.
14. Кинетика ферментативных реакций.
15. Свойства ферментов.
16. Механизмы воздействия ферментов.
17. Номенклатура и классификация ферментов.

Вопросы для подготовки к 5 - занятию

1. Как построены углеводы, их значение?
2. Классификация и задачи углеводов.
3. Какими методами можно определить крахмал в растениях?
4. Из чего состоит крахмал?

Лабораторное занятие № 6

Определение растворимых углеводов в составе растений

Цель занятия:

1. Углеводы, относящиеся к растворимым углеводам, изучение значения углеводов в составе растений.
2. Научиться определять количество растворимых углеводов.
3. Научиться определять крахмал в составе растений.

Углеводы являются органическими соединениями, имеющими важное значение в жизни растений. Они составляют 80 — 90 % составных частей растений. Углеводы являются основным продуктом процесса фотосинтеза. Они расщепляются в процессе дыхания растений и выделяют много энергии.

Углеводы имеют особое значение в образовании нуклеиновой кислоты и масел, соединений, которые играют важную роль в жизненных процессах. Большинство углеводов накапливается в растениях в качестве запасного

вещества. В качестве запасного вещества они накапливаются в корнях и корнеплодах.

Углеводы в зависимости от строения и особенностей делятся на 2 большие группы: простые углеводы - моносахариды и сложные углеводы-полисахариды. Полисахариды составляют две подгруппы. Это олигосахариды с небольшим молекулярным весом и настоящие полисахариды. Моносахариды и олигосахариды часто называют сахарами.

Моносахариды в зависимости от расположения карбонильной группы в своем составе образуют два вида изомера, то есть изомеров альдозу и кетозу. Все моносахариды, которые встречаются в природе, относятся к D - ряду. Моносахариды в составе растений в свободном виде встречаются редко. Они, в основном, встречаются в качестве других образований моносахаридов и в форме полисахаридов. Полисахариды являются высокомолекулярными соединениями, молекулярная масса которых достигает до несколько тысяч, даже до миллиона. Они безвкусные, не растворяются в воде или образуют коллоидный раствор, и поэтому в большом количестве накапливаются в составе растений. Когда они гидролизуются с кислотами или ферментами, расщепляются на олигосахариды и моносахариды. Полисахариды, состоящие из одинаковых моносахаридов, называются гомополисахаридами. Если в составе полисахаридов имеются различные моносахариды, то они называются гетерополисахаридами.

Пектиновые вещества -соединения, которые также относятся к классу полисахаридов, часто встречаются в плодах, корнеплодах и стеблях растений, в растениях пектиновые вещества бывают в форме протопектина. Протопектин не растворяется в воде. Когда ткани растений обрабатывают соляной кислотой, пектин переходит в растворимое состояние. Пектиновые вещества состоят из полигалактоуронатных кислот. Если одна часть карбоксильных групп полигалактоуронатных кислот метилирована, то они называются пектинатными кислотами. В составе растворимого пектина много метилированных групп. Нерастворимый пектин можно назвать кальциевой солью пектинатной кислоты. Нерастворимый пектин при созревании плодов превращается в растворимый пектин и становится причиной созревания мякоти. В связи с тем, что растворимые пектиновые вещества обладают особенностью образовывать клейкое вещество, часто используются в пищевой промышленности. Источником пектиновых веществ, используемых в пищевой промышленности, является яблоко. В последние годы пектиновые вещества получают из подсолнечника, арбуза и свеклы.

Клейковые вещества входят в род гетерополисахаридов, при расщеплении образуют галактозу, маннозу, глюкозу, рамнозу и другие моносахариды. Они набухают в воде и образуют липкие растворы. К примеру клей, выделяемый из поврежденных мест деревьев урюка, вишни, сливы, миндаля. А клейковых веществ содержится много в семенах льна, овса, клевера и трилистника.

В процессах, происходящих в растениях, углеводы играют важную роль.

Все полисахариды и олигосахариды, встречающиеся в составе растений, с участием ряда ферментов расщепляются прежде всего до моносахаридов. В

дальнейшем свободные моносахариды вступают в реакцию с соединениями, богатыми энергией, и достигается образование фосфорных эфиров.

Реакции фосфорилирования свободных моносахаридов считается одним из важных этапов в их расщеплении.

Фосфорные эфиры моносахаридов, то есть глюкоза - 6 фосфат в клетке и тканях расщепляется двумя путями: анаэробные- гликолиз и в аэробное - называется циклом ди-и трикарбоновых кислот.

Вопросы, направленные на определенную цель

Задание 1

1. Для выполнения практических работ следует прочитать соответствующую литературу.

2. Уметь определять крахмал в составе растений.

3. Уметь определять количество растворимых углеводов в составе растений по методу Хагедорн-Иенсен.

Задание 2

1. Знать значение углеводов в жизни растений.

2. Знать классификацию углеводов.

Задание 3

Для достижения цели вам следует знать и выполнять следующие практические работы:

1. Определять количество растворимых углеводов.

2. Определять крахмал в составе растений.

Задание 4

Для правильной оценки полученных результатов вам необходимы знания по другим предметам.

1. Как построены моносахариды, полисахариды, их значение?

2. Как расположены в растениях углеводы?

3. Анаэробное расщепление углеводов, его значение.

4. Самый накапливаемый углевод в растениях.

Вопросы для проверки полученных знаний

1. Размещение углеводов в растениях, его значение.

2. Как построен крахмал?

3. Гликолиз, его значение.

4. Задачи углеводов в процессе фотосинтеза.

5. Расщепление углеводов, встречающихся в растениях.

Основные этапы определения

1. Определение крахмала в составе растений.

2. Определение количества растворимых углеводов.

Определение крахмала в составе сельскохозяйственных и лекарственных растений

Крахмал считается самым важным полисахаридом, который больше всех других накапливается в растениях. Его особенно много в зернах растений. А в многолетних травянистых растениях накапливается в подземных органах.

Во всех растениях - от водорослей до высших растений, углеводы, образующиеся в хлоропластах в процессе фотосинтеза непосредственно превращаются в крахмал. Крахмал состоит из двух соединений, то есть из амилозы и амилозапектина.

Амилоза пектин под воздействием йода приобретает фиолетовый и красновато-фиолетовый оттенки. А амилоза синее под воздействием йода. Методы определения крахмала основываются на определении густоты цвета, который он создает с йодом, или на определении количества глюкозы, образованной в результате кислотного и ферментативного гидролиза.

Определение количества крахмала по методу В.Л. Починок

Этот метод основан на образовании комплекса крахмала с йодом. Образовавшийся комплекс с помощью бихромата калия в кислой среде окисляется на CO_2 и H_2O . В результате реакции йод выделяется в свободном состоянии. Этот йод титруется гипосульфитом, по израсходованному количеству гипосульфита определяется количество крахмала.

Порядок работы:

Исследуемый лекарственный растительный материал (1г картофельных клубней, 3г листьев) в фарфоровой ступке с помощью 5 мл 80% ного раствора азотнокислого кальция тщательно измельчается до гомогенного состояния. Затем в колбу с объемом 200 мл вливают экстракт. 2-3 раза в ступке промывают 80% ным раствором азотнокислого кальция. Общий объем жидкости в колбе не должен превышать 30 мл. Колбу закрывают сверху воронкой и на электрической плитке медленно кипятят в течение 3 минут. При этом крахмал переходит в раствор. Колбу охлаждают, воронку тщательно промывают и раствор переливают в другую мерную колбу с объемом 100 мл. Затем дистиллированной водой наполняют до мерной линии и фильтруют в стакан. Из этого фильтрата 5 мл вливают в пробирку центрифуги. Сверх этого вливают 2 мл раствора йода, тщательно перемешивают, оставляют на 30 минут.

В результате йодный комплекс крахмала падает в осадок. По истечении времени, пробирка с осадком центрифугируется в течении 5-10 минут со скоростью 4000-5000 оборотов в минуту. Осадок еще 2-3 раза промывают с помощью 5 % ного раствора азотнокислого кальция. Каждый раз, когда вливают раствор, осадок в колбе тщательно перемешивают. Затем осадок вместе с 0,2-0,3 мл воды переливают в 200 мл колбу. А пробирку 3-4 раза промывают дистиллированной водой (общий объем воды не должен превышать 3 мл). В колбу добавляют 10 мл 0,25 н раствора бихромата калия, приготовленного в 85% ной серной кислоте, тщательно перемешивают, на 15 минут ставят в кипящую водяную баню. При этом крахмал с помощью бихромата калия расщепляется до углекислого газа и воды. После охлаждения колбы, в нее добавляют 5 мл раствора 20% ного йодида калия и 120 мл воды. При этом бихромат калия выделяет йод. Выделенный йод титруется раствором 0,1н гипосульфита. Титрование продолжается до получения желтого цвета и затем, добавив в колбу 1 мл 0,5 % ного раствора крахмала, титрование продолжают до получения светло-голубого цвета. 1 мл раствора 0.1н гипосульфита равняется к 0,675 мл крахмалу. отдельно проводится и контрольное

титрование. Для этого в колбу с объемом 20 мл вливают 10 мл 0,25 н раствора бихромата калия, 120 мл воды, 5 мл 20 % ного раствора йодида калия и титруется 0,1 н раствором гипосульфита.

Количество крахмала определяется по следующему

$$X = \frac{0,675 \cdot b \cdot T \cdot (a - b)}{H}$$

X-количество крахмала в процентах

a-количество раствора 0,1 н гипосульфита, израсходованного для титрования контроля, мл

b-количество раствора 0,1 н гипосульфита, израсходованного для титрования крахмала в опыте, мл.

V-объем крахмала использованного для его осаждения (5 мл)

T-поправка к титру раствора 0,1 н гипосульфита.

H-масса растительного материала, взятого для опыта, в граммах

Реактивы: 0,25 н бихромат калия, 80 % ный раствор азотнокислого кальция, 0,5 % ный раствор йода, раствор 0,1 н гипосульфита.

Определение крахмала в зеленых листьях растений

Крахмал можно определить исключительно в зеленых листьях, в пожелтевших листьях из-за отсутствия хлорофилла не синтезируется крахмал.

Порядок работы:

Берут 2 пробирки, в одну из них помещают зеленый лист растения, во вторую - пожелтевший лист. В обе пробирки вливают 1-2 мл дистиллированной воды и кипятят 2-3 минуты.

Затем горячую воду выливают и вместо нее вливают 1 мл этилового спирта. Пробирки на 3-5 минут ставят в кипящую водяную баню и в каждую минуту взбалтывают. Хлорофилл в зеленом листе и ксантофилл в желтом листе переходят в спирт, и лист обесцвечивается. Спиртовый экстракт вливают в отдельную посуду. А в пробирку с обесцвеченным листом еще вливают по 1 мл спирта, 3-5 минут разогревается в водяной бане. Спирт вливают в посуду наверху, обесцвеченный лист несколько раз промывают дистиллированной водой.

После этого в каждую пробирку вливают по 3-4 мл дистиллированной воды, ставят к кипящую водяную баню для размягчения листовых тканей.

Через 5-10 минут воду выливают и листья переносят в отдельные пронумерованные фильтровальные бумаги, затем закапывают 3-4 капли 1 % ного раствора йода. Если в листе есть крахмал, постепенно появляются синие точки и поверхность листа посинеет.

Реактивы: этиловый спирт, 1% ный раствор йода, лист растения.

Определение глюкозы и других восстановительных сахаров в экстракте лука

При нагревании водного экстракта репчатого лука реактивом фелинга сначала образовывается (I) гидроксид меди желтого цвета, затем - (I) оксид меди красного цвета. Данная реакция основана на наличие в экстракте других веществ, обладающих свойством восстановления к глюкозе.

Порядок работы: Репчатый лук через терку или другим способом тщательно измельчают. Из приготовленной массы в пробирку помещают 0,5 г, сверх этого вливают 2 мл дистиллированной воды и кипятят 3-4 минуты. Затем фильтруют через фильтровальную бумагу. Берут 10 капель фильтрата, с помощью фелинговой реакции определяют наличие восстанавливающих сахаров. Вместо лука можно использовать морковь.

Реактивы: фелинговая жидкость, лук.

Определение количества растворимых углеводов методом Хагедорн-Иенсена

С помощью этого метода можно определить глюкозу и другие углеводы, обладающие свойством восстановления, содержащиеся в различных биологических объектах. В результате реакции углеводы, окисляясь в щелочной среде, восстанавливаются до красной кровяной соли.

- 1) $C_6H_{16}O_6 + 2K_3[Fe(CN)_6] + 2KOH \leftrightarrow C_6H_{12}O_7 + 2K_4[Fe(CN)_6] + H_2O$
- 2) $2K_3[Fe(CN)_6] + 2KJ \rightarrow 2K_4[Fe(CN)_6] + J_2$
- 3) $2K_4[Fe(CN)_6] + 3ZnSO_4 \rightarrow K_2Zn[Fe(CN)_6] + 3K_2SO_4$
- 4) $J_2 + 2Na_2S_2O_3 \leftrightarrow 2NaJ + Na_2S_4O_6$

Реактивы: 0,2 н раствор едкого натрия, 5% ный раствор сернокислого цинка, 0,1 н раствор углекислого а натрия, 0,005 н раствор ферроцианида калия, 0,0005 н раствор гипосульфита.

Порядок работы:

Берут 1 грамм растительного материала алоэ, намальывают в ступке с 5-10 мл дистиллированной воды до получения однородной массы. Затем вливают пробирку или в колбу с маленьким объемом. Ступку 2-3 раза промывают 3-5 мл дистиллированной воды и добавляют в предыдущий раствор. Объем общего раствора в пробирке или колбе не должен превышать 10-15 мл. Для того, чтобы полностью отделить растворимые углеводы, пробирку или колбу кипятят 30 минут в водяной бане при температуре 70–80°C, добавив 3 мл 0,2 н раствора едкого натрия и 2 мл 5% ного раствора сернокислого цинка, кипятят в течение 3 минут. В результате белки, содержащиеся в смеси, падают в осадок. Смесь фильтруют в мерную колбу с объемом 50мл. После охлаждения фильтрата, его общее количество дистиллированной водой доводят до мерной отметки. Берут две колбы, в каждую вливают по 2-5 мл фильтрата в зависимости от количества углевода в составе исследуемого материала. Сверх него вливают 8-11 мл воды и общий объем доводят до 13 мл. Сверх него вливают 2 мл раствор ферроцианида калия. Точно таким же способом готовят 2 контрольные колбы. При этом сверх 13 мл дистиллированной воды добавляют 2 мл раствор ферроцианида калия. Затем колбы опускают в кипящую водяную баню на 15 минут. Как и в других способах, основанных на восстановительные свойства углеводов, в составе исследуемых растительных материалов, и в этом способе следует в точности соблюдать время, указанное для кипячения. По истечении времени, колбы сразу снимают и охлаждают с помощью холодной воды. Сверх охлажденный раствор добавляют 3 мл сложной смеси (KJ, ZnSO₄, NaCl) и 2 мл 3% ной смеси уксусной кислоты. При этом выделенный йод с помощью раствора

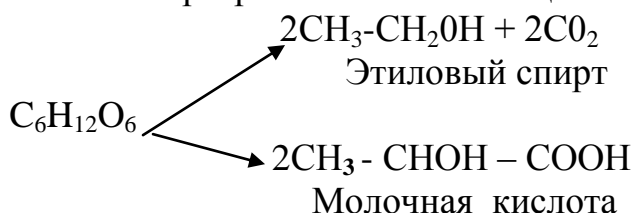
гипосульфита титруется до получения желтого цвета. Затем в смесь добавляют по 2-3 капли 1% ного раствора крахмала и продолжают титровать до бесцветного состояния. В зависимости от количества гипосульфита, израсходованного для титрования, по таблице определяется количество глюкозы.

Разность числа, найденного в составе контрольного раствора, от числа, найденного по опыту, дает количество углеводов со свойством восстановления в составе раствора, взятого для проверки. После этого вычисляется количество углеводов с объемом, взятым для проверки. Процентное количество углеводов в исследуемом растительном материале находят по следующему: x -количество восстановленного углевода в составе исследуемого материал (в %), H -количество навески (в г), a – общее количество углеводов, находящееся в опытном раствора (в %)

$$x = \frac{a \cdot 100}{H}$$

Окисление глюкозы в мышечных тканях в бескислородных условиях (гликолиз)

Окисление глюкозы в тканях в бескислородных условиях называется гликолизом. Если субстрат окисления гликогеновый, то называется гликогенолизом. Анаэробное расщепление моносахаридов в организмах человека и животных заканчивается образованием молочной кислоты. А в растениях и микроорганизмах в этом процессе образовывается этиловый спирт:



Все ферменты, участвующие в процессе гликолиза, найдены в растениях и большинство из них выделены в чистом виде.

Таблица для вычисления количества глюкозы по Хагедорн — Иенсен

Гипосульфид, в мл										
	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234

0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Порядок работы

1. Приготовление раствора для брожения: в проверочные и контрольно-опытные пробирки вливают по 3 мл раствора рН8,0 буфера фосфата и 1 мл 1% ного раствора глюкозы и перемешивают. Во вторую пробирку, чтобы остановить ферментативную реакцию, вливают 1 мл раствора 10 % ного ТХУК. Сверх раствора помещают 1 г мышечного фарша. Растворы перемешивают и с целью ограничения их взаимодействия с кислородом покрывают 10 каплями вазелинового масла. В термостат с 37⁰ С ставят на целых 1,5 часа.

2. Погружение белков. Пробирки снимают с термостата и чтобы остановить реакцию, в первый контрольный раствор вливают 1 мл раствора 10 % ного ТХУК. В результате белки падают в осадок. Растворы фильтруются в другую чистую пробирку.

3. Осаждение углеводов. В очищенный от белков фильтрат углевода вливают 1 мл раствора полунасыщенного сернокислого меди и помещают 0,5 г соли едкого кальция. Пробирки плотно закрывают крышками и взбалтывают 15 минут. Затем растворы пропускают через намоченную фильтровальную бумагу. Таким путем убирают лишнее количество глюкозы.

4. Определение молочной кислоты: пробирки с фильтратом охлаждают в ледяной бане и в них постепенно закапывают концентрированную серную кислоту. Во время закапывания пробирки взбалтывают. Нельзя допустить нагрева смеси. Чтобы ускорить окисление молочной кислоты, пробирки размещают в кипящую водяную баню на 4 минуты. По истечении времени пробирки охлаждают в ледяной бане. В охлажденную смесь накапают 1-2 капли 0,1 % ного спиртового раствора вератраля и медленно взбалтывают несколько минут. В первой пробирке, по причине того, что реакция гликолиза прошла под воздействием мышечных ферментов, молочная кислота образует темно-розовый цвет. А в контрольной пробирке молочная кислота до начала опыта приобретает светло-розовый цвет.

Реактивы: раствор буфера фосфата рН₄, раствор глюкозы, 10% ный раствор уксусной кислоты, полунасыщенный раствор сернокислый меди, соль едкий кальция, концентрированная серная кислота, 0,1 % ный раствор вератраля.

Определение неорганического фосфора в процессе брожения

В процессе окисления глюкозы появляются промежуточные продукты - фосфорлированные соединения гексозы и триозы, а также АТФ. В связи с тем, что фосфорирование зависит от связи неорганического фосфора, снижается его содержание в растворе. Количество неорганического фосфора можно определить образовыванием комплекса молибдата фосфора и его восстановления до молибденовой соли.

Поядок работы.

1 г промытых и сушеных дрожжей перемешивают с 1 г сахарозы или глюкозы 5 мл воды, измельчают. Измельченную смесь берут в пробирку и в нее вливают 5 мл раствора фосфата и опять перемешивают. Берут 1 мл смеси и переносят в пробирку с 1 мл раствором (это считается пробной проверкой). Остальную часть смеси помещают в термостат с температурой 37 °С. В отдельную пробирку вливают 1 мл раствора ТХУК, время от времени добавляют в нее заквашенной смеси из термостата.

В первую пробирку через 30 минут, во вторую - через 60 минут, а в третью - через 90 минут помещают по 1 мл закваски. В четвертую пробирку тоже помещают 1 мл закваски. После того как белки закваски упали в осадок, раствор каждой пробирки пропускают через фильтровальную бумагу. Определяется аниорганический фосфат в составе небелкового фильтрата.

Определение неорганического фосфата

Из каждого вышеуказанного небелкового фильтрата в чистые пробирки помещают по 0,5 мл и в них добавляют по 1 мл раствора молибдата аммония с 1 мл. Сверху растворов вливают 8 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают, хранят 15 минут при комнатной температуре до появления цвета. Цвета растворов в пробирках сравниваются друг с другом.

Вопросы для подготовки кб - занятию

1. На чем основывается аэробное дыхание в растениях?
2. Из чего состоит крахмал?
3. Что такое пектиновые вещества?
4. Значение моносахаридов и дисахаридов в развитии растений.
5. Что такое полисахариды, какие сахара вы знаете?
6. Какие растения содержат больше углеводов?
7. Что такое инулин и целлюлоза, в каких растениях они содержатся?
8. Значение и задачи углеводов для растений.

Лабораторное занятие №7

Определение пектинового вещества в составе сельскохозяйственных и лекарственных растений

Цель занятия:

1. Изучить значение полисахаридов, их составные части.
2. Изучить, в какой класс углеводов входят пектиновые вещества.

3. Научиться определять пектиновые вещества, содержащиеся в растениях.

Вопросы, направленные на определенную цель

Задание 1

1. Для выполнения практических работ следует прочитать соответствующую литературу.

2. Уметь определять пектиновые вещества, содержащиеся в растениях.

3. Знать составные части пектиновых веществ.

Задание 2

1. Изучить, в каких формах бывают пектиновые вещества в составе растений.

2. Знать, в каких формах бывают растворимые пектиновые вещества, их применение в продовольственной промышленности.

Задание 3

Для достижения цели вам следует выполнять и знать следующие практические работы.

1. Определить, как извлечь пектиновые вещества от растений.

2. Определить количество пектиновых веществ.

Задание 4

Для правильной оценки полученных результатов вам необходимы знания по другим предметам.

1. Значение углеводов в теле растений.

2. Классификация углеводов.

3. Расщепление углеводов.

4. Какие углеводы часто встречаются и участвуют в процессе фотосинтеза.

Вопросы для проверки результатов полученных знаний

1. Разница между целлюлозой и инулином.

2. В какой форме бывают пектиновые вещества в растениях?

3. В чем растворяется протопектин, в какое состояние переходит растворимый пектин?

4. Какие кислоты входят в состав пектиновых веществ?

5. Источник пектиновых веществ в продовольственной промышленности.

6. С чем связано превращение нерастворимого пектина в растворимый при созревании плодов?

7. Значение пектиновых веществ и их применение.

Основные этапы определения

1. Выделение пектиновых веществ из растений.

2. Определение количества пектиновых веществ в растениях.

Извлечение пектиновых веществ

Пектиновые вещества можно выделять из плодов растений, клубней, корнеплодов и стеблей.

Прядок работы: Берут 25 г свежесобранных растительных материалов (картофель, яблоко, лимон, сахарная свекла), измельчают до однородной

массы с помощью кварцевого или стеклянного порошка. Массу помещают в конусообразную колбу с объемом 500 мл и сверх нее вливают 100 мл воды, разогретой до 45 °С. Колбу в водяной бане с температурой 45°С примерно на 30 минут оставляют и время от времени перемешивают. По истечении этого времени колбу закрывают каучуковой пробкой и в течение 15-20 минут сильно взбалтывают. После чего жидкость в колбе центрифугируется со скоростью 3000 оборотов в минуту в течение 10-15 минут и выделяется пектиновый прозрачный раствор. Для полного выделения пектиновых веществ осадок в стакане центрифуги промывают еще 2-3 раза 50-60 мл водой и каждый раз центрифугируется. Все растворы объединяют, доводят их объем до 250 мл. Количество растворимого пектинового вещества определяют путем анализа осадка.

Определение количества пектиновых веществ

Определение количества пектиновых веществ зачастую основан на их гидролизе и осадки в качестве пектата кальция.

Порядок работы:

В стакан или колбу с объемом 500 мл вливают 25 мл пектинового раствора, приготовленного вышеописанным способом, и, добавив 100 мл раствора 0,1 н натриевой щелочи, оставляют на 30 минут. За это время растворимый пектин охлаждается и превращается в натриевую соль пектиновой кислоты. Затем добавляют 50 мл 1н раствора уксусной кислоты и получают свободную пектинатную кислоту.

В пектинатную кислоту, полученную этим путем, через 5 минут добавляют 50 мл 2 н раствора кальция хлорида. При этом кальций пектат падает в осадок. Осадок предварительно процеживают через фильтровальную бумагу. Осадок до удаления ионов хлора промывают водой. Удаление ионов хлора определяют по проявлении отрицательной реакции с 1% ным раствором нитрата серебра. Затем фильтровальную бумагу с осадком помещают в бюкс и на термостате при температуре 100° С до приобретения массой постоянного веса. Пектатную кислоту определяют по следующему

$$X = \frac{a \times v \times 92}{c \times v}$$

Здесь:

X-количество пектатной кислоты (в процентах).

a-количество найденного кальция пектата.

C-количество исследуемого растительного материала в граммах

V-объем раствора, взятого для намыливания и осадки кальция пектата.

v-первоначальный объем пектинового раствора

92-коэффициент вычисления (в процентах), данная цифра взята до 8% равенства количества кальция в составе кальция пектата.

Пример для вычисления

Берут 100 г стеблей кенафа, измельчают и помещают колбу с объемом 500 мл (v), дистиллированной водой наполняют до мерной отметки. Для

определения пектинового вещества берут 25 мл фильтрата. Постоянная масса пектата кальция равна к 0,0370 г (а). Здесь:

$$X = 0,0370 \cdot 500 \cdot 92 \cdot 0,68\% \cdot 100 \cdot 25$$

Реактивы: 0,1 н раствор едкого натрия, 2 н раствор кальция хлора, 1% ный раствор нитрата серебра.

Вопросы для подготовки к 7 -занятию

1. Как распространены липиды во всех частях растений?
2. Классификация и значение липидов.
3. Расщепление липидов в теле растений.
4. Окисление глицерина.
5. Окисление масляных кислот.

Лабораторное занятие № 8

Определение количества общего масла (триглицеридов) в составе сельскохозяйственных и лекарственных растений

Цель занятия:

1. Изучить пути распространения липидов в растениях.
2. Изучить, что называется сырым жиром.
3. Научиться определять количество общего жира.

Природные органические соединения, широко распространенные во всех частях растений, не растворимые в воде, но растворимые в органических растворителях - в эфире, ацетоне, бензоле, хлороформе и других, называются липидами.

Липиды являются производными высокомолекулярных масляных кислот, которые состоят из двух основных групп. В первую группу входят настоящие липиды, состоящие из масляных кислот, глицерина и других веществ, во вторую группу - по своей растворимости похожие на масла другие соединения - липиды.

Масла и маслоподобные вещества, содержащиеся в растениях, могут накапливаться запасом или составлять структурные компоненты клетки. Запасные и протоплазматические масла выполняют различные биохимические функции.

Липиды, в зависимости от химического состава, строения и функции в организме, делятся на: масла, фосфатиды воска, гликолипиды.

Масел очень много в составе растений, и встречаются исключительно как запасное вещество. Растительные масла называются жирами. Жиры встречаются практически во всех частях растений. Обычно, их немного в вегетативных органах, чем в плодах и семенах. Например, если в листьях и корнях растений жиры составляют около 2 % их сухого вещества, то в плодах и семенах - превышают 50%.

Масла являются сложными эфирами, образовавшимися высокомолекулярными масляными кислотами вместе с трехатомными спиртами. Поэтому составленные таким образом масла называются еще и триглицеридами.

Все масляные кислоты, которые встречаются в растениях, состоят из насыщенных и ненасыщенных масляных кислот. Ненасыщенные масляные кислоты являются самыми распространенными масляными кислотами и часто встречаются в растительных жирах. К ним относятся линолатная и линоленатная кислоты. Установлено, что более 60% запаса растительных жиров по миру составляют олеинатная и линолатная кислоты. К насыщенным масляным кислотам, которые часто встречаются в растительных жирах, относятся пальмитатная и лаурилатная кислоты. Наряду с ними, в составе растений хоть частично имеются ацетат, пропионат, жирная кислота, валерианат и другие кислоты, которые встречаются в свободном состоянии.

Для определения жиров в растительных органах, в частности в составе семян, они прежде всего с помощью диэтилового эфира экстрагируются. При этом в эфирный экстракт переходят различные липиды.

Поэтому этот экстракт называется сырым маслом, так как в составе сырого масла наряду с настоящими липидами встречаются также фосфатиды, стеролы, воски и другие.

Вопросы, направленные на определенную цель

Задание 1

1. Для выполнения следует знать соответствующую литературу.
2. Уметь определять сырые жиры.
3. Уметь определять количество общего жира.

Задание 2

Для достижения цели вам следует выполнять и знать следующие практические работы.

1. Определять общие жиры в теле растений.
2. Определять сырые жиры в растительных органах.

Задание 3

Для правильной оценки полученных результатов вам необходимы знания, усвоенные по другим предметам.

1. Значение липидов в теле растений.
2. Классификация липидов.
3. Расщепление липидов, в каких растениях встречаются липиды.

Вопросы для проверки результатов полученных знаний

1. Липиды какие вещества?
2. На какие группы делятся липиды?
3. Биологические задачи липидов.
4. От чего зависит качество растительных жиров, как оно определяется?
5. Насыщенные и ненасыщенные масляные кислоты. Их различия и значение.
6. Как определяют общее количество жиров?
7. Роль жиров в теле растений.

Основные этапы определения

1. Определение количества общего жира в составе растений.
2. Определение количества жира в составе растений по методу Сокслета.

Определение количества общего жира в составе сельскохозяйственных и лекарственных растений

Если не требуется изучение физико-химических особенностей отделенных жиров и необходимо определить лишь общее количество жира, то количество жира определяют, смотря на разницу массы материала до и после экстрагирования.

Порядок работы:

1,0-1,5 г растительного материала (косточка персика, ядро, миндаль, ядро ореха) взвешивают на весах и тщательно намалывают в форфоровой ступке. Затем взвешивают на весах и помещают в пакеты с определенной массой. Пакеты следует пронумеровать. Растительный материал взвешивают вместе с пакетом, из него вычитается масса пакета и определяется масса образца. Полученная масса растения зависит от количества жира в его составе. Если в растительном материале имеется свыше 50 % жира, то получают 1,0- 1,5 г, от 30 % до 50 % - 2,0-2,5 г, меньше 30 % - 3,0-3,6 г. Пакет с материалом помещают в пакет еще больше и опускают в колбу с объемом 250 мл. В колбу вливают 50-60 мл хлороформа и 50-60 мл метанола. Колбу герметично закрывают и на следующем занятии пакет с обезжиренным материалом вынимают из колбы и 2-3 раза промывают хлороформом, затем сушат в шкафу с дымоходом. После этого пакеты в течение 1-1,5 часа сушат в термостате при температуре 100-105°C. Высушенные пакеты помещают в бюкс, охлаждают в эксикаторе в течение 30-45 минут и взвешивают. Если в пакетах появляются желтые или коричневые пятна, то это свидетельствует о том, что жиры не очищены полностью. Это требует заново повторить опыт. Для определения количества жира относительно абсолютно сухого вещества, следует также определять и количество воды в исследуемом материале. Результаты опыта пишут на таблицу.

Процентное количество жира в составе исследуемого материала определяется в зависимости от разницы массы до и после экстракции. Процентное количество жира следующее:

$$X = \frac{(a - b)100}{B}$$

X-количество жира в составе исследуемого материала в процентах.

a-масса материала до экстракции, г.

b-масса материала после экстракции, г.

B-масса полученного образца, г.

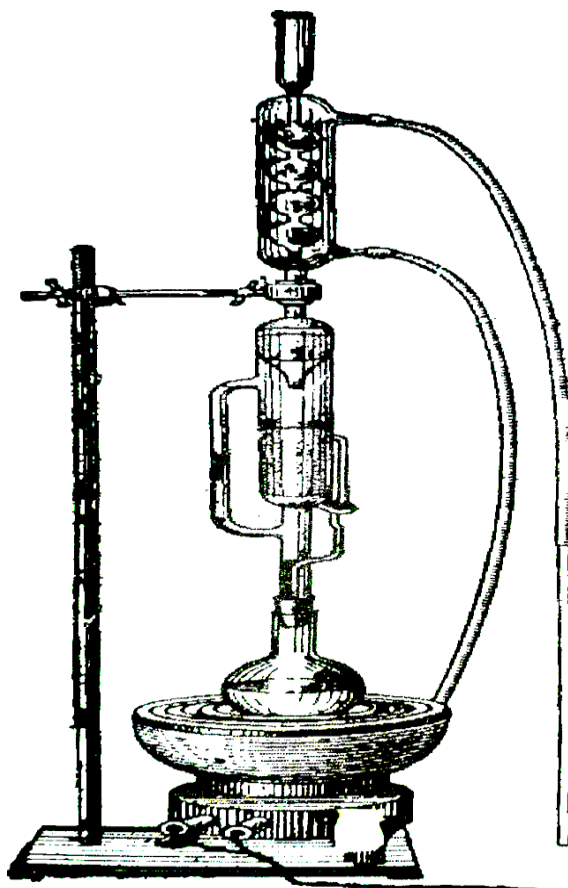
Реактивы: материал лекарственного растения, косточка персика, ядро, хлороформ, метанол.

Определение количества жира в составе сельскохозяйственных и лекарственных растений по методу Сокслета

Этот метод широко применяется при определении количества жира. Он основан на отделении жира от растительных материалов с помощью различных органических растворителей.

Порядок работы:

Семена растений, например семена подсолнечника, клещевины очищают от скорлупы, ядро сушат до одинаковой массы и измельчают, помещают в 5-10 г бумажные пакетики. Пакеты должны с легкостью поместиться в аппарат Сокслета. Затем пакет в течение 2 часов сушат при температуре 90-100°C, охлаждают и помещают в эксикатор (г). Аппарат Сокслета состоит из колбы, в которую вливают растворитель (3), эксикатора (г) и охладителя воды (1).



5-Рисунок. Аппарат Сокслета

В предварительно взвешенную и с определенной массой колбу вливают эфир, равный $\frac{2}{3}$ - $\frac{3}{4}$ части ее объема и присоединяется с эксикатором. После присоединения холодильника начинает работать водяная баня.

Температура водяной бани должна быть такой, что при этом каждый час эфир должен 8-10 раз полностью промыть растительный материал. Обычно температура водяной бани бывает около 40-45°C. Полное отделение жира зависит от количества жира и продолжается 6-10 часов. После того как жир полностью отделился, колбу снимают с аппарата, эфир отгоняют и сушат колбу, сушат в шкафу при 90-100°C. Потом еще раз взвешивают и определяют количество жира.

$$X = (A-B) \cdot 100 B$$

X-количество сырого жира в процентах.

А-масса колбы с жиром, г.

Б-масса сухой колбы, г.

В-масса растительного материала, г.

Реактивы: материал лекарственного растения и эфир.

Определение кислотного числа льняного масла

Число, обозначенное миллиграммовым количеством едкого калия, израсходованного для нейтрализации свободных масляных кислот, содержащихся в 1 г, называется кислотным числом масел. Это число считается одним из важных показателей, определяющих качество масел.

Порядок работы:

Берут 2 колбы, в первую вливают 3 – 5 г льняного масла и 15 – 20 мл смеси спирта – эфира, а во вторую - только 15 – 20 мл смеси спирта – эфира. Колбы тщательно взбалтывают, закапают 2 – 3 капли фенолфталеина. Затем с помощью спиртового раствора едкого калия в течение 0,5 – 1 минут титруется до получения светло-розового цвета. Кислотное число определяется по следующей формуле:

$$X = \frac{T(a - b)}{H}$$

X - кислотное число;

T - поправка;

a - количество щелочи, израсходованное для опыта(в мл).;

b - гипосульфит калия, израсходованный для контроля(в мл).;

H - количество использованного масла (в г).

Реактивы: очищенное льняное масло, спиртовой раствор, раствор фенолфталеина.

Определение йодового числа льняного масла

Число, обозначенное граммовым количеством масла, прикрепившего 100 г масла, называется йодовым числом масел. Это число обозначает уровень ненасыщенности масляных кислот, входящих в состав масел. Чем больше йодового числа, тем более жидкое масло, обычно жидкие масла не возможно использовать в качестве продукта питания.

Порядок работы

В хорошо высушенную чистую колбу (250 мл) вливают 0,1 — 0,2 г (2 — 5 капель) очищенного льняного масла. Масло не должно касаться стен колбы. В колбу вливают 25 мл спирта. Если масло плохо растворяется в спирте, то немного нагревают. Во вторую колбу вливают только 25 мл спиртового раствора. В обе колбы вливают по 12,5 мл йодного раствора с 0,2 N и тщательно перемешивают, добавляют 100 мл воды и еще раз перемешивают. Через 5 — 10 минут с помощью гипосульфита с 0,1 N титруется до получения светло-желтого цвета. Разница в количестве гипосульфита калия с 0,1N, израсходованного для опыта и контроля, считается показателем йодового числа полученного масла. Йодовое число определяется по следующей формуле:

$$\text{Йодовое число} = \frac{(a - b)T \cdot 0,01269 \cdot 100}{H}$$

a - гипосульфит калия, израсходованный для опыта, в мл ;

b - гипосульфит калия, израсходованный для контроля, в мл;

T-поправка;

0,01269 –коэффициент, превращающий израсходованное количество гипосульфита калия в количество йода;

H – количество масла в граммах.

Реактивы: льняное масло, 96 % ный раствор этилового спирта. спиртовый раствор йода, 0,1N раствор гипосульфита, 2 % ный раствор крахмала.

Лабораторное занятие № 9 ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ.

Определение общей кислотности растений (по модификации А.Зикиряева и П.Мирхамидовой)

Определение общей или титрирующей кислотности растений основывается на титрование с щелочью всех свободных органических кислот в составе водных экстрактов, отделенных от них, и их солей. Это достигается применением определенных индикаторов. Обычно, результат титрования обозначается процентным количеством основной органической кислоты, часто встречающейся в данном объекте.

Порядок работы: Берут, взвесив, 10-20г растительного материала какого-либо цитрусового растения (лист, плод, семя или другие органы) и в фарфоровой ступке, добавив 2-10 мл воды, с помощью стеклянного порошка намалывают до получения однородной массы.

Образовавшуюся массу с помощью 50мл воды вливают в мерную колбу с объемом 200 мл и дистиллированной водой наполняют до отметки, оставляют на 1 час. По истечении времени, берут 50 мл экстракта фильтрата и вливают в колбу с объемом 100 мл. В колбу добавляют несколько капель спиртового раствора фенолфталеина, титруется 0,1 N раствором едкого натрия до получения светло-розового цвета. Если фильтрат цветной, то титрование с тимолфталеином дает хороший результат. При этом титруют до образования синего цвета. Цветные фильтраты можно титровать фенолфталеином, но не до образования розового цвета, а вообще до изменения цвета - до появления зеленого цвета или обесцвечивания. Во время нейтрализации явно видно изменение цвета. Цветные экстракты рекомендуют титровать, сравнивая со стоящей рядом колбой, в которую на капан точно в таком же объеме фильтрат и фенолфталеин.

Если фильтрат слишком темного цвета и невозможно их титровать в зависимости от изменения цвета, то можно титровать с помощью рН-метров. Потенциометрическое титрование останавливают, когда равно к рН. Общая кислотность исследуемого растительного материала обозначается

количеством щелочи с 0,1 Н, израсходованного для титрования 100 г сухого растительного материала, или миллиграммовым количеством органической кислоты, которая в большом количестве встречается в составе данного продукта:

$$X = \frac{a \times T * K \times 100}{H \times 50}$$

X - кислотность исследуемого растительного материала в процентах;

a - количество едкого натрия с 0,1 Н, израсходованного для титрования, мл;

T - поправка к титру;

V - объем общего экстракта, мл. Количество фильтрата, взятого для 50 титрований, мл;

H - вес растительного материала, г;

K - коэффициент вычисления по органической кислоте, встречающейся часто.

Пример. Экстракт 20 г растительного материала доводят до 200 мл. Для титрования берут 50 мл прозрачного фильтрата. На это расходуется 3,5 мл щелочи. Титр щелочи равен к 0,990. Кислотность определяют по малатной кислоте. Тогда вышеприведенная формула приобретает следующий вид.

$$X = \frac{3,50 \times 0,9900 \times 200 \times 0,0067 \times 100}{20,0 \times 50} = 0,469\%$$

Реактивы: 0,1 Н раствор едкого натрия, индикатор фенолфталеина (1г фенолфталеин растворяют в 60 мл этиловом спирте, доводят водой)

Определение цитратной кислоты (по модификации А.Зикиряева и П.Мирхамидовой)

Берут 50 мл фильтрата или центрифугата, приготовленного в предыдущей работе, вливают в колбу с объемом 200 мл и добавляют 5 мл 30% ного раствора соли бромидка калия, 10 мл смешанного раствора серной кислоты с водой в соотношении 1:1. Смесь хорошо взбалтывается и сверх нее добавляется еще 20мл 5% ного раствора соли перманганата калия. Колбу на 10 минут оставляют в шкафу с дымоходом. Если бурый осадок оксида (II)- марганцев результате реакции начинает терять цвет, опыт повторяют, и рекомендуется взять больше раствора перманганата натрия. В конце реакции добавлением 20 мл насыщенного раствора лишнего окислительного вещества сернокислого (II)-железа восстанавливается до бесцветного состояния. Чтобы пентабром ацетата упал в осадок, образовавшегося в результате реакции, колбу на 12-18 часов оставляют в холодильнике. Затем пропускают через фильтр, осадок в фильтре промывают 3-4 раза ледяной водой до достижения воды нейтрального состояния (с помощью метилоранжа). Хорошо промытый осадок бывает белым или имеет немного цветной вид.

Осадок пентабромацетата помещают в фарфоровый тигель, масса которой предварительно определили, и сушат на эксикаторе, куда переместили серной кислоты. Высушенный осадок взвешивается в тигеле.

Если от него отнять массу тигели, станет известным вес осадка. 1 мг пентабромацетаты равен к 0,483 мг цитратной кислоты.

Реактивы: 30% ный раствор бромиды калия, 48% ный раствор серной кислоты, 5% ный раствор перманганата калия, насыщенный раствор сернокислого (II)-железа.

Вопросы для подготовки к 9-занятию

1. Органические кислоты, строение, свойства и их значение в процессе дыхания.
2. Значение органических кислот в жизни растений.

Лабораторное занятие № 10

Нуклеиновые кислоты, строение, свойства

Виды переноса генетической информации

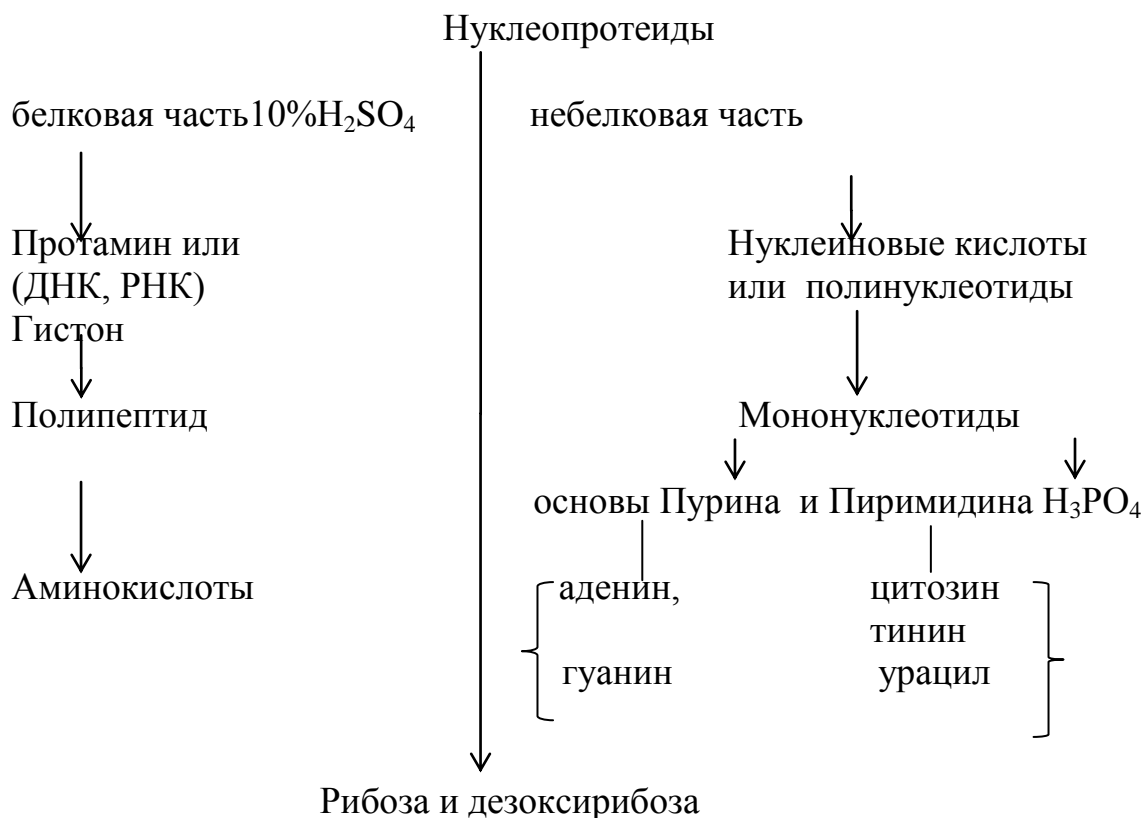
1. Изучить нуклеиновые кислоты, их строение и свойства.
2. Изучить составление генома.
3. Изучить изменения, мутации и рекомбинации в хромосомах.
4. Изучить генную инженерию.
5. Научиться отделять нуклеопротеиды и их гидролиза.

Нуклеиновые кислоты являются высокомолекулярными соединениями, обладающими очень большим молекулярным весом. Такие жизненно важные процессы, как переход генетических признаков в живых организмах от поколения к поколению, биосинтез белков связаны с деятельностью нуклеиновых кислот. Поэтому в последнее время уделяется большое внимание изучению нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты в 1869 году открыл швейцарский ученый Фридрих Мишер. В связи с тем, что эти кислоты впервые были отделены от ядра клетки, им дали название нуклеиновых кислот (нуклео - ядро).

При гидролизе нуклеиновые кислоты расщепляются на азотные основы пурина и пиримидина, до пентозы и фосфорной кислоты. Нуклеиновые кислоты по свойству углеводов в своем составе делятся на дезоксирибонуклеиновые (ДНК) и рибонуклеиновые (РНК) кислоты.

Нуклеиновых кислот бывает больше в быстро растущих и развивающихся органах. Например, нуклеиновые кислоты часто встречаются в листьях и на точке роста стебля молодых растений. А также в зародыше зерна, пыльнике цветка, на кончиках корней тоже много встречаются нуклеиновых кислот.



Нуклеиновые кислоты обладают свойством чрезмерной кислотности, многие их части соединены с белками. При выделении этих кислот прежде всего следует порвать связи между ними и белками. Для этого используют несколько методов. В настоящее время широко применяется метод выделения нуклеиновых кислот с помощью фенола. Этот метод осуществляется с участием веществ, подвергающих белки денатурации (например, додецилсульфат натрия под воздействием высокой температуры). При этом белок, подвергшийся денатурации переходит в фенольную часть, а нуклеиновая кислота - в часть с водой. После чего нуклеиновая кислота с помощью этилового спирта падает в осадок.

Нуклеиновые кислоты под воздействием своеобразных ферментов, кислот, щелочей и других химических соединений расщепляются на простые структурные единицы. Эти структурные единицы включают из азотовых основ пуриновые и пиримидиновые основы, из компонентов углеводарибозу и дезоксирибозу, а также фосфатную кислоту.

В каждом живом организме существуют оба вида нуклеиновых кислот - рибонуклеиновая кислота (РНК) и дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Только вирусы поймают один их вид ДНК, или РНК. Нуклеиновые кислоты вместе с белками составляют материальную основу жизни. Они всесторонне тесно взаимосвязаны друг с другом, но их место и функция в клетке глубоко различаются: белки, в основном, являются материалом строения и внутренних органов клетки, а нуклеиновая кислота обеспечивает хранение, повторение, обмен, перенос от поколения к поколению информации, относящейся к строению, росту, хранению организма.

Информация из далеких предков, не прервавшаяся в течение миллиардов лет, осуществляется в процессе взаимодействия этих двух видов

биополимеров. Если смысл жизни заключается в сохранении поколений, самоповторении, то этот процесс осуществляется в форме последовательного порядка нуклеотидов в нуклеиновой кислоте при переносе информации, написанной в химическом языке, в белковой молекуле в порядок аминокислот. Значит, символический приказ нуклеиновой кислоте выражается в реальных белках организма. А белок устанавливает и морфологию, и функцию любой клетки.

Значит, биологическая роль нуклеиновых кислот безгранично велика. Все нуклеиновые кислоты являются высокомолекулярными соединениями. Если молекулярная масса самого младшего представителя около 25 тысяч, то у старших доходит до 1 млрд. Молекулы ДНК входят в самый большой молекулярный ряд в клетке.

В изучении РНК и ДНК в последние годы достигнуто удивительных успехов, на основании этих сведений можно предположить, что придет время изменять, исправлять гены организмов, создать новые генные комплексы, то есть искусственным путем создать новые организмы.

Вопросы. Направленные на определенную цель

Задание 1

1. Для выполнения практических работ следует прочитать соответствующую литературу.
2. Уметь выделять нуклеопротеиды.
3. Уметь определять белки.
4. Уметь определять основы Пурина.
5. Уметь определять рибозу и дезоксирибозу.
6. Уметь определять фосфатную кислоту.

Задание 2

Для достижения цели вам необходимо выполнять и знать следующие практические работы.

1. Уметь выделять нуклеопротеиды.
2. Определять составные части нуклеопротеидов.

Задание 3

1. Для правильной оценки полученных результатов вам необходимы ваши знания по другим предметам.
2. Строение, свойства и составные части нуклеиновых кислот.
3. Уровни строения ДНК и РНК.
4. Механизм репликации.
5. Виды копирования генетической информации.
6. Механизм транскрипции.
7. Механизм трансляции.
8. Строение хромосом и хроматинов.
9. Генетический код, их свойства.
10. Регуляция генной активностью.

Вопросы для проверки результатов полученных знаний

1. Строение нуклеиновых кислот и их физико-химические свойства.
2. Нуклеотиды и нуклеозиды, их строение и свойства.
3. Роль аденозинтрифосфата в энергетике клетки.
4. Репликация и транскрипция ДНК.
5. Биосинтез ДНК.
6. Полирибосомы и РНК.
7. Генотип. Хромосомы. Вирусы. Фаги.
8. Строение генома эукариотной клетки.
9. Управление генной активностью.
10. Геномные заболевания.
11. Генная инженерия.

Основные этапы определения

1. Выделение нуклеопротеидов.
2. Гидролизирование нуклеопротеидов.
3. Определение составных частей нуклеопротеидов.
4. Определение количества ДНК и РНК.
5. Выделение нуклеопротеидов и их гидролизация.

Выделение нуклеопротеидов основано на их растворение в щелочи и на и на падение в осадок под воздействием слабых кислот. Для изучения нуклеопротеидов зачастую используют бродильные грибы, которые при кислотном гидролизировании расщепляются на полипептиды, основы пурина и пиримидина, рибозу, дезоксирибозу и фосфатную кислоту. В результате образовавшиеся продукты определяются с помощью специальных реакций.

Порядок работы:

2 г бродильного гриба тщательно намалывают в фарфоровой ступке, добавив 2-4 мл дистиллированной воды. Для лучшего намалывания можно добавить стеклянный порошок. Закваску намалывают 1-2 минуты до получения однородной массы, добавляют 0,4 % ного раствора едкого натрия, намалывают в течение 10-15 минут.

Затем смесь в ступке пропускают через фильтр, в фильтрат добавляют 2-3 мл уксусной кислоты. При этом нуклеопротеиды падают в осадок. Осадок помещают в широкую пробирку, сверху добавляют 6-10 мл 10% раствора серной кислоты. Установленная в качестве холодильника стеклянная трубка длиной 25-30 см закрывают пробкой и в течение 1 часа в кипящей воде гидролизуют. Гидролизат используется при выполнении следующих работ:

Определение белков

В пробирку берем 1 мл гидролизата, сверх него добавляем 1 мл 20% ного раствора едкого натрия, 3-5 капель 2% ного раствора сернокислого меди. Затем ДНК дает фиолетовый цвет.

Определение основ Пурина

В пробирку берем 1 мл гидролизата, добавляя 5-7 капель 10% ного раствора аммиака, нейтрализуем. Определяется с помощью Лакмусной

бумаги. После этого, если добавим 0.5 мл 1% ного раствора нитрата серебра, то через 5-10 минут образовывается осадок.

Определение рибозы и дезоксирибозы

В пробирку вливаем 1 мл гидролизата, добавляем 1 мл 20% ного едкого натрия и 5-6 капель 2% ного раствора сернокислой меди, образовывается красный осадок.

Определение фосфорной кислоты

В пробирку берем 1 мл гидролизата, добавляем реактив молибдена в равном объеме инагреваем. Появление желтого цвета показывает наличие фосфатной кислоты.

Реактивы: бродильные грибы, эфир, 0,4 % ный раствор едкого натрия, 5% ный раствор уксусной кислоты, 5% ный раствор серной кислоты, 20 % ный раствор едкого натрия, 2% ный раствор сернокислого меди, раствор соли молибдата аммония в азотной кислоте.

Определение количества ДНК колориметрическим методом

ДНК с дезоксирибозой дифениламином в своем составе образовывает синий цвет. По причине прямой пропорциональности плотности цвета к количеству ДНК измеряется на фотоэлектроколориметре.

Паорядок работы:

Готовят одну опытную и одну контрольную пробирку. В первую вливают 1 мл водного раствора ДНК, во вторую - дистиллированную воду. В обе пробирки вливают по 2 мл реактива дифениламина, 10 минутпродерживают в водяной бане. Через некоторое время содержимое пробирок охлаждают и рассмотрят на фильтре красного луча ФЭК напротив контрольной жидкости. После установления оптической плотности исследуемой ДНК, из калибровочной кривой определяют ее количества.

Приготовление мерной кривой линии

В 3 пробирки вливают 1 мл 50–100–200 мкг/мл раствора ДНК различной концентрации и 2 мл реактива дифениламина, нагревают 10 минут в кипящей водяной бане. После охлаждения раствор фотоэлектроколориметрируют вышеописанным способом. Из установленной оптической плотности и количества ДНК составляют калибровочную кривую. К абсциссе осиприводится количество ДНК, к ординате оси - оптические плотности.

Определение количества РНК колориметрическим способом

Пентоза в составе РНК с реактивом орцина образовывает цветное соединение. Оптическая плотность цвета измеряется в колориметре и из калибровочной кривой устанавливают количество РНК.

Порядок работы:

В исследовательскую опытную пробирку вливают 1 мл раствора РНК 2 мл реактива орцина. А в контрольную пробирку 1 мл дистиллированной воды и 2 мл реактива орцина. Обе пробирки 20 минут продерживают в водяной бане. Через некоторое время растворы охлаждают,на фильтре красного луча ФЭК находят оптическую плотность. Напротив контрольной

пробирки количество РНК определяется по калибровочной линии.

Приготовление калибровочной кривой: в 3 пробирки вливают по 1 мл 50-100-200 мкг/мл раствора РНК и добавляют по 2 мл реактива орцина, нагревают в водяной бане, как описано выше, через 20 минут растворы охлаждают, на ФЭК определяют их оптическую плотность. К абсциссе оси приводят количество РНК, к ординате оси - оптическую плотность, составляется мерная кривая линия.

Реактивы:реактив Орцина, водный раствор РНК, реактив дифенил-амина, водный раствор ДНК.

Вопросы для подготовки к 10-занятию

1. Биологическое значение углеводов.
2. Функции углеводов в биотехнологии растений.
3. Классификация углеводов, их значение.
4. Биологическое значение липидов.
5. Размещение классификации липидов в растениях.
6. Строение, значение, свойства нуклеиновых кислот.
7. Виды переноса генетической информации, механизм.
8. Хромосомы, хроматины, полирибосомы.
9. Геномные заболевания.
10. Генная инженерия.

Лабораторное занятие № 11

Итоговое занятие по нуклеиновым кислотам. Виды копирования генетической информации, строение нуклеиновых кислот, их обмен.

Строение липидов, их обмен

Цель занятия:

По причине того, что данное занятие является итоговым, имея ввиду намеченные цели, следует обобщать знания студентов, полученные ими в процессе самостоятельного изучения.

Вопросы для проверки уровня знаний

1. Строение нуклеиновых кислот и их физико-химические свойства.
2. Нуклеотиды и нуклеозиды.
3. АТФ –роль в энергетике клетки.
4. Уровни структурного строения ДНК и РНК.
5. Репликация и транскрипция ДНК.
6. Биосинтез ДНК.
7. Генетический код, его свойства.
8. Генотип. Ген. Хромосомы. Вирусы, Фаги.
9. Геномные заболевания, генная инженерия.
10. Обмен углеводов, их расщепление.
11. Строение углеводов, их значение.
12. Биологические задачи углеводов.
13. Обмен липидов, их расщепление.
14. Классификация липидов, их строение, задачи.

15. Биологическое значение липидов.

16.

№ 12. Определение фосфора и других веществ в составе растений

Определение общего фосфора в составе растений (по модификации А.Зикиряева и П.Мирхамидовой)

В составе растений встречаются различные фосфорные соединения, состоящие в основном из неорганического и органического фосфора. Неорганические фосфаты наряду с выполнением задач буфера в тканях и клетках растений, являются основной формой транспорта, которая усваивается растениями и двигается по его телу. Вместе с этим они также считаются источником, образующим органические фосфаты.

Органический фосфор встречается в двух формах: растворимой в кислоте и нерастворимой в кислоте. Количество растворимых в кислоте фосфорных соединений можно определить у каждого по отдельности или же определить их общее количество.

При определении общего фосфора колориметрическим методом можно использовать ряд таких соединений, как эйкеноген, амидол, аскорбатная кислота и другие.

Порядок работы. Взвешивается 50-200 мг сухого растительного материала и сжигается в Кьелдалевой колбе с малым объемом. Для этого в колбу вливают 2-3 мл концентрированной серной кислоты и в течение 1-2 минуты тщательно перемешивают, затем постепенно, добавляя 0,2-0,3 мл H_2O_2 , продолжают нагревать. Как только жидкость в колбе обесцвечивается, реакцию останавливают. После этого еще раз в течение 15-20 минут сильно нагревают. То, что не изменился цвет жидкости в колбе, свидетельствует о завершении реакции. Затем колба охлаждается, содержимое вливается в колбу с ограниченным объемом в 100 мл и наполняется дистиллированной водой до отметки. Общий фосфор в смеси определяется колориметрическим методом.

Реактивы: растительный материал, концентрированный раствор серной кислоты, перекись водорода.

Определение количества фосфора с помощью эйконогена

Этот метод был предложен Фискева Суббароу и основан на образовании фосфатной кислоты с участием молибдата аммония в кислой среде фосфомолибдата аммония. Данное комплексное соединение вместе с эйконогеном образует синий цвет. Интенсивность цвета пропорциональна количеству фосфорной кислоты.

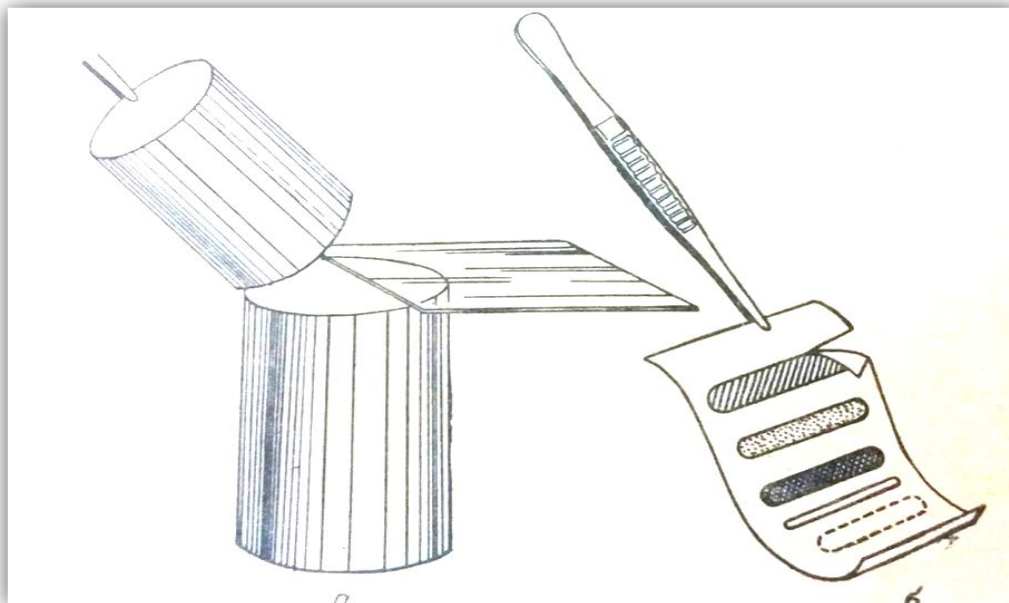
Порядок работы. Из смеси, приготовленной вышеописанным способом, 1 мл вливают в пробирку. Для нейтрализации добавляют по 2 капли эйконогена до появления розового цвета. Затем лишняя щелочь с 1 Н

серной кислотой нейтрализуется до исчезновения цвета. В пробирку вливают дистиллированную воду и доводят до 3,5 мл. А во вторую (контроль) пробирку добавляют 3,5 мл дистиллированной воды, 1 мл 1,25% ного раствора молибдена аммония серной кислоте в 2,5 Н, 1 мл 1,25% ного раствора эйконогена и тщательно перемешивают. В комнатной температуре оставляют на 30 минут. Цвет раствора, образовавшегося в результате реакции, измеряется на ФЭКе. Количество фосфора определяется по калибровочной линии.

Реактивы: 1% ный раствор фенолфталеино, 1 Н раствор серной кислоты, 1,25% ный раствор молибдиата аммония в 2,5 Н серной кислоте. Раствор эйконогена. 15 г гидросульфата натрия и 0,5 г сернокислого натрия. 70 мл дистиллированной воды фильтруют, водой доводят до 100 мл. Эйконоген (1,2,4-аминонафтолсульфонатная кислота).

Определение количества пигментов в растениях хроматографическим и колориметрическими методами

Необходимое оборудование для занятия: свежий или сухой лист растения, аналитические и висячие весы, фарфоровая ступка с пестом, кварцовый песок, Комов насос, Бунзенова колба с каучуковой пробкой, плотно закрывающей стеклянную посуду, стеклянный фильтр №3, мерные цилиндры, пробирка с объемом 10 или 25 мл, химический стакан с объемом 100-150 мл, пипетка в 5 мл, фотоэлектрокалориметр ФЭК –М с различными кюветами, хроматографическая бумага, разрезанная в размере 13 *16 см , 80% ный ацетон, смесь ацетона с этиловым спиртом (3 :1), смесь бензола и эфира петролей (2:1) , смесь эфира петролей и спирта(20 :1),сода (NaHCO_3) , штатив для пробирок, вата, вазелин , салфетки.



б-рисунок. Определение пигментов методом хроматографии на бумаге

Получение смеси пигментов из растительных тканей и выделение их на бумаге хроматограммы не отличается от метода, описанного в предыдущей работе. Для определения количества пигментов свежая растительная масса

взвешивается в точности в 1 мг и их пигменты отделяются друг от друга способом хроматограммы. Для этого используются различные растворители. Раствор (элюат), полученный с помощью этих растворителей, пропускают через колориметр, устанавливается их оптические плотности. Для этого, пользуясь нежеприведенным уравнением, определяется в мг, сколько и каких пигментов имеется в 1 г свежей или сухой массе растения.

$$C = \frac{F \cdot v^1 \cdot v^3 \cdot K}{P \cdot v^2 \cdot h}$$

C - количество определяемого пигмента, мг/г

F – показ ФЭКа (оптическая плотность)

V1- количество экстракта, мл

V2- количество экстракта, в которого накапана хроматограмма, мл

V3- количество элюат, мл

P- количество материала, полученного из растения, г

H- толщина кюветы, см

K- коэффициент, по исследуемому пигменту, бывает следующим:

Для хлорофилла *a* и *b* K- 33,3

Для каротина K- 6,24

Для лютеина K-6,64

Для вилоксантина K- 8,01

Определение количества хлорофилла *a* и *b*

Хлорофилл ацетоном выделяют из смеси этанола. Для этого взвешивают 400-500 мг (P), добавляют немного измельченного стекла, песка, соды и намалывают все вместе в ступке. Сверху вливают 5 мл смеси ацетона-этанола. Готовую смесь через стеклянный фильтр при помощи Комова насоса фильтруют в Бунзенову колбу. Оставшийся в фильтре остаток 2-3 раза мало-помалу промывают смесью ацетона – этанола. Затем раствор, прошедший через фильтр, вливают в цилиндр, прополоскав Бунзенову колбу, тоже вливают в цилиндр.

После этого устанавливается количество полученного общего экстракта v_1 . Раствор в цилиндре тщательно перемешивают, с помощью пипетки берут 2-5 мл экстракта v_2 , оставив под бумагой хроматограммы 1-2 см, вливают толщиной в 5 см. Затем эту бумагу сушат до испарения и до полного исчезновения растворителя. После этого заворачивают бумагу и помещают в посуду хроматограммы. В эту посуду сначала вливают 10-20 мл смеси эфира петролейного с этиловым спиртом (20 :1), сверху плотно закрывают стеклом или крышкой. Для выделения хлорофилла потребуется 20-30 минут. После полного выделения пигментов бумагу хроматограммы вынимают из банки и с помощью ножниц срежут по цвету, разделяя их друг от друга.

Затем, срезав бумагу в маленькие кусочки, помещают в химический стакан. В него вливаем также немного смеси ацетона со спиртом (3 :1), ждем до обесвечивания бумаги хроматограммы и раствор вливаем в пробирку.

Вычислив количество полученного эллоата v_3 , колориметруется в красном светофилтрезлектрофотокалориметра.

Определение каротиноидов

Каротиноиды (каротин, лютеин, виолоксатин) определяются из остальной 2-части материала, полученного из высших растений. Техника получения экстрактов и выделение пигментов хроматограммы, приготовление эллюции (раствор), методы ее колориметрирования сходны на вышеописанные методы определения количества хлорофилла. Но следует сказать, что при определении каротиноидов используют другие растворители. Для выделения из растительного материала каротиноидов используют 80% раствора ацетона. Выделение каротиноидов на бумаге хроматограммы проводят в смеси бензола с эфиром петролейным (2:1). Получение раствора (эллюции) проводят в смеси ацетона с этиловым спиртом (3:1). Колориметрирование проводят с помощью синего светофильтра.

Реактивы: 30% ный раствор бромида калия, 48% раствор серной кислоты, 5% ный раствор перманганата калия, насыщенный раствор сернокислого (II)-железа.

Вопросы для подготовки к 12- занятию

1. Задачи фосфора и пигментов в организме растений.
2. Определение количества фосфора в растениях.
3. Определение пигментов в растениях.
4. Значение фосфора в повышении урожайности растений и качества продуктов.

Лабораторное занятие № 13

Определение витаминов

Их задачи в организме растений

Цель занятия

1. Изучение строения, свойств витаминов.
2. Изучение количества аскорбиновой кислоты в растениях.
3. Изучение урожайности растений и качества продукции.
4. Научиться определять нитраты в растениях.
5. Научиться определять фосфор в биологических объектах.

Органические соединения с маленькими молекулами, необходимые для жизнедеятельности живых организмов и обычно, образующиеся в растениях и имеющие различное химическое строение, называются витаминами. Витамины считаются составной частью продовольственных продуктов, но по сравнению с основными питательными веществами — белками, углеводами, жирами требуются в очень малом количестве. Отсутствие витаминов в составе питательных веществ является причиной нарушения процесса обмена веществ, а это в свою очередь, подвергает организм тяжелым заболеваниям и даже приводит к смерти.

Как установил проф. К.Е.Овчаров, витамины - не второстепенные продукты в жизни растений, а являются важными биологическими веществами, активно участвующими в их росте и развитии. В некоторых растениях и в отдельных органах растений могут накапливаться один или несколько витаминов. Например, в овощах и фруктах в большом количестве могут накапливаться аскорбатная, фолатная кислоты и каротин. Вообще в растениях содержится очень мало витаминов, при определении которых приходится использовать специальные и предельно точные способы. Все витамины по своей растворимости делятся на 2 группы: витамины, растворимые в воде и витамины, растворимые в масле.

Вопросы, направленные на определенные цели

Задание 1

1. Для выполнения практических работ следует прочитать соответствующую литературу.

2. Знать, как построены витамины.

3. Знать о значении витаминов в теле растений.

Задание 2

1. Научиться определять урожайность растений и качество продуктов.

2. Знать о значении и задачах нитратов в растениях.

Задание 3

Для достижения цели вам следует выполнять и знать следующие практические работы.

1. Определять количество витаминов.

2. Определять нитраты в растениях.

3. Определять фосфор в растениях.

Задание 4

Для правильной оценки полученных результатов вам необходимы знания по другим предметам.

1. Витамины, растворимые в воде, их биологические задачи.

2. Витамины, растворимые в масле, их биологические задачи.

3. Усвоение растениями молекулярного азота.

4. Усвоение растениями нитратов.

5. Реакции усвоения аммиака.

Вопросы для проверки результатов полученных знаний

1. Биологическая роль витаминов.

2. Строение аскорбиновой кислоты, ее задачи в составе растений.

3. В каких растениях больше аскорбиновой кислоты?

4. Роль нитратов для растений.

5. Роль фосфора для растений.

Основные этапы определения

1. Определение количества витамина С.

2. Определение в растениях количества нитратов.

Определение количества витамина С

Витамин С (аскорбиновая кислота) в растениях содержится в большом количестве. Особенно в свежих фруктах (смородина, апельсин, лимон, шиповник) и овощах (болгарский перец, цветочная капуста, укроп) его очень много. Определение аскорбиновой кислоты основывается на ее восстановительное свойство.

Порядок работы:

Из растительного материала смородины или укропа берут 1-5 г, намалывают в фарфоровой ступке с помощью стеклянного порошка и, добавив 5 мл 1% ного раствора соляной кислоты, продолжают намалывать. Потом опять добвляют 15 мл раствора соляной кислоты и смесь вливают в мерную колбу с объемом 100 мл. Фарфоровую ступку промывают оксалатной кислотой и вливают в колбу. Затем содержимое колбы с помощью оксалатной кислоты взбалтывают до ограниченного объема, пропускают через фильтр.

В фильтрованной жидкости определяется количество аскорбиновой кислоты. Берут две колбы, в первую вливают 5-10 мл фильтрата, во вторую - 5-10 мл смеси соляной и оксалатной кислот (1:5) и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола с 0,001 н. Количество аскорбиновой кислоты определяется следующим образом:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 0,088 \cdot 100}{c}$$

Здесь:

X - количество аскорбиновой кислоты в растительном материале в процентах.

a - количество индикатора, израсходованного для опыта.

T - поправка, количество аскорбиновой кислоты, равное 0,088 - 1 мл 0,001 н раствору индикатора

C - количество взятого на исследование растения в граммах.

b - количество индикатора, израсходованного для контрольного образца.

Реактивы: растительный материал, 1 % ный раствор соляной кислоты, 1 % ный раствор оксалатной кислоты, раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола с 0,001 н.

Определение цистеина (витамин Р)

К веществам, обладающим активностью витамина Р, относятся соединения фенольной природы. К ним отосятся рутин, гесперидин, кварцетин и другие. Витамины в большом количестве встречаются в цветках и плодах растений.

Порядок работы.

Берут 2-5 грамма лимонной цидры и намалывают в фарфоровой ступке спиртом с помощью стеклянного порошка до образования однородной массы. До обесцвечивания массу промывают маленькими порциями спирта. Фильтрат спомощью спирта доводят до объема 50 или 100 мл. Затем спирт всмеси выделяют в колбе Вюрца. Остаток на дне колбы (3 — 5 мл) вливается

в фарфоровую чашку и спирт полностью отгоняют в водяной бане. Затем в чашку вливают 3 — 5 мл воды, остаток растворяют. С водным раствором проводят следующие реакции. 1. В пробирку берут 1 мл раствора и в него добавляют 4-5 капель раствора хлорида железа и появляется зеленый цвет.

2. В пробирку берут 1 мл раствора. Сверху него осторожно, по стенке пробирки вливают 1 мл концентрированной серной кислоты. Между двумя жидкостями образовывается желтый круг.

Глоссарий-словарь терминов

Термины	В узбекском языке	В русском языке	В английском языке
Транскрипция	ДНКнинг бир қисмида генетик ахборотнинг комплементарлик асосида РНК га ўтказадиган ферментатив жараён	Ферментативный процесс, на комплементарной основе проводящий генетическую информацию в одной нити ДНК в РНК.	The enzymatic process whereby the genetic information contained in one strand of DNA is used to specify a complementary sequence of bases in an mRNA chain.
Транскрипционный контроль	мРНКдан оксил синтезини бошқарилиши	Регулирование синтеза белка путем регуляции формирования его мРНК.	The regulation of a protein's synthesis by regulation of the formation of its mRNA.
Транскрипция омили	Еукариотларда транскрипциянинг бошқарилиши ва инициациясига таъсир этиб, транскрипциянинг РНК-полимераза ёки бошқа омиллари билан боғланиши	В эукариотах, влияя на регулирование и инициации транскрипции, связь транскрипции с РНК-полимеразой или другими факторами.	In eukaryotes, protein that affects the regulation and transcription initiation of a gene by binding to a regulatory sequence near or within the gene and interacting with RNA polymerase and/or other transcription factors.
Транскриптон	Маълум бир шароитда хужайра ёки тўқимада РНК-транскриптга киритиладиган қўшимчалар	Дополнения, вносимые в определенных условиях в клетках или тканях в РНК-транскрипты	The entire complement of RNA transcripts present in a given cell or tissue under specific conditions.
ДНК (дезоксирибонуклеин кислота)	Нуклеотидлар кетма-кетлигидан иборат, 3',5'-фосфодиефир боғлари билан боғланган генетик ахборот сақлайдиган полинуклеотид	Полинуклеотид, содержащий генетическую информацию, состоящую из последовательности нуклеотидов и связанную с 3',5'-фосфодиэфирными связями.	A polynucleotide with a specific sequence of deoxyribonucleotide units covalently joined through 3',5'-phosphodiester bonds; serves as the carrier of genetic information.
ДНК-химеры	Икки хил турдан олинган, таркибида генетик ахборот сақловчи	ДНК, содержащая генетическую информацию, полученную из двух различных видов.	DNA containing genetic information derived from two different species.
ДНК қутубхонаси	Клонланган ДНК фрагментларининг тўплами	Коллекция клонированных ДНК фрагментов.	A collection of cloned DNA fragments.
ДНК-лигазалар	ДНКнинг бир қисмидаги 3'-иккинчи қисмидаги 5' учлари ўртасида фосфодиэфир боғлари билан боғлайдиган фермент	Ферменты, которые создают фосфодиэфирную связь между 3'-концом одного ДНК-сегмента и 5'-концом другого.	Enzymes that creates a phosphodiester bond between the 3' end of one DNA segment and the 5' end of another.
ДНКполимераза	Қолип асосида 5'-асосида 5'-дезоксирибо	Фермент, который на основе шаблона синтезирует ДНК из 5'-дезоксирибо нук-	An enzyme that catalyzes template-dependent synthesis of

	нуклеотидфосфатлардан ДНК синтезловчи фермент	леотидфосфатов5'-основы	DNA from its deoxyribonucleotide 5'-triphosphate precursors.
Эндонукле-азалар	Неклеин кислоталарнинг ички фосфодиэфир боғларини гидролизлайдиган ферментлар	энзимы, которые гидролизуют внутренние фосфодиэфирные связи нуклеиновой кислоты	Enzymes that hydrolyze the interior phosphodiester bonds of a nucleic acid—that is, act at bonds other than the terminal bonds.
НАД, НАДФ (никотинамидадениндинуклеотид, никотинамидадениндинуклеотид-фосфат)	Никотинамид, кофермент бўлиб, окисланиш-қайтарилиш реакцияларида водород ва электрон атомларини ташийди	Никотинамид, будучи коферментом в некоторых окислительно-восстановительных реакцияхслужит носителем атомов водорода и электронов	Nicotinamide-containing coenzymes functioning as carriers of hydrogen atoms and electrons in some oxidation-reduction reactions.
Моноистроник мРНК	Фақат бир молекула оксил синтезида иштирок этадиган мРНК	мРНК, которые участвуют в синтезе белка только одной молекулы	An mRNA that can be translated into only one protein.
Регулятор(бошқарувчи) ген	Бошқа ген экспрессияси бошқарилишида иштирок этувчи махсулотни ҳосил бўлишига олиб келувчи ген; м-н, репрессор оксилни кодловчи ген	Ген, который приводит к образованию продукта, участвующего в регуляции экспрессии другого гена; например, ген, кодирующий белок-репрессор.	A gene that gives rise to a product involved in the regulation of the expression of another gene; for example, a gene encoding a repressor protein
ДНКнинг бўшашган ҳолати	Хужайра шароитида Б шаклида барқарор структураларда мавжуд бўлган исталган ДНК	Любая ДНК, существующая в клеточных условиях в форме Б в устойчивой структуре	Any DNA that exists in its most stable and unstrained structure, typically the B form under most cellular conditions.
Денатурация	Оксилнинг натив, табиий ҳолатининг йўқотилиши	Потеря нативного природного состояния белка	Refolding of an unfolded(denatured) globular protein so as to restore its native structure and function.
Репликация	Она нуклеин кислоталар асосида мос равишда қиз нуклеотидларнинг синтези	Синтез дочерних молекул нуклеиновых кислот, идентичных родительской нуклеиновой кислоте.	Synthesis of daughter nucleic acid molecules identical to the parental nucleic acid.
Репликатив шакл	Репликациянинг алоҳида оралиқ махсулотлари вазифасини бажарувчиларидан	Любой из полнометражных структурных форм вирусной хромосомы, которые служат в качестве отдельных промежуточных продуктов	Any of the full-length structural forms of a viral chromosome that serve as distinct replication intermediates.

	вирус хормосомасининг синтези	репликации.	
РНКполимераза	ДНК ёки РНК қолип асосида 5`-рибонуклеозидтрифосфатлардан РНК синтезловчи фермент	фермент, который катализирует образование РНК из рибонуклеозидом 5'-трифосфатов, с использованием цепи ДНК, или РНК в качестве матрицы.	An enzyme that catalyzes the formation of RNA from ribonucleoside 5'-triphosphates, using a strand of DNA or RNA as a template.
Рибозимлар	Каталитик фаолликка эга бўлган рибонуклеин килсоталар фаоллиги; РНК-ферментлар	молекулы рибонуклеиновой кислоты с каталитической активностью; РНК-ферменты.	Ribonucleic acid molecules with catalytic activities; RNA enzymes.
Рибосома	рРНК ва оксилнинг юқори даражадаги тузилишга эга бўлган 18-22 нм ли комплекси; оксил синтезланадиган жой	супмолекулярный комплекс рРНК и белков, примерно от 18 до 22 нм в диаметре; место синтеза белка.	A supramolecular complex of rRNA and proteins, approximately 18 to 22 nm in diameter; the site of protein synthesis.
Рибосомал РНК (рРНК)	Рибосома компоненти таркибига кирадиган РНК молекулалари	класс молекул РНК, выступающей в качестве компонентов рибосом.	A class of RNA molecules serving as components of ribosomes.
Рибонуклеотид	Ўзининг пентозаси компоненти таркибида Д-рибоза сақловчи нуклеотид	нуклеотид, содержащий D-рибоза в качестве компонента пентозы.	A nucleotide containing D-ribose as its pentose component.
Фосфолипид	Таркибида бир ёки бир нечта фосфат гурухлари сақлайдиган липид	Липид, содержащий одну или несколько фосфатных групп.	A lipid containing one or more phosphate groups.
Фосфоролитик	Фосфатлар билан бирикмаларнинг парчаланиши, гидролизга ўхшаш	Расщепление соединения с фосфатом в качестве атакующей группы; аналогично гидролизу.	Cleavage of a compound with phosphate as the attacking group; analogous to hydrolysis.
Пурин	Нуклеотидлар таркибида топилган, гетеросиклик азотли асос бўлиб, пиримидин ва имидазол халқаларини сақлайди	Азотистого гетероциклическое основание, найденное в нуклеотидах и нуклеиновых кислотах; содержит конденсированные пиримидина и имидазола кольца.	A nitrogenous heterocyclic base found in nucleotides and nucleic acids; contains fused pyrimidine and imidazole rings.
Пиридин-нуклеотид	НАД ёки НАДП, никотинамид ҳосилаларини сақловчи нуклеотидли кофермент	Нуклеотидная кофермент, содержащий пиридоновым производное никотинамида; NAD или NADP.	A nucleotide coenzyme containing the pyridone derivative nicotinamide; NAD or NADP.
Пиридоксаль фосфат (ПЛП)	Таркибида Б ₆ витамин пиридоксин сақловчи фермент бўлиб, аминогрухларнинг трансминланишида иштирок	Похожий на коэнзим, содержащий витамин пиридоксина (витамин В ₆); участвует в трансминации аминогрупп.	AS coenzyme containing the vitamin pyridoxine (vitamin B ₆); functions in reactions involving amino group transfer.

	этади.		
Пиримидин	Нуклеотидлар таркибида топилган, гетероциклик азотли асос	Азотистого гетероциклическое основание, найденное в нуклеотидах	A nitrogenous heterocyclic base found in nucleotides and nucleic acids.
Пиримидин димери	УБ- нурлар таъсирида ДНК да иккита пиримидин қолиғини ковалент боғланишидан ҳосил бўлган қисми; кўпинча иккита тиминдан ҳосил бўлади (тиминнинг димери)	ковалентно соединены димер из двух смежных остатков пиримидина в ДНК, индуцированных путем поглощения УФ-излучения; Наиболее часто происходит от двух смежных тиминов (димером тимина).	A covalently joined dimer of two adjacent pyrimidine residues in DNA, induced by absorption of UV light; most commonly derived from two adjacent thymines (a thymine dimer).
Рекомбинант ДНК	ДНК даги генларнинг янги комбинацияларда қўшилишидан ҳосил бўлади	ДНК, образованный присоединением генов в новых комбинациях.	DNA formed by the joining of genes into new combinations.
Рекомбинация	Хромосомадаги нуклеин кислоталарнинг тўғри чиққичи кетма-кетлиғини парчалаши ёки қўшилиши ҳисобига ўзгариши билан борадиган ферментатив жараён	ферментативный процесс, в котором линейное расположение последовательностей нуклеиновых кислот, в хромосоме изменяется при расщеплении или воссоединении.	An enzymatic process by which the linear arrangement of nucleic acid sequences in a chromosome is altered by cleavage and rejoining.
Рекомбинацион ДНК репарацияси	ДНКдаги узилишларни ёки хатоликларни қайта тиклашга йўналтирилган рекомбинацион жараёнлар	Рекомбинационные процессы, направленные на восстановление ДНК разрывов ДНК или поперечных связей, особенно на инактивированных вилках репликации.	Recombination processes directed at the repair of DNA strand breaks or cross-links, especially at inactivated replication forks.
Иккиламчи тузилиш	Полипептид занжирнинг фазовий тахланиши, шунингдек, полинуклеотид структурада ҳам ишлатилади.	Локальное пространственное расположение атомов главной цепи в сегменте полипептидной цепи; также применяется в полинуклеотидной структуре.	The local spatial arrangement of the main-chain atoms in a segment of a polypeptide chain; also applied to polynucleotide structure.
Терминацион кодонлар	УАА, УАГ ва УГА оксил синтезида полипептид занжирини синтезини тўхтатувчи, кодонлар, шунингдек стоп-кодонлар ҳам деб аталади	UAA, UAG и UGA; в синтезе белка, эти кодоны являются сигналом о прекращении полипептидной цепи. Также известны как стоп-кодоны.	UAA, UAG, and UGA; in protein synthesis, these codons signal the termination of a polypeptide chain. Also known as stop codons.
Терминация -нинг кетма-кетлиғи	Транскрипцион бирликдаги транскрипциянинг тугашини билдирувчи ДНК кетма-кетлиғи	ДНК - последовательность, в конце транскрипционной единицы, что свидетельствует об окончании транскрипции.	A DNA sequence, at the end of a transcription unit, that signals the end of transcription.
Трансформация	Хужайрага экзоген ДНК киритиш натижасида янги	Введение экзогенной ДНК в клетку, в результате чего клетки приобретают	Introduction of an exogenous DNA into a cell, causing the cell to

	фенотип олиш	новый фенотип.	acquire a new phenotype.
Трансляция	Оқсил синтезида мРНК даги генетик ахборот асосида аминокислоталар кетма-кетлигининг белгиланиши жараёни	Процесс, в котором генетическая информация присутствует в молекуле мРНК определяет последовательность аминокислот в процессе синтеза белка.	The process in which the genetic information present in an mRNA molecule specifies the sequence of amino acids during protein synthesis.
Триацил-глицерин	Учта ёғ кислотаси билан глицериннинг ҳосил қилган мураккаб эфири, шунингдек, триглицерид ва нейтрал ёғлар ҳам дейилади	сложный эфир глицерина с тремя молекулами жирной кислоты; также называют триглицеридом или нейтральным жиром.	An ester of glycerol with three molecules of fatty acid; also called a triglyceride or neutral fat.
Умумий нордон-ишқорий катализ	Протонлар иштирокидаги катализ бўлиб, унда сувдан ташқари бошқа моддалар иштирок этади	Катализ с участием протонов трансфертов, в которых участвуют другие вещества, кроме воды.	Catalysis involving proton transfers) to or from a molecule other than water.
Генетик код	Оқсилнинг аминокислоталарини белгилаб берувчи ДНК ёки РНК нинг триплет кодлари тўплами	Набор триплет кодовых слов в ДНК (или РНК), кодирующий аминокислоты белков.	The set of triplet code words in DNA (or mRNA) coding for the amino acids of proteins.
Генетик харита	Хромосома бўйлаб маълум бир генларнинг нисбий жойлашуви ва ҳолатини кўрсатувчи диаграмма	диаграмма, показывающая относительную последовательность и положение определенных генов вдоль хромосомы.	A diagram showing the relative sequence and position of specific genes along a chromosome.
Ферментация	Озика моддалардан анаэроб усулда оксидланишсиз глюкозадан лактат, этанол каби маҳсулотларнинг ҳосил бўлиши	Образование из питательных веществ, таких как глюкоза, без чистого окисления; анаэробным способом таких продуктов, как лактат, этанол.	Energy-yielding anaerobic breakdown of a nutrient molecule, such as glucose, without net oxidation; yields lactate, ethanol, or some other simple product.
Қўйма ген	Бир геннинг ёки геннинг бир қисмининг ферментлар ёрдамида бошқасига бирикиши	Ферментативное прикреплению одного гена, или часть гена, к другому.	The enzymatic attachment of one gene, or part of a gene, to another.
Ген муҳандислиги	Молекуляр биология билан исталган генетик материалнинг, хусусан ДНК нинг ўзгариш жараёни	Любой процесс, посредством которого генетический материал, в частности ДНК, изменяется с помощью молекулярной биологии.	Any process by which genetic material, particularly DNA, is altered by a molecular biologist.
Геном	Ҳужайра ёки вирусдаги барча генетик ахборот	Вся генетическая информация в клетке или вирусе.	All the genetic information encoded in a cell or virus.
Геномика	Ҳужайра ва организм	Наука в целом	A science devoted

	геномларини ўрна- надиган фан	посвящена пониманию клеточных и организма геномов.	broadly to the understanding of cellular and organism genomes.
Геометрик изомерлар	Қўш спирал атро- фини айлантириш имконияти бўлган цисва транс изомерлар	Изомеры, связанные с возможностью вращения вокруг двойной связи; также называемый цис-и транс- изомеры.	Isomers related by rotation about a double bond; also called cis and trans isomers.
Глобуляр оқсиллар	Юмалоқ шакли эрийдиган оқсиллар	Растворимые белки с глобулярной (несколько закругленные) формой.	Soluble proteins with a globular (somewhat rounded) shape.
Глюкогенез	Глюконеогенез жараёнида глюкоза ёки гликогенга айланиши	Превращение в процессе глюконеогенеза в глюкозу или гликоген	Capable of being converted into glucose or glycogen by the process of gluconeogenesis.
Глюконеогенез	Углеводларнинг од- дий углевод бўлма- ган пируват, оксало- ацетат каби модда- лардан биосинтези	Биосинтез углеводов из более простых, неуглеводных предшественников, таких как оксалоацетат и пируват.	The biosynthesis of a carbohydrate from simpler, noncarbohydrate precursors such as oxaloacetate and pyruvate.
Глюконеогене-зис	Адипотситларда Триглицеридлар синтезида фойдала- ниш учун глицерин- нинг пируватдан син- тезланиши	Синтез в адипоцитах глицерина 3-фосфата из пирувата для использования в синтезе триацилглицерина.	The synthesis in adipocytes of glycerol 3- phosphate from pyruvate for use in triacylglycerol synthesis.
Глицерофос- фолипид	Глицериннинг С-1 ва С-2 ларига ёғ кисло- таларининг, С-3 га эса кутбли спиртнинг фосфодиэфир боғ- лари орқали боғлани- шидан ҳосил бўлган амфипатик липид	амфипатический липид с цепи глицерина; жирные кислоты esterlinked к С-1 и С- 2 глицерина, и полярный спирт присоединен через фосфодиэфирную связь с С-3.	An amphipathic lipid with a glycerol backbone; fatty acids are esterlinked to C-1 and C-2 of glycerol, and a polar alcohol is attached through a phosphodiester linkage to C-3.
Гликогенез	Глюкозанинг глико- генга айланиш жараёни	Процесс превращения глюкозы в гликоген.	The process of converting glucose to glycogen.
Гликолиз	Глюкозанинг икки молекула пируватга парчаланиши билан борадиган катаболик йўл	катаболический путь, с помощью которого молекула глюкозы распадается на две молекулы пирувата.	A catabolic pathway by which a molecule of glucose is broken down into two molecules of pyruvate.
Гликопротеин	Углевод гуруҳи сақлаган оқсил	Белок, содержащий углеводную группу.	A protein containing a carbohydrate group.
Гликофинго- липид	Узун занжирли ёғ кислоталари ва кутбли спирт бириккан сфингозинфосфат занжирдан иборат амфипатик липид	Амфипатический липид с сфингозинфосфатной цепью, к которой присоединены жирные кислоты с длинной цепью и полярный спирт.	An amphipathic lipid with a sphingosine backbone to which are attached a long-chain fatty acid and a polar alcohol.
Глиоксилат цикл	Лимон килсота сиклинингацетатнинг сукцинатга конверсияси, ундан эса янги углеводларга ўтиши.	Конверсия лимонной кислоты сиклинингацетатав сукцинат, а от него в новый углевод; имеется в бактериях и некоторых растительных клетках.	A variant of the citric acid cycle, for the net conversion of acetate into succinate and, eventually, new carbohydrate; present in bacteria and some plant

	Бактерия ва айрим ўсимликларда бўлади		cells.
глиоксисома	Унаётган уруғ хужайраларида аниқланган, глиоксилат цикли ферментларини сақлайдиган махсус пероксисомалар	Специализированные пероксисомы, обнаруженные в прорастающих семяночках и содержащие ферменты глиоксилатного цикла	A specialized peroxisome contain the enzymes of the glyoxylate cycle; found in cells of germinating seeds.
Гистонлар	Барча эукариот хужайралари хромосомаларида ДНК билан мустаҳкам боғланадиган оксиллар	Семейство основных белков, которые тесно связываются с ДНК в хромосомах всех эукариотических клеток.	The family of basic proteins that associate tightly with DNA in the chromosomes of all eukaryotic cells.
Гомеостаз	Ташқи муҳит шароити ўзгарганда бошқарувчи механизмлар орқали динамик ҳолатнинг барқарор саланиши	Поддержание динамического стационарного состояния с помощью регуляторных механизмов, при изменении внешней среды.	The maintenance of a dynamic steady state by regulatory mechanisms that compensate for changes in external circumstances.
Гомологикоксиллар	Ҳар хил турларда оксилларнинг ўхшаш кетма-кетликда тузилиши. Масалан гемоглобин	белки, имеющие сходные последовательности и функции у разных видов; например, Гемоглобины.	Proteins having similar sequences and functions in different species; for example, the hemoglobins.
Гормон	Эндокрин тўқимада кам миқдорда ишлаб чиқариладиган кимёвий модда бўлиб, қон орқали бошқа тўқима ва органлар ишини бошқаришда иштирок этади	Химическое вещество синтезируется в небольших количествах эндокринной ткани и через кровь участвует в регулировании функций других тканей и органов.	A chemical substance synthesized in small amounts by an endocrine tissue and carried in the blood to another tissue, where it acts as a messenger to regulate the function of the target tissue or organ.
Гормон рецептори	Нишон хужайранинг мембранасида ёки унинг устки қисмида бўладиган оксил, махсус гормони бўлганида ва хужайранинг жавоб беришига сабабчидир	Белок, расположенный в мембране клетки-мишени или на ее поверхности, которые связывают специфический гормон которого связывает и инициирует клеточный ответ.	A protein in, or on the surface of, target cells that binds a specific hormone and initiates the cellular response.
Ютиш	Овқат ҳазм қилиш маҳсулотларининг ошқозон-ичак йўлларида қонга ташилиши	Транспортировка продуктов пищеварения из желудочно-кишечного тракта в кровь.	Transport of the products of digestion from the intestinal tract into the blood.
Актин	Мушакнинг ингичка ипларини ҳосил қилади, шунингдек кўпчилик эукариот хужайраларда ситоскелет таркибига қиради	Белок, который составляет тонкие нити мышц; также является важным компонентом цитоскелета многих эукариотических клеток.	A protein that makes up the thin filaments of muscle; also an important component of the cytoskeleton of many eukaryotic cells.
АДФ (аденозин дифосфат)	Хужайра энергетик сиклида фосфат	А рибонуклеозид 59-дифосфат, выступающей в	A ribonucleoside 59-diphosphate serving as

	гуруҳининг актсептори сифатида иштирок этувчи А рибонуклеозид 59-дифосфат	качестве фосфатной группы акцептора в энергетическом цикле клетки.	phosphate group acceptor in the cell energy cycle.
Аминокислота-лифаоллашув	Аминокилоталар-нинг карбоксил гуруҳини ўзининг мос тРНК сини 3'-гидроксил гуруҳига бирктирадиган АТФ билан боғлиқ ферментатив жараён	Ферментативный процесс, связанный с АТФ, который прикрепляет карбоксильную группу аминокислот к 3'-гидроксильной группы своей соответствующей тРНК	ATP-dependent enzymatic esterification of the carboxyl group of an amino acid to the 3'-hydroxyl group of its corresponding tRNA.
Анаболизм	Хужайрада энергия сарфланиши билан борадиган метаболизмнинг оралик босқичи	Фаза промежуточного метаболизма, происходящая в клетке с расходом энергии.	The phase of intermediary metabolism concerned with the energy-requiring biosynthesis of cell components from smaller precursors.
Антикодон	тРНК нинг мРНК билан мос келувчи учта нуклеотиддан иборат қисми	Часть тРНК, соответствующая с мРНК и состоящая из трех нуклеотидов.	A specific sequence of three nucleotides in a tRNA, complementary to a codon for an amino acid in an mRNA.
Антиген	Умумртқалиларда махсус антителолар ишлаб чиқаришга сабаб бўладиган молекулалар	молекулы, являющиеся причиной у позвоночных специфических антител	A molecule capable of eliciting the synthesis of a specific antibody in vertebrates.
Апофермент	Ферментнинг оксил қисми бўлиб, каталик фаоллик учун зарур бўлган органик ва анорганик кофакторларсиз	Белковая часть фермента, за исключением любых органических или неорганических кофакторов и протезных групп, которые могут быть необходимыми для каталитической активности.	The protein portion of an enzyme, exclusive of any organic or inorganic cofactors and prosthetic groups that might be required for catalytic activity.
АТФ-синтезалаар	Митохондриянинг ички мембраналарида ёки бактерияларнинг плазматик мембраналарида, хлоропластларда АДФ дан АТФ нинг оксидланиш йўли билан ҳосил қилувчи ферментли мажмуа	Ферментный комплекс, который формирует АТФ из АДФ путем окислительного фосфорилирования во внутренней митохондриальной мембране или бактериальной плазматической мембраны, а также в хлоропластах.	An enzyme complex that forms ATP from ADP and phosphate during oxidative phosphorylation in the inner mitochondrial membrane or the bacterial plasma membrane, and during photophosphorylation in chloroplasts.
Антибиотик	Турли хил микро-организмлар ва ўсимликларда ҳосил бўладиган органик моддалар бўлиб, бошқа турлар учун захарли хусусиятга эга	Один из множества различных органических соединений, которые образуются и секретируются в различных видах микроорганизмов и растений, являются токсичными для других видов, и, предположительно, имеют защитную функцию.	One of many different organic compounds that are formed and secreted by various species of microorganisms and plants, are toxic to other species, and presumably have a defensive function.
Углеводлар	Полигидрокси-кетон	полигидрокси aldehy-	A polyhydroxy

	ёки гидролиз натижа- сида уни ҳосил қилади, уларнинг кўпчилиги (C ₂ O) N формулага эга, айримлари таркибида азот сақлайди	деор кетон, или вещество, которое дает такое соединение на гидролиз. Много углеводов имеют эмпирическую формулу (CH ₂ O) N; некоторые из них также содержат азот, фосфор и серу.	aldehydeor ketone, or substance that yields such a compound on hydrolysis. Many carbohydrates have the empirical formula (CH ₂ O) _n ; some also contain nitrogen, phosphorus, or sulfur.
Катаболизм	Озиқа моддалардан энергия ажралиш жараёни	Процесс выделения энергии из питательных веществ	The phase of intermediary metabolism concerned with the energy yielding degradation of nutrient molecules.
Конъюгирланган оксил	Бир ёки бир нечта протеазали гуруҳ сақлаган оксил	белок, содержащий один или более протезных групп.	A protein containing one or more prosthetic groups.
Цитохром P450	Генлар оиласига мансуб, биологик гидроксилашида иштирок этувчи, 450 нм тўлқин узунлигида нур ютувчи фермент	Фермент семейства генов, участвующий в биологической гидроксилизации, поглощающий лучи с длиной волны 450 нм.	A family of heme containing enzymes, with a characteristic absorption band at 450 nm, that participate in biological hydroxylation with O ₂ .

Сведения, которые используются в проведении занятий

Элемент	Химический знак	Относительная масса атома	Элемент	Химический знак	Относительная масса атома
Азот	N	14,0087	Молибден	Mo	95,94
Алюминий	Al	26,98154	Мишьяк	As	74,92
Барий	Ba	137,33	Натрий	Na	22,989
Бор	B	10,81	Никель	Ni	58,70
Бром	Br	79,904	Олово	Sn	118,69
Висмут	Bi	208,9804	Платина	Pt	195,09
Водород	H	1,00794	Ртуть	Hg	200,59
Вольфрам	W	183,85	Рубидий	Rb	85,4678
Железо	Fe	55,847	Свинец	Pb	207,0
Золото	Au	196,9695	Сера	S	32,064
Йод	I	126,9045	Серебро	Ag	107,8682
Кадмий	Cd	112,41	Стронций	Sr	87,62
Калий	K	39,0983	Сурьма	Sb	121,75
Кальций	Ca	40,08	Углерод	C	12,011
Кислород	O	15,9994	Уран	U	238,03
Кобальт	Co	58,933	Фосфор	P	30,9737
Кремний	Si	28,0855	Фтор	F	18,998
Литий	Li	6,941	Хлор	Cl	35,453
Магний	Mg	24,305	Хром	Cr	51,996
Марганец	Mn	54,938	Цезий	Cs	132,905
Медь	Cu	63,546	Цинк	Zn	65,38

Реактивы: плод лимона, 80% ный раствор этилового спирта, 1% ный раствор хлорида железа, концентрированный раствор серной кислоты.

Плотность, процент и молярная концентрация растворов уксусных кислот

Плотность при 20°C зичлиги,	Концентрация СН ₃ СООН		Плотность при 20°C г/см ³	Концентрация СН ₃ СООН	
	Про	мол		Проц	моль
1,000	1,20	6,20	1,050	40,2	7,03
1,005	4,64	0,77	1,055	46,09	8,24
1,010	8,14	1,37	1,060	53,4	9,43
1,015	11,7	1,98	1,065	61,4	10,9
1,020	15,4	2,61	1,070	77-79	13,7-
1,025	19,2	3,27	1,065	91,2	14,1
1,030	23,1	3,96	1,060	95,4	16,2

1,035	27,2	4,68	1,055	98,0	16,8
1,040	31,6	5,46	1,050	99,9	17,2
1,045	36,2	6,30			17,5

Плотность и концентрация растворов перхлоратной кислоты

Плотность при 20°C г/см ³	Концентрация HClO ₄		Плотность при 20°C г/см ³	Концентрация HClO ₄	
	фоиз	моль/л		фоиз	моль/л
1,005	1,00	0,1004	1,350	44,81	6,021
1,025	4,43	0,4520	1,375	47,05	6,439
1,050	8,48	0,8863	1,400	49,23	6,860
1,075	12,33	1,319	1,425	51,31	7,278
1,100	16,0	1,452	1,450	53,27	7,689
1,125	19,57	1,450	1,475	55,17	8,100
1,150	22,99	1,475	1,500	57,06	8,519
1,175	26,20	3,064	1,525	58,91	8,942
1,200	29,26	3,495	1,550	60,78	9,377
1,225	32,18	3,924	1,575	62,63	9,819
1,250	34,95	4,349	1,600	64,50	10,27
1,275	37,60	4,772	1,625	66,39	10,74
1,300	40,10	5,189	1,650	68,26	11,21
1,325	42,49	5,604	1,675	70,15	11,70

Буферные смеси

1. Буферную смесь фосфат – цитрата готовят из следующих двух растворов: 0,1 М раствор, приготовленный из моногидрата 21.018 г лимонной кислоты и раствор 0,2 М гидрофосфата натрия, приготовленный из 35.598 г Na₂HPO₄·2H₂O.

Оба раствора перемешивают в различных соотношениях и получают растворы с разными величинами pH.

Лимонная кислота, (мл)	Гидрофосфата натрий, (мл)	рН	Лимонная кислота, (мл)	Гидрофосфата натрий, (мл)	рН	Лимонная кислота, (мл)	Гидрофосфата натрий, (мл)	рН
19,60	0,40	2,2	11,72	8,28	4,2	6,78	13,22	6,2
18,76	1,24	2,4	11,18	8,82	4,4	6,15	13,85	6,4
17,82	2,18	2,6	10,65	9,35	4,6	5,45	14,55	6,6
16,83	3,17	2,8	10,14	9,86	4,8	4,55	15,45	6,8
15,89	4,11	3,0	9,70	10,30	5,0	3,63	16,47	7,0
15,06	4,94	3,2	9,28	10,72	5,2	2,61	17,39	7,2
14,30	5,70	3,4	8,85	11,15	5,4	1,83	18,17	7,4
13,56	6,44	3,6	8,40	11,60	5,6	1,27	18,73	7,6
12,90	7,10	3,8	7,91	12,09	5,8	0,85	19,15	7,8
12,26	7,71	4,0	7,37	12,63	6,0	0,55	19,45	8,0

2. Раствор буфера фосфата готовят из следующих двух растворов: 1/15 М гидрофосфатнатрия ($11.876\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 1/15 М дигидрофосфаткалия ($9.078 \text{ г KH}_2\text{PO}_4$). Оба раствора перемешивают в различных объемных соотношениях и получают растворы с различными величинами рН.

Na_2HPO_4 (мл)	KH_2PO_4 (мл)	рН	Na_2HPO_4 (мл)	KH_2PO_4 (мл)	Н
0,00	10,00	4,49	6,00	4,00	6,98
0,10	9,90	4,94	7,00	3,00	717

0,25	9,75	5,29	8,00	2,00	7,38
0,50	9,50	5,59	9,00	1,00	7,73
1,00	9,00	5,91	9,50	0,50	8,04
2,00	8,00	6,24	9,75	0,25	8,34
3,00	7,00	6,47	9,90	0,10	8,67
4,00	6,00	6,64	10,00	0,00	9,18
5,00	5,00	6,81			

3. Буфер ацетата (0,2 М рН=3,6–5,8)

Раствор 0,2 М ацетата натрия, мл	Раствор 0,2 М уксусной кислоты, мл	рН при 18°
0,75	9,25	3,6
1,20	8,80	3,8
1,80	8,20	4,0
2,65	7,35	4,2
3,70	6,30	4,4
4,90	5,10	4,6
5,90	4,10	4,8
7,00	3,00	5,0
7,90	2,10	5,2
8,60	1,40	5,4
9,10	0,90	5,6
9,40	0,60	5,8

4. Буфер фосфата (0,1 М, рН 5,8 - 8,0)

0.2 М раствор Na ₂ HPO ₄ , мл	0.2 М раствор Na ₂ HPO ₄ , мл	Вода, мл	рН
8,00	92,0	До 20 мл	5,8
12,3	87,7	-«-	6,0
18,5	81,5	-«-	6,2
26,5	73,5	-«-	6,4
37,5	62,5	До 200 мл	6,6
49,0	51,0	-«-	6,8

61,0	39,0	-«-	7,0
72,0	28,0	-«-	7,2
81,0	19,0	-«-	7,4
87,0	13,0	-«-	7,6
91,5	8,5	-« -	7,8
94,7	5,3	-«-	8,0

5. 0,05 М буферглицина (рН=8,6 –10,6 для приготовления 15,014 г глицина растворяют 1 литре воды и готовят 0,2 М глицина.

рН	0,2 М глицина, мл	0,2 М натриевой щелочи, мл	Вода, мл
8,6	50,0	4,0	146,0
8,8	50,0	6,0	144,0
9,0	50,0	8,8	141,0
9,2	50,0	12,0	138,0
9,4	50,0	16,8	133,2
9,6	50,0	22,4	127,6
9,8	50,0	27,2	122,8
10,0	50,0	32,0	118,0
10,4	50,0	38,6	111,4
10,6	50,0	45,5	104,5

6. HCl буфер 0,05 М Триса (рН=7,2-9,1) для приготовления 24,228 г Триса растворяется в 1 литре воды, готовится 0,2 М раствора триса.

рН		0,2 М Трис, мл	0,1 М HCl, мл	Вода, мл
23°C	37°C			
9,1	8,95	25	5,0	70
8,92	8,78	25	7,5	67,5
8,74	8,60	25	10,0	65,0
8,62	8,48	25	12,5	62,5
8,5	8,37	25	15,0	60,0
8,4	8,27	25	17,5	57,5
8,32	8,18	25	20,0	55,0
8,23	8,10	25	22,5	52,5
8,14	8,00	25	25,0	50,0

8,05	7,9	25	27,5	47,5
7,96	7,82	25	30	45,0
7,87	7,73	25	32,5	42,5
7,77	7,63	25	35,0	40,0
7,66	7,52	25	37,5	37,5
7,54	7,40	25	40,0	35,0
7,36	7,22	25	42,5	32,5
7,20	7,05	25	45	30

7. 0,1 М Цитратный буфер (pH=3,0 - 6,2) для приготовления моногидрат 21.018 г лимонной кислоты растворяют в 1 литре воды. 29,412 г цитрат натрия растворяют в 1 литре воды.

8.

pH	0,1 М лимонной кислоты, мл	0,1 М Цитрат натрия, мл	pH	0,1 м лимонной кислоты, мл	0,1 м Цитрат натрия, мл
3,0	16,4	3,6	4,8	8,0	12,0
3,2	15,5	4,5	5,0	7,0	13,0
3,4	14,6	5,4	5,2	6,1	13,9
3,6	13,7	6,3	4,4	5,1	14,9
3,8	12,7	7,3	5,6	4,2	15,8
4,0	11,8	8,2	5,8	3,2	16,8
4,2	10,8	9,2	6,0	2,3	17,7
4,4	9,9	10,1	6,2	1,0	18,4
4,6	8,9	11,1			

9. Для приготовления 0,2 М Сукцинатного буфера 23,6 г янтарной кислоты растворяют в 1 литре воды.

рН	0,2М янтарной кислоты, мл	0,2 М натриевой щелочи, мл	Вода, мл	рН	0,2 М янтарной кислоты, мл	0,2 М натриевой щелочи, мл	Вода, мл
3,8	25	7,5	100	5,0	25	26,7	100
4,0	25	10,0	100	5,2	25	30,7	100
4,2	25	13,3	100	5,4	25	34,2	100
4,4	25	16,7	100	5,6	25	37,5	100
4,6	25	20,0	100	5,8	25	40,7	100
4,8	25	23,5	100	6,0	25	43,5	100

10. Буфер с Веронал — HCl (рН=6,8 — 9,6)(диэтилбарбитурат натрия — относительная молекулярная масса веронала 206,2)

рН	Веронал 0,04 М, мл	HCl 0,2 М, Мл	рН	Веронал 0,04 М, мл	HCl 0,2 М, мл
6,8	100	18,4	8,4	100	5,21
7,0	100	17,8	8,6	100	3,82
7,2	100	16,7	8,8	100	2,52
7,4	100	15,3	9,0	100	1,65
7,6	100	13,4	9,2	100	1,13
7,8	100	11,47	9,4	100	0,70
8,0	100	9,39	9,6	100	0,35
8,2	100	7,21			

Смешанные индикаторы

Индикатор Состав раствора	А-Б ¹	Цвет		pT ²	Памятка
		В обоснованном виде	В виде кислоты		
1. Метилоранж (водный раствор, 0,1%)	1:1	Фиолетовый	Зеленый	4,1	Удобен для титрования в искусственно

2. Индигокармин, водный раствор 0,2%		-«-			м освещении
1 . Бромкрезола синий, (спиртовый расктор 0,2 %ный)	3:1	Красный фиолетово—синий	- « -	5,1	Очень сильное изменение
2. Метил—красного спиртовый раствор(0,2 %ный)			Зеленый	7,0	
					Хранится в черной посуде

¹В графе показаны соотношения объема растворов А и Б.

²Величина рН на точке завершения тиртиш с данным индикатором, называется показателем титрования и обозначается рТ.

Плотность раствора аммиака, нормальные и процентные концентрации

Плотность , (при 15°)	Нормальная	Количество в растворе 100 г	Плотность, (при 15°)	Нормальная	
0,960	5,58	9,91	0,910	13,95	24,99
0,950	7,10	12,74	0,900	14,97	28,3
0,940	18,63	15,63	0,890	16,59	31,75
0,930	10,18	18,64	0,882	18,10	34,95
0,920	11,75	21,75			

Названия индикаторов и характеристика некоторых их свойств

Название	Зона изменения цвета(рН)	Цвет	
		В кислой среде	В щелочной среде
Диметиламиноазобензол	2,9-4,6	Красный	Оранжевый
Метилоранж	3,1-4,4	- « -	- « -
Конго	3,1-5,2	Синий	Красный

Метилрот	4,2 - 6,3	Фиолетовый	Желтый
Альфа-динитрофенол	2,8 - 4,5	Красный	- « -
Гамма - динитрофенол	4,0-5,5	Бесцветный	- « -
Пара - нитрофенол	5,2-7,0	-«-	- « -
Мета - нитрофенол	6,7-8,4	- « -	- « -
Лакмус	5,0-8,0	-«-	Синий
Таширо индикатори	4,4-6,2	Красный	Зеленый
Фенолфталеин	8,2-10,00	Фиолетовый	Красный
Тимолфталеин	9,3-10,5	Бесцветный	Синий
Ализарин сарига	10,1 -12,0	- « -	Фиолетовый
Крезол пурпурный	7,4-9,0	Желтый	Алый
Фенол-красноватый	6,4-8,0	- « -	Красный
Бромтимола - синий	6,0-7,6	- « -	Красный
Бромфенола - синий	3,0-4,6	- « -	Синий
Тропеолин	1,4-3,2	- « -	- « -
Кристаллфиолет	0,0-2,0	Красный	Желтый
		Зеленый	Фиолетовый

**Плотность раствора едкого калия,
нормальная и процентная концентрации**

Плотность, (при 15°)	Нормальная	процент	Плотность, (при 15°)	Нормальная	ФоиЗ
1,100	2,13	10,85	1,340	8,26	34,60
1,120	2,59	12,96	1,360	8,84	36,47
1,140	3,05	14,99	1,380	9,42	38,25
1,160	3,53	17,08	1,400	10,00	40,09
1,180	4,02	19,13	1,420	10,60	41,88
1,200	4,52	21,15	1,440	11,20	43,64
1,220	5,03	23,13	1,460	11,81	45,38

1,240	5,55	25,11	1,480	12,42	47,09
1,260	6,08	27,05	1,500	13,04	48,79
1,280	6,61	28,97	1,520	13,68	50,48
1,300	7,15	30,87	1,540	14,31	52,15
1,320	7,70	32,74			

**Плотность раствора едкого натрия,
нормальная и процентная концентрации**

Плотность, (при 15°)	Нормальная	Процент	Плотность, (при 15°)	Нормальная	Процент
1,100	2,47	8,99	1,320	9,54	28,92
1,120	3,02	10,79	1,340	10,31	30,78
1,140	3,59	12,59	1,360	11,13	32,74
1,160	4,17	14,39	1,380	11,96	34,66
1,180	4,78	16,19	1,400	12,81	36,60
1,200	5,40	17,99	1,420	13,10	38,58
1,220	6,04	19,80	1,440	14, 61	40,58
1,240	6,70	21,60	1,460	15,56	42,62
1,260	1,37	23,42	1,480	16,54	44,70
1,280	8,08	25,25	1,500	17,55	46,80
1,300	8,79	27,07	1,520	18,58	48,90

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ РЕАКТИВОВ И
ПРЕПАРАТОВ**

(Все цветные реактивы готовят в дистиллированной воде)

1. Приготовление белкового раствора для цветных реактивов.

1) 10 г яичного белка растворяют в 100 мл воды и готовят 1 % ный белковый раствор (10 г яичного белка содержит 1 г белка). Один яичный желток растворяют в 259 мл воды, процеживают через марлевый фильтр.

2) Белая кровяная сыворотка 5 раз сжижается в 0,85 % ном растворе хлорида натрия. Белковые растворы хранятся в морозильнике (холодильнике).

2. Приготовление белкового раствора для гидролиза. Белки 2 яиц растворяют в 1 л воды, процеживают через марлевый фильтр, раствор хранят в морозильнике. (холодильнике).

Чтобы приготовить гидролизат яичного белка, 8 яичных белков

растворяют в 4 л воды, процеживают через марли и раствор вливают в колбу с круглым дном, присоединенным с воздушным холодильником. К нему добавляют один литр концентрированной соляной кислоты. После того, как смесь вскипела на асбестовой сетке, прокипятят еще 45 минут, затем фильтруют. Активированный уголь не используется.

3. Приготовление белкового раствора для реакции погружения.

Отделенный от желтка белок яйца смешивается с водой, в 10-20 раз превышающей по объему белок, процеживается через несколько слоев марлей или сложенных фильтровальных бумаг. Белковый раствор для соления: 3 яичных белка смешивают с 700 мл воды и 300 мл раствором насыщенного хлорида натрия.

4. Приготовление здорового желудочного сока. 37 г хлорид натрия, 7 мл концентрированной соляной кислоты, 2 мл концентрированной молочной кислоты (40 %), 12 г пептона 11:1 растворяют в 1700 мл воды и процеживают через 2 слоя марли. Раствор хранят в морозильнике (холодильнике).

5. Желудочный сок со сниженной кислотностью. В 1700 мл воды вливают 37 г хлорида натрия, 3,5 мл концентрированной соляной кислоты, 2 мл концентрированной молочной кислоты и 12 г пептона.

Желудочный сок с повышенной кислотностью. Вышеописанным способом, только добавляют еще 20 мл соляной кислоты.

6. Приготовление патологического желудочного сока. В 1 мл желудочного сока без соляной кислоты добавляют 10 мл молочной кислоты (40 %) и 13,5 мл лимонной кислоты (каждый раз перед определением по 10 капель). Данный раствор хранят в черной посуде в морозильнике (холодильнике).

7. Пепсин для заквашивания смеси молоко – ацетат. 100 мл пепсина растворяют в 0,1 н растворе соляной кислоты и добавляют 10 — 20 капель 2 н соляной кислоты (рН и 2,5). После того, как раствор простоял 3 — 4 часа, его объем 0,1 н соляной кислотой доводят до 100 мл. Тогда вливают 0,1 % ный раствор пепсина.

8. Раствор поджелудочного железа (панкреатин). В 5 г сухого панкреатина добавляют от 40 — 50 мл воды до рН и 8,0 Ц. Реакция, которую проводят с фенолфталеином, должна быть слабощелочной. Раствор панкреатина готовят через каждые 2 дня, хранят в морозильнике (холодильнике).

9. Приготовление препарата поджелудочного железа. Поджелудочное железо рогатого скота или свиньи очищают от жиров и измельчают, затем вливают ацетон, 3 раза превышающий по объему, и в течение 10 — 12 часов обезжиривают. Ацетон выливают и обезжиривание ацетоном повторяют еще 1-2 раза. Ацетон фильтруют, осадок промывают сначала спиртом, затем эфиром и сушат между фильтровальными бумагами на воздухе. Полученный продукт намалывают в ступке.

10. Приготовление сухого яичного желтка. Яичный желток мажут на стеклянную пластинку, сушат при комнатной температуре. Высушенный желток скребут со стеклянной пластинки и намалывают в ступке до состояния порошка.

11. Приготовление смеси молоко - ацетат. Свежее молоко (относительная плотность 1,030) смешивают с рН и 4,9 раствором ацетата буфера в соотношении 1:1. Эту смесь в закрытом состоянии можно хранить в морозильнике (холодильнике) в течение 2 недель. Если оставить эту смесь в расширяющейся воронке, можно легко удалить отстоявшееся масло, в результате чего использование смеси станет более удобным. Если использовать порошок сухого молока, то 2,5 столовой ложки этого порошка растворяют в стакане теплой воды, кипятят и в выше приведенном соотношении 1:1 смешивают с рН и 4,9 буфером ацетата.

12. Аммиачный раствор серебра. В 1 — 3 % ный раствор нитрата добавляют концентрированный аммиак до растворения. При этом образовывается раствор едкого серебра.

13. 2 % ный раствор нитрата серебра. В 2 г нитрата серебра вливают 100 мл воды и готовят аммиачный раствор серебра.

14. 0,1 н раствор нитрата серебра. 16,988 г нитрата серебра помещают в мерную колбу с объемом 1 л, смешивают с водой, доводят объем до 1 л. А 0,01 н раствор готовят из этого 0,1 н раствора непосредственно перед употреблением. Его титр определяют с помощью 0,01 н раствора хлорида натрия (0,585 г - 1 л воды).

15. Раствор ацетата буфера с рН и 5. 45 г (химически очищенный) гидроксид натрия сначала растворяют в 400 — 500 мл воды. Данный раствор охлаждают, переливают в колбу с объемом 1 л, добавляют 115 мл уксуса со льдом и общий объем раствора доводят до 1 л.

16. Раствор ацетата с рН и 4,8.

1) Для приготовления раствора ацетата натрия с 0,2 н берут 27,22 г данной соли, растворяют в мерной колбе до объема 1 л.

2) готовят из 0,2 н раствора уксусной кислоты (фиксанола). Берут из первого раствора 480 мл и из второго раствора 520 мл и смешивают, проверяют рН смеси.

17. Абсолютный спирт. Для этого используется безводный сернокислой меди (11). Обезвоживают в сушильном шкафу при температуре 220°C. Соль перемешивают до обесцвечивания. В безводный сернокислой меди добавляют 95% ный этиловый спирт и тщательно перемешивают. Сернокислый (2) меди синееет, значит втягивает воду из спирта, этот процесс повторяют, добавляя несколько раз новых солей, до обесцвечивания сернокислого (2) меди.

18. 1 % ный рствор бензидина. Объем 1 г бензидина, разморозив, доводят до 100 мл, хранят в черной посуде в морозильнике (холодильнике) (используется бензидин, имеющий основу).

19. Основной раствор билирубина. 8 мг билирубина растворяют в 7 мл 0,1 М безводном углекислого натрия (1,06 г безводного углекислого

натрия растворяется до объема 100 мл), объем с помощью раствора доводят до 10 мл. Рабочий раствор билирубина готовят из основного раствора, сжиженного 8 раз. Для этого в 7 мл свежую негемолизированную сыворотку добавляют 1 мл 80 % ного свежее приготовленного раствора билирубина и 0,05 мл (1 капля) 4 н раствора уксусной кислоты (22,6 мл уксусной кислоты со льдом с помощью воды доводят до объема 100 мл). Раствор тщательно перемешивают. При хранении рабочего раствора в морозильнике (холодильнике) бывает стабильным до одних суток.

20. Реактив молибдена. 7,5 г соли молибдата аммония растворяют в 50 мл концентрированной азотной кислоты.

21. Реактив Биурета. 1,5 г сернокислого меди и 60 г тартарата калия растворяют в 300 мл 10 % номрастворе едкого натрия и с помощью дистиллированной воды общий объем реактива доводят до 1 л.

22. Реактив Фоли. 1,5 — 2 л колбу с круглым дном помещают г соли молибдата натрия и растворяют в 700 мл дистиллированной воды. В раствор добавляют 50 мл 80 % ной фосфатной кислоты и 100 мл концентрированной сернокислой кислоты. Колбу прикрепляют к восстановительному холодильнику и кипятят в течение 10 часов, затем добавляют 150 г сернокислого лития, 50 мл воды и 3 - 4 капли брома. Раствор охлаждают до комнатной температуры и его объем с помощью воды доводят до 1 л и фильтруют в - . Раствор имеет яркий желтый цвет. Данный раствор хранят в черной посуде и перед применением сжижают в соотношении 1:1.

23. Реактивы для способа электрофореза полиакриламидной гели:

1—реактив 1 моль/л раствор серной кислоты - 48 мл; ТРИС (трирксиметиленаминометанхлоргидрат) - 3,6 г. ТМЕД – 0,23 мл доводят до объема 100 мл дистиллированной водой.

2 - реактив. Акриламид - 30; метилен - бис – акрила - мид 0,8 г; дисталлированной водой доводятдо 100 мл.

3 - реактив. 14 г пероксидасульфата аммония растворяют в 100 мл воды. Готовят непосредственно перед опытом.

24. Реактив для определения активности аргиназы.

1) Приготовление ферментного препарата из печени крысы: ткань на льде тщательно измельчают ножницами, в 1 гомогенизируют. Сначала обрабатывают 10 кратным объемом охлажденного ацетона, затем - эфиром в малом количестве, ацетон и эфир пропускают через фильтр. Осадок сушат в Бюхнеровой воронке и намалывают до мелкого порошка. Сухой эфир — ацетоновый порошок хранят в морозильнике (холодильнике). Перед опытом этот порошок экстрагируют в течение 20 минут с буфером глицина в 10 кратном объеме (рН и 9,5);

2) Буфер глицина (рН и 9,5), 80 мл 0,1 моль/л раствор глицина перемешивают с 20 мл 0,01 моль/л раствором едкого натрия. Можно использовать 0,1 моль/л раствора пирофосфата (рН и 9,5);

3) Основной раствор хлорида (Ш) железа. 5 г хлорида (Ш) железарастворяют в воде и доводят объем до 100 мл, в него добавляют 8 мл

концентрированной серной кислоты.

25. Приготовление буфера фосфата. 11,9 г соли гидрофосфата динатрия (моль. мас. 178,01) и 9,1 г соли дигидрофосфата калия (мол. мас. 136,09) по отдельности растворяют в хорошо кипяченной дистиллированной воде. С помощью воды объем каждой растворенной соли доводят до 1 л. Для приготовления буферного раствора в нужной рН растворы I и II перемешивают согласно таблице.

Буфер рН и	Гидрофосфат натрия, мл	Дигидрофосфат калия, мл	Буфер рН и	Гидрофосфат натрия, мл	Дигидрофосфат калия, мл
5,9	0,5	9,5	6,9	6,0	4,0
5,91	1,0	9,0	7,1	7,0	3,0
6,24	2,0	8,0	7,3	8,0	2,0
6,47	3,0	7,0	7,4	9,0	1,0
6,64	4,0	6,6	8,0	9,5	0,5
6,31	5,0	5,0			

26. Буфер веронал — барбитал с рН и 8,6, 0,05 ионовым напряжением. 10,32 барбитал натрия растворяют в 300 мл воды, к нему добавляют 1,84 г барбитала и в водяной бане разогревают до растворения барбитала, затем объем доводят до 1 л.

27. Буферы рН и 8,6 веронал ацетат, барбитал - ацетат. В 300 мл воды растворяют 4,3 г барбитала, 0,95 г натриевой щелочи и 3,24 г ацетата натрия, затем в раствор добавляют 30 мл 0,1 М соляной кислоты и общий объем доводят до 1 л.

28. Буфер глицерофосфата рН и 9,0. 2,15 г натрий бетта - глицерофосфат и 2,15 г барбитала - натрия растворяют в воде, общий объем доводят до 500 мл. Его рН проверяют. Раствор хранят под толуолным слоем в морозильнике (холодильнике).

29. 0,005 и раствор гипосульфата (тиосульфата). Перед употреблением готовят 0,1 фиксонал. 5 мл 0,1 н раствора вливают в мерную колбу с вместимостью 100 мл, водой объем доводят до 100 мл. Если нет фиксанола, то 25 г тиосульфата натрия растворяют в 1 л хорошо кипяченной и охлажденной воде. Через 10 дней после приготовления его титропределяют с помощью титрованного несколько раз раствора KJ_2O_8 . Раствор 0,005 н 0,1782 г KJ_2O_8 калия йода готовят растворением в дистиллированной воде и доведением объема до 1 л. Для определения титра раствора тиосульфата натрия в 2 мл раствора KJ_2O_8 добавляют 2 мл 3 % ного троичного раствора хлора - цинка - йода, 2 капли раствора крахмала и выделенный йод (J_2) титруется раствором тиосульфата до обесцвечивания.

30. Диазореактив для определения количества билирубина.

1- 5 г диазореактивной (чистая без воды) сульфанильной кислоты растворяют в 300 - 400 мл воды легким нагреванием (в горячей воде под водопровода) и добавляют 15 мл концентрированной хлорной кислоты. После полного растворения и охлаждения объем доводят до 1 л.

2— диазореактивный 0,5 % ный азотнокислого натрия готовят перед употреблением.

Диазосмесь. Перед определением билирубина перемешивают 10 мл 1 - диазореактива и 0,30 мл 2 — диазореактива.

31. 0.1 % раствор 2,4 — динитрофеилгидрозина (2,4 - ДНФГ) и 20 мл концентрированной соляной кислоты водой доводят до объема 100 мл (примерно 2 н HCl). В 100 мг 2,4 - ДНФГ постепенно до полного растворения добавляют 100 мл раствора приготовленной 2 н соляной кислоты. Затем раствор фильтруют, хранят в морозильнике (холодильнике): если 2,4 — ДНФГ раствор плохо растворяется, то его оставляют еще на одни сутки, затем, взбалтывая, разогревают в потоке горячей воды.

32. Реактив дифениламина. 1 г дифенила (дважды перекристаллизированный в 70 % ном спирте и эфире петролей) растворяют в смеси 2,75 М концентрированной серной кислоты и 100 мл уксусной кислоты.

33. 0,001 н раствор 2,6 - дихлорфенолиндофенола (2,6 - ДХФИФ) натриевой соли. Для приготовления этого раствора используют смесь фосфата буфера (1/15 по М. Серенсену), так как в водном растворе индикатор быстро расщепляется. Для этого 9,078 г дигидрофосфата калия и 11,867 г гидрофосфата натрия растворяют в 1 л воды. Растворы хранят по отдельности. Затем их смешивают в соотношении 2:3 до рН и 6,9 - 7,0. Взвешивают 0,25 г краски, добавляя в нее 700 мл воды, взбалтывают. На нее быстро расщепляется индикатор в водяном растворе. Для этого 9,078 г дигидрофосфата калия и 11,867 г гидрофосфата натрия растворяют в 1 л воды. Растворы хранят отдельно. Затем их в соотношении 2:3 перемешивают до рН и 6,9 - 7,0. Взвешивают 0,25 г краски, добавляя в нее 700 мл воды, взбалтывают. В нее добавляют 300 мл буферной смеси. На следующий день раствор фильтруют и тщательно перемешивают. Его титр определяют с помощью соли Мора. Для этого в маленькую колбу взвешивают 10 мл индикатора, в него добавляют 5 мл раствора насыщенного оксалата аммония и титруют 0,01 г желтой солью Мора. Для приготовления 0,01 г соли Мора 3,92 г соли растворяют в 1 л раствора 0,02 н серной кислоты. А титр раствора соли Мора определяют с помощью 0,01 н раствора перманганата калия.

34. 0,005 н щелочный раствор ферроцианида калия (красной кровяной соли) для определения глюкозы методом Хагедерн - Йенсена. Взвесив 1,65 г красной кровяной соли (химически чистой), растворяют ее в воде 1 л колбы, добавляют 10,6 безводный углекислого натрия, объем водой доводят до 1 л. Раствор хранят в черной посуде в морозильнике (холодильнике). Данный препарат должен быть проверен на отсутствие

соединения трехвалентного железа (Fe^{3+}) и ферроцианида. Качественные реакции, проведенные на обоих соединениях, должны быть отрицательными.

а) В 1 мл 5 % ного раствора красной кровяной соли добавляют 1 каплю 1 % ной серной кислоты и 1 капля 10 % раствора ферроцианида калия. Трехвалентность железа окрашивает раствор в синий цвет.

б) 1 мл 5 % раствор красной кровяной соли добавляют 2 капли 2 % ного раствора хлорида (Ш) железа и 2 капли раствора соляной кислоты, перемешивают. Наличие в растворе ферроцианида калия можно определить образованием синего цвета.

35. 0,01 н раствор ферроцианида калия для определения мочевой кислоты. 3,292 г красной кровяной соли и 2 г натриевой щелочи растворяют в 1 л воды. Титр реактива определяют относительно мочевой кислоты. Для этого в 1,5 мл постоянного раствора мочевой кислоты добавляют 1 мл 20 % ного углекислого натрия и 1 мл реактива фосфор - вольфрам. Образовавшийся синий цвет титруется до обесцвечивания и находят, сколько мочевой кислоты приходится на 1 мл красной кровяной соли.

36. Раствор индигокармина. 1 г индигокармина намалывают в ступке, растворив 50 мл концентрированной серной кислоты, постепенно объем доводят водой до 1 л и фильтруют. Реактив хранят в черной посуде. Его пригодность составляет 7-10 дней.

37. Индикатор Таширо (основной раствор). 40 мл 0,1 % ного спиртового раствора метилового — красного и 10 % ного спиртового раствора метилового синего.

Рабочий раствор. 1 объем основного раствора, 1 объем спирта, 2 объема воды. В кислотной среде (рН и 4,4) наблюдается фиолетово - красный, в щелочной среде (рН и 6,2) - зеленый цвет.

38. Основной раствор йода. Для определения микроэкспрессным методом амилазы сыворотки крови 0,25 г кристаллов йода и 0,86 йодида калия растворяют в 20 мл воды.

39. Рабочий раствор йода. Основной раствор йода 50 раз растворяют в 0,2 н соляной кислоты. Раствор стабилен в течение 1 часа; готовят непосредственно перед употреблением.

40. 0,1 % ный раствор крахмала (рабочий раствор). Для определения амилазы сыворотку крови переводят в теплую воду. После охлаждения в комнатной температуре, объем водой доводят до 100 мл. Хранят в морозильнике (холодильнике) до 5 дней.

41. 1 % ный раствор крахмала для определения сахара методом Хагедорн — Йенсена. В 1 г растворимого крахмала добавляют 100 мл насыщенного раствора хлорида натрия и в химическом стакане, постоянно перемешивая, нагревают.

42. Реактив кофеина. 5 г чистого кофеина, 7,5 г бензоата натрия и 12,5 г ацетата натрия растворяют в 70 мл воды путем нагревания в низкой температуре (до 80°C). Затем объем водой доводят до 100 мл. Можно хранить 2 недели.

43. Реактив молибдена для определения фосфора. Бензоат натрия и 12,5 г ацетата натрия растворяют в 70 мл воды, добавляют 500 мл концентрированной азотной кислоты.

44. 2,5 % ный раствор молибдата аммония. Для определения «Р» методом Блур 2,5 молибдата аммония растворяют в 50 мл 10 н серной кислоты, объем водой доводят до 100 мл.

45. Реактив меди. 6,45 % ный азотнокислого меди готовят из 10 объемов раствора три гидрата, 9 объемов 1 М раствора триэтаноамина (относительная масса 149) и 1 объема 1 н уксусной кислоты.

46. Реактив Ортолоуидана. 0,15 г тиомочевины растворяют в 94 мл химически чистой охлажденной уксусной кислоты, смешивают с 6 мл бесцветного раствора О - толуидина. Реактив в почти стабильном состоянии хранят в морозильнике (холодильнике).

47. Пировиноградная кислота. 50 мг пировиноградной кислоты или 62,5 мг натриевой соли пировиноградной кислоты растворяют в 100 мл воды. К 1 мл раствора приходится 0,5 мг пировиноградной кислоты. Перед употреблением раствор 10 раз сжижают (1 мл раствора содержит 50 мг ПУК).

48. Рабочий реактив для определения глюкозы. К 0,25 н буферу ацетата 80 мл рН и 4,8 добавляют 2 мг глюкооксидазы и 1 мг сухой кристаллической пироксидазы. Затем вливают 1 мл 1 % ного раствора О — толуидина в абсолютном спирте, буфером ацетата объем доводят до 100 мл. Раствор хранят в черной посуде в морозильнике (холодильнике). Добавляют все ферменты. Перед употреблением раствор приводят к комнатной температуре.

49. 0,25 М раствор сахарозы. В опыте 0,02 М (рН 7,4) трис - буферосодержащий раствор. Готовят оксиметил - аминотанхлоргидрат с буферным раствором 0,2 М трис (относительная масса 121,14). 24,33 г триса растворяют в 1 л воды. Из 0,2 М раствора готовят 0,02 М раствор. Для этого 0,1 н раствор едкого натрия 10 мл 0,2 М триса с участием индикатора “Рифан” капают до рН и 7,4. Затем общий объем водой доводят до 100 мл. 0,25 М раствор сахарозы (относительная молек. масса 339): 84,75 г сахарозы растворяют в 0,02 М трис – буфере.

50. Растворы аминокислоты для метода хроматографии. Аминокислоты растворяют в количестве (0,04) 1/25 М.

Растворяют в 10 мл воды: 60 мг

глутаминовая кислота 40 мг

аланин 50 мг

или можно использовать следующие аминокислоты (растворяют в 10 мл воды).

1. Глутаминовая кислота 60 мг

глицин 40 мг

аланин 40 мг

2. Глутаминовая кислота 60 мг

лейцин 50 мг

3.	Аспарагиновая кислота	60 мг
	серин	40 мг
	лейцин	60 мг
4.	Аспарагин кислота	60 мг
	глицин	40 мг
	лейцин	60 мг

Для повышения растворимости аминокислот их можно нагревать в водяной бане.

51. Оксид алюминия, обработанный соляной кислотой. 500 г оксида алюминия (химически чистый) помещают в фарфоровую ступку, сверху добавляют 2 л 2 н соляной кислоты и в течение 30 - 40 минут нагревают, постоянно перемешивая стеклянной палочкой. После окончания нагрева и оседания соляной кислоты, жидкость убирают. Вышеописанную реакцию промывания повторяют еще раз. Затем убирают жидкость над осадком, сверху него вливают 1 л бидистиллированной воды. Смесь алюминия переводят в Бюхнеревую воронку, оксид алюминия несколько раз промывают до того, как помойная вода доходит до рН 6. Оксид алюминия сушат в сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре 200 - 500°C. Оксид алюминия, обработанный соляной кислотой, можно использовать для второго этапа хроматографии.

52. 10 % ный раствор йода в йодиде калия. 20 г йодида калия и 10 г йода растворяют в 50 мл воды, объем приводят до 100 мл. Раствор, полученный для проведения реакции на крахмале, сжижают 10 раз.

53. Раствор гипобромида. 5 мл брома растворяют в 100 мл 30 % ного едкого натрия, в холоде, растворяют в вытяжном шкафу. Раствор перед употреблением 6 раз (1:5) сжижают 10 % ным раствором едкого натрия.

54. Реактив Миллона. 40 г ртути растворяют при комнатной температуре в 60 мл концентрированной азотной кислоты (относительная плотность 1,40) и затем раствор до окончания паров, выделяемых от окисления азота, размещают в теплую водяную баню и перемешивают.

55. Реактив Фелинга. Химически чистый медный купорос кристаллизуют в теплом растворе, сушат на фильтровальной бумаге. Готовят 2 разных вида раствора:

а) 200 г сегнетной соли и 150 г щелочь едкого натрия растворяют в мерной колбе и объем доводят до отметки.

б) 40 г медного купороса в колбе с объемом 1 л. Перед употреблением оба раствора перемешивают в равном объеме.

56. 0,1 н раствор едкого натрия. 50 г химически чистого едкого натрия растворяют в 40 мл воды без углекислого газа и в тот же час плотно закрывают каучуковой пробкой, помещают в стеклянную посуду. Хранят несколько дней, пока не появятся кристаллы биуглекислого а натрия (сода), не растворившегося в сильной щелочи. 6 мл щелочи сжижают до того, пока объем не достигнет 1 л. Состояние раствора проверяют 0,1 н соляной кислотой, приготовленной из фиксонала. 0,05 н раствор едкого натрия сжижают до 20 мл.

Раствор 57. 0,1 н серной кислоты. Объем 2,8 мл серной кислоты (относ. плотность 1,84) доводят до 1 л. Ее титр определяют титрованным раствором едкого натрия. Раствор 0,01 н серной кислоты готовят из 0,1 н раствора. 100 мл 0,01 н серной кислотой сжижают до объема 1 л.

58. Реактив «НАДИ» (готовят за час до употребления). 1 % ный водный раствор диметилларафенилендиамина, б — 1 % ный спиртовой раствор нафтола и 1,5 % ный раствор углекислого натрия перемешивают в равных количествах. Реактив «НАДИ» окрашивают в темно коричневый цвет, он не должен приобрести розовый оттенок. Используют свежеприготовленный раствор НАДИ, так как при хранении он быстро меняется.

59. 1 н раствор перманганата калия. Раствор перманганата растворяют в 50 мл теплой воды (70 - 80°C), объем доводят до 1 л. Его титр определяют 1 н щавелевой кислоты, приготовленной из фиксонала. Готовят из раствора 0,05 н, сжижая 200 раз.

60. Крем для стеклянных кранов. 1) 3 части вазелина и 1 часть парафина (температура растворения парафина 55°C); 2) 500 г вазелина и 10 г естественного каучука (мелкие кусочки) нагревают в водяной бане при температуре 100°C (примерно 6 дней). Чтобы горячий сплав сгустел, в него добавляют щепотку воска. Если крем получится жидким, в него опять добавляют щепотку воска.

61. Стандартные растворы для определения азота. Серноокислый аммония сушат на эксикаторе до постоянного веса. 0,9432 г серноокислого аммония, взвешенного в аналитических весах, растворяют в 1 л воды (1 мл раствора содержит 0,2 мг азота (или 0,4716 г растворяют в 1 л воды) 1 мл раствор содержит 0,1 азота).

62. Стандартный раствор для определения креатинина. 100 мг креатинина растворяют в 100 мл воды (1 мл раствор содержит 1 мг креатинина).

63. Стандартный раствор мочевой кислоты. В 0,5 г мочевой кислоты, хорошо высушенной на чистом эксикаторе, добавляют 0,5 г углекислого лития, 25 мл воды; нагревают при 50 — 60° до растворения. После охлаждения, объем водой доводят до 1 л (1 мл растворе содержится 0,5 мг мочевой кислоты).

64. Насыщенный водой толуол. 250 мл толуола с 250 мл воды взбалтывают в воронке 10 — 15 минут, дают отстояться, осторожно отделяют толуольный слой.

65. Троичный раствор хлор — йод — цинк. 50 г цинка помещают в 1 л колбу с серноокислым и 250 г хлористого натрия, объем водой доводят до отметки и фильтруют. Только перед употреблением в одну часть раствора добавляют 2,5 г йодида калия и объем с вышеуказанной смесью доводят до 100 мл.

66. Насыщенный водой фенол. 100 мл фенола вливают в воронку разделения (предварительно нагретую в водяной бане до 45°C) и в нее добавляют 25 мл воды и взбалтывают, оставляют до того времени, пока не

разделился на семь частей (нижний слой фенола должен быть бесцветным). Фенол нижнего слоя используется для выделения аминокислот бумажно-хроматографическим методом. С фенолом следует быть осторожным.

67. Реактив Фолия для определения фолликулина. В колбу, где установлен восстановительный морозильник, помещают 100 г вольфрамата натрия, 20 г фосфора молибдатной кислоты, 50 мл 85 % ной фосфатной кислоты и 750 мл воды. Колбу, где установлен восстановительный морозильник, закрывают пробкой, кипятят в течение 10 часов. После охлаждения раствора его объем водой доводят до 1 л.

68. 0,5 % ный спиртовой раствор фенолфталеина. 1 г фенолфталеина растворяют в 100 мл спирта, добавляют в него воду.

69. 0,03 М раствор буфера фосфата с рН и 6,9. Раствор 0,1 М гидрофосфата натрия и раствор 0,1 м гидрофосфата натрия в соотношении 1:1 смешивают и раствором 0,1 М хлористого натрия сжижают 3 раза. При хранении в холоде раствор сохраняет стабильность 5-7 дней.

70. Раствор дигидрофосфата калия. Фосфат калия сушат при 120°C до постоянной массы. В 1 л воды растворяют 4,9 г фосфата калия (1 мл раствора содержит 1 мг фосфора).

71. Раствор двухуратной соли гидрофосфата натрия. Фосфат натрия с 12 молекулярной водой распыляют на стекло тонким слоем и на сухом месте, куда не попадает пыль, распыляют 12 — 14 дней. Соль, потеряв определенную влагу, превращается в гидрофосфат натрия. Постоянство массы фосфата натрия означает завершение испарения.

72. Реактив Фолина - фосфовольфрама для определения мочевой кислоты. 100 г кислой соли вольфрамата натрия смешивают с 80 мл воды, 85 % ной фосфатной кислоты - с 900 мл воды, кипятят в течение 2 часов, охлаждают. После этого объем доводят до 1 л.

73. Фракционирующий раствор. Раствор для гель-фильтрации состоит из смеси трех веществ: рибофлавина (насыщенный раствор Вит В₂), 20 % ного раствора гемоглабина, насыщенного раствора синего декстрина (к 100 мл воды приходится 50 мг декстрина), в колонку, наполненную Акрилекс Р - 200, включают 2 капли смеси.

74. Щелочный раствор Эйконогена (б-1, А4-аминонафтолсульфатная кислота). В 100 мл воды растворяют 30 г гидросульфита натрия и в него добавляют 0,5 г эйконогена, 6 г безводного сернокислого натрия отдельно растворяют в небольшом количестве воды. Оба раствора смешивают, объем водой доводят до 250 мл. Через 2 – 3 часа раствор фильтруют. Щелочный раствор (10мл) дистиллированной водой сжижают 2,5 раза.

75. Реактив Орцина.

1. Концентрированная соляная кислота, 0,1 % ный раствор хлористого (III) железа (FeCl₃).

2. В 10 мл приготовленного 0,1 % ного хлористого (III) натрия растворяют 100 мг орцина.

76. Акридекс Р — 200 или Р — 100. Гидролизуют изотоническим раствором хлористого натрия. Для этого 25 г акридекса наполняется 800 мл 0,85 % ного раствора хлористого натрия и оставляют доследующего дня. Образовывается преувеличенный гомогенный продукт. Сверху должен быть слой изотонического раствора хлористого натрия. Преувеличенный акридекс хранят в закрытой посуде, при комнатной температуре несколько дней, а в холодильнике - дольше.

Использованная литература

1. Методы биохимических исследований. Под. ред. проф. М.И.Прохоровой. Л., Изд-во ЛДУ, 1982 г.
2. Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии. М., Изд-во "Высшая школа", 1976 г., с. 256.
3. Мирхамидова П. ва бошқалар. Ҳайвонлар биохимияси. Т., "Меҳнат" нашриёти, 1990 й.
4. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. М., Изд-во "Колос", 1985г.
5. Зикийев А. Ўсимликлар биохимияси. Т., "Меҳнат" нашриёти, 1987 й.
6. Практикум по биохимии. Под ред. С. В. Северина: М., Изд-во МГУ, 1989 г.
7. Новые методы практической биохимии. Под. ред. Б.Л. Кретович, М., Изд-во "Наука", 1989 г.
8. Зикийев А., Мирхамидова П. Ўсимликлар биокимёсидан амалий машғулотлар. Т., "Меҳнат" нашриёти, 2001 й.
9. Третьяков К.Г, Сулайманов А.С.; Ўсимликлар физиологияси асосларидан амалий машғулотлар. "Ўқитувчи" нашриёти, 1970й. (19,31,78,80,85,86 б.)
10. Зайцева Г.Н., Тюленева Н.П. "Количественное определение аминокислот на хроматограммах посредством образования медных производных с нингидрином". Лабораторное дело, 3, М., 1958, с.26-28.

Мундарижа

Сўз бош.....	5
№ 1 лаборатория машғулоти	
Оддий ва мураккаб оксилларнинг тузилиши, хоссалари ва уларнинг ўсимликлар биотехнологиясидаги аҳамияти.....	7
№ 2 лаборатория машғулоти	
Азот ва фосфор бирикмалари миқдорини аниқлаш усуллари.....	13
№ 3 Лаборатория машғулоти	
Оддий ва мураккаб оксилларни алмашинуви, уларнинг усимликларда <i>in vitro</i> ва <i>in vivo</i> шароитида синтезланиши.....	23
№ 4 лаборатория машғулоти	
Ферментлар, уларнинг тузилиши, вазифалари, ферментларнинг спецификлигини ва фаоллигини аниқлаш.....	30
№ 5 лаборатория машғулоти	
Ферментлар, уларнинг алмашинувдаги аҳамияти, хоссалари, ўсимликлар биотехнологиясидаги аҳамияти (яқунловчи машғулоти).....	38
№ 6 лаборатория машғулоти	
Ўсимликлар таркибидаги эрувчан углеводларни аниқлаш.....	38
№ 7 лаборатория машғулоти	
Ўсимликлар таркибидаги пектин моддасини аниқлаш.....	46
№ 8 лаборатория машғулоти	
Ўсимликлар таркибидаги умумий мой (триглицеридларнинг) миқдорини аниқлаш.....	49
№ 9 лаборатория машғулоти	
Нуклеин кислоталар, тузилиши, хоссаси. Генетик ахборотларни кўчириш турлари.....	54
№ 10 лаборатория машғулоти	
Яқуний машғулоти, генетик ахборотни кўчириш турлари, нуклеин кислоталарнинг тузилиши, уларнинг алмашинуви. Липидларнинг тузилиши, уларнинг алмашинуви.....	56
№ 11 лаборатория машғулоти	
Витаминлар ва бошқа моддаларни аниқлаш. Уларнинг ўсимлик организмидаги вазифалари.....	61
№ 12 лаборатория машғулоти	
Ўсимликлар таркибидаги фосфор ва бошқа моддаларнинг миқдорини аниқлаш.....	62
№ 13 лаборатория машғулоти	
Витаминларни аниқлаш ва уларнинг ўсимлик организмидаги вазифалари.....	65
Глоссарий.....	69

Машғулотлар ўтишда фойдаланиладиган маълумотлар.....	78
Буфер аралашмалар.....	79
Айрим реактивлар ва препаратларни тайёрлаш.....	87
Адабиётлар.....	99

Лабораторные занятия по биохимии растений

Содержание

Предисловие.....	5
1-лабораторная работа	
Строение простых и сложных белков, свойства и их значение в биотехнологии растений.....	7
2-лабораторная работа	
Методы определения количество азота и фосфора в соединениях.....	13
3-лабораторная работа	
Обмен простых и сложных белков, их синтез в тканях растений в условиях <i>invitro</i> и <i>invivo</i>	23
4-лабораторная работа	
Ферменты, их строение, функции, определение их специфичности и активности.....	30
5-лабораторная работа	
Ферменты, свойства, их значение в обмене веществ, и в биотехнологии растений.....	38
6-лабораторная работа	
Определение содержания растворимых углеводов в тканях лекарственных растений.....	38
7-лабораторная работа	
Определение содержания пектиновых веществ в составе лекарственных растений.....	46
8-лабораторная работа	
Определение содержания общего жира (триглицериды) в составе лекарственных растений.....	49
9-лабораторная работа	
Нуклеиновые кислоты, строение, свойства. Виды переноса генетической информации.....	54
10-лабораторная работа	
Строение нуклеиновых кислот и их обмен. Строение липидов и их обмен.....	56
11-лабораторная работа	
Определение содержания витаминов и их функции в организме растений.....	61
12-лабораторная работа	
Определение фосфора и других веществ в составе растений.....	62
13-лабораторная работа	
Определение содержания витаминов и их функции в растительном организме.....	65
Глоссарий.....	69
Информации, используемые при проведении занятий.....	78

Буферные растворы.....	79
Приготовление реактивов и препаратов.....	87
Литература.....	99

Practical lessons in molecular biology

Contents

Foreword	5
1-laboratory work	
The structure of simple and complex proteins, properties and their importance in plant biotechnology	7
2-laboratory work	
Determination amount of nitrogen and phosphorus in compound.....	13
3-laboratory work	
The exchange of simple and complex proteins, their synthesis in plant tissues in vitro and in vivo conditions	23
4-laboratory work	
Enzymes, their structure, functions, determination of their specificity and activity.....	30
5-laboratory work	
Enzymes, properties, their importance in the metabolism, and in plant biotechnology	38
6-laboratory work	
Determination of the content of soluble carbohydrates in the tissues of medicinal plants	38
7-laboratory work	
Determination of the content of pectin substances in the composition of medicinal plants	46
8-laboratory work	
Determination of total fat content (triglycerides) in medicinal plants.....	49
9-laboratory work	
Nucleic acids, structure, properties. Types of transfer of genetic information	54
10-laboratory work	
Nucleic acid structures and their metabolism. The structure of lipids and their metabolism	56
11- laboratory work	
Determination of vitamin content and their function in the plant organism.....	61
12 – laboratory work	
Determination of phosphorus and other substances in the plants' composition.....	62
13 – laboratory work	
Determination of vitamin content and their functions in the plant's organism.....	65

Glossary	69
Information used during the lessons.....	78
Buffer solutions.....	79
Preparation of reagents and preparations.....	87
Literature	99



Абзалов Акмал – родился в 1938 году. В 1962 году закончил Ташкентский государственный педагогический университет и получил квалификацию учителя химии и биологии. Начал свою деятельность в этом же высшем учебном заведении ассистентом, работал в Ташкентском государственном аграрном университете и Ташкентском фармацевтическом институте на должностях ассистента, доцента, профессора, заведующего кафедры и декана факультета. Он издал более 650 различных научных работ: 8 монографии, 3 учебника, 6 учебных пособия, 41 рекомендаций к производству, множество научных статей и является обладателем 10 патентов.



Абзалова Нодира Акмалевна – родилась в 1978 году. В 2000 году закончила Ташкентский фармацевтический институт и получила квалификацию инженера-технолога. Начала свою деятельность ассистентом, старшим преподавателем кафедры Биотехнологии, начальником учебно-методического отдела института. В 2017 году присвоено звание «Лучший учитель года-2017» в сфере здравоохранения, награждена нагрудным знаком «Отличника здравоохранения Республики Узбекистан». Издала более 40 научных статей в журналах, перечня ВАК Узбекистана и России, и индексируемых в Scopus. Является обладателем двух регистрационных удостоверений на внедрение в фарминдустрии РУз.