**Задание на 23.06.2020 г.**

**!!! Отчеты по выполненным заданиям присылать старостам в день занятия**

**(см. расписание).**

1. Лекция **«Введение в биохимию. Химический состав живых организмов. Строение и физико-химические свойства аминокислот».**

**!!!***Составить план-конспект.*

Вопросы, которые должны быть изложены в лекции:

– Предмет, цели и задачи биохимии;

– Химический состав живых организмов: понятие о макро-, микро- и ультрамикроэлементах в составе живой материи.

– Классификация аминокислот. Химическая структура аминокислот. Физико-химические свойства аминокислот. Заменимые и незаменимые аминокислоты.

***Все эти вопросы изложены в материалах, которые прилагаю отдельным файлом.***

1. Лекция **«Белки, их биологическая роль».**

**!!!** *Составить план-конспект.*

Вопросы, которые должны быть изложены в лекции:

– Белки, их функции.

– Первичная структура белков. Вторичная структура белков: α-спираль и β-структура. Третичная структура. Глобулярные и фибриллярные белки. Четвертичная структура белков. Характеристика связей, стабилизирующих структуры белков.

– Физико-химические свойства белков: молекулярная масса, амфотерность, растворимость, изоэлектрическая точка белка, денатурация и ренатурация белков.

– Классификация белков. Простые и сложные белки.

***Все эти вопросы изложены в материалах, которые прилагаю отдельным файлом.***

**3.** Студентам, у которых лаб. занятия 23.06.2020 г. (БЭ-1 и БЭ-2) *оформить лабораторную работу* по теме **«Цветные реакции на аминокислоты»** (стр. 166-171 УМК часть 1 Статическая биохимия).

Если у кого-то нет на руках печатного варианта, он есть в электронном виде на сайте университета или см. ниже текст лабораторной работы.

Путь: заходите на сайт университета [www.brsu.by](http://www.brsu.by) → биологический факультет → кафедра химии → учебно-методические издания → биохимия, биологическая химия → 2013 год Биохимия Ч.1 Статическая биохимия (файл находится в запакованном виде rar. (нужно распаковать).

Оформить в виде таблицы (форма таблицы на стр. 166 УМК часть 1 Статическая биохимия или см. в электронном виде, или см. ниже) следующие реакции:

– Биуретовая реакция;

– Нингидриновая реакция;

– Ксантопротеиновая реакция;

– Реакция на триптофан (реакция Адамкевича);

– Реакция на аминокислоты, содержащие серу (цистеин, цистин).

***ПРИМЕР ОФОРМЛЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ***

Лабораторная работа №1 *«Цветные реакции на аминокислоты»*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Название  реакции | Реактивы | Условия проведения реакции | Наблюдаемые изменения | Объяснение полученного результата |
| Биуретовая реакция | 2 мл р-ра белка+ 2 мл 10% р-ра NaOH + 1–2 капли 1% р-ра CuSO4  **(выбираете из текста, который идет после слов выполнение работы. Если указано 2 или 3 пробирки, выбираете, что льете сначала в 1 пробирку, затем 2 и т.д.)** | Комнатная температура  **(указываете условия проведения реакции из текста, например нагревание и т.д.)** | Появляется сине-фиолетовое окрашивание | Биуретовая реакция открывает пептидную связь в молекуле белка  **(текст объяснения берете из материала, который идет сразу после названия реакции)** |

Д/з: решить задачи:

а) Смесь аминокислот, содержащая валин, лейцин, аспарагиновую кислоту, лизин, гистидин и серин, была подвергнута фракционированию методом электрофореза на бумаге при рH = 6,2. Какие из указанных аминокислот будут перемещаться к катоду, к аноду или останутся на линии старта?

б) Две аминокислоты имеют значения pI = 3,24 и 5,65. Какая из них обладает большей подвижностью в электрическом поле при рН = 7,0? В направлении какого электрода будут двигаться эти аминокислоты?

Знать классификацию и физико-химические свойства аминокислот.

1. Студентам, у которых второе лаб. занятия 23.06.2020 г. (БЭ-1) оформить лабораторную работу по теме **«Реакции осаждения белков»** (стр. 171-176 УМК часть 1 Статическая биохимия или см. ниже текст лабораторной работы).

Оформить в виде таблицы (см. пример ранее) следующие реакции:

– Осаждение белков нейтральными солями (высаливание белков);

– Осаждение белков органическими растворителями;

– Осаждение белков минеральными кислотами;

– Осаждение белков органическими кислотами;

– Осаждение белков солями тяжелых металлов.

Д/з: выполнить тесты по теме «Аминокислоты и белки», стр. 202-205 УМК часть 1 или электронный УМК).

*Лабораторная работа 1*

**Цветные реакции на белки и аминокислоты**

Качественные реакции дают возможность обнаружить присутствие белка в биологических объектах и водных растворах, и получить представление о его аминокислотном составе.

**1 Биуретовая реакция**

Биуретовая реакция открывает пептидную связь в молекуле белка. Эту реакцию способны давать вещества, содержащие не менее двух пептид­ных связей. При добавлении к сильнощелочному раствору белка или полипептида ионов меди (II), образуются комплексные со­единения, окрашенные в красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет.

Интенсивность окраски зависит от количества пептидных связей, поэто­му биуретовая реакция используется для количественного определения бел­ка в биологических объектах.

Биуретовую реакцию дают также некоторые аминокислоты (гистидин, треонин, серин, аспарагин).

*Реактивы:*

1. Водный раствор яичного или растительного белка;

2. Гидроксид натрия (NaOH), 10%-ный раствор;

3. Сульфат меди (II) (CuSO4), 1%-ный раствор.

*Выполнение работы*

К 2 мл раствора белка прибавляют 2 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1–2 капли 1%-ного ра­створа сульфата меди и перемешивают. Содержимое пробирки приобрета­ет сине-фиолетовый цвет. В случае избытка сульфата меди образуется си­ний осадок гидроксида меди (II), который маскирует характерное фиолето­вое окрашивание биуретового комплекса белка.

**2 Нингидриновая реакция**

Нингидриновая реакция обусловлена наличием аминокислот имеющих аминогруппы в α-положении. Белки, полипептиды и аминокислоты образуют с нингидрином соединение синего или сине-фиолетового цвета (при нагревании на спиртовке). Нингидриновая реакция является одной из наиболее чувствительных для обнаружения α-аминокислот.

Сущность реакции заключается в том, что α-аминокислоты и пептиды, реагируя с нингидрином, подвергаются окислительному дезаминированию и декарбоксилированию:



α-аминокислота нингидрин восстановленный

нингидрин

Восстановленный нингидрин взаимодействует с аммиаком и второй молекулой нингидрина, в результате чего образуется окрашенное соединение (пурпурный Руэманна):



*Реактивы:*

1. Водный раствор яичного белка;

2. Глицин, 0,1%-ный водный раствор;

3. Нингидрин, 0,1%-ный спиртовой раствор.

*Выполнение работы*

В одну пробирку наливают 1–2 мл глицина, в другую – столько же раствора белка. В обе пробирки добавляют раствор нингидрина (в первую 5–6 капель, во вторую – 10–12), нагревают на спиртовке около минуты. В пробирке с глицином быстро появляется фиолетово-синее или фиолетовое окрашивание, в пробирке с белком окрашивание развивается медленно и имеет красновато-фиолетовый оттенок.

**3 Ксантопротеиновая реакция**

Характерна для некоторых ароматических (циклических) аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан). При нагревании белков и полипептидов с концентрированной азотной кислотой образуется нитросоединение жёлтого цвета.

Ксантопротеиновую реакцию, кроме белков, пептидов и циклических аминокислот, дают также многие простые ароматические соединения (бензол, фенол и др.).

Реакция протекает в две стадии:



тирозин динитротирозин (желтого цвета)



хиноидная форма аммонийная соль динитротирозина

динитротирозина (желто-оранжевого цвета)

*Реактивы:*

1. Водный раствор яичного или растительного белка;

2. Азотная кислота (HNO3), концентрированная;

3. Фенол, 0,1%-ный раствор;

4. Желатин, 1%-ный раствор.

*Выполнение работы*

***Реакции следует проводить под тягой!***

К2–3 мл раствора фенола осторожно (по стенке пробирки) приливают 1–2 мл концентрированной азотной кислоты. Осторожно нагревают на спиртовке, появляется жёлтое окрашивание.

В другую пробирку наливают 1–2 мл раствора белка, прибавляют 8–10 капель концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. Выпадает осадок, который окрашивается в жёлтый цвет.

В третью пробирку наливают 1–2 мл раствора желатина, прибавляют 8–10 капель концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. Желтое окрашивание не наступает, так как желатин не содержит ароматических аминокислот (иногда может появиться очень слабое желтоватое окрашивание, обусловленное примесью других белков).

**4 Реакция на триптофан (реакция Адамкевича)**

При наличии в молекуле белка аминокислоты триптофана прибавление нескольких капель глиоксиловой кислоты (являющейся примесью к концентрированной уксусной кислоте) вызывает образование красно-фиолетового кольца на границе с концентрированной серной кислотой.

Реакция протекает по уравнению:



глиоксиловая кислота



*Реактивы:*

1. Неразбавленный яичный белок;

2. Желатин, 1%-ный раствор;

3. Уксусная кислота (СН3СООН), концентрированная;

4. Серная кислота (Н2SО4), концентрированная.

*Выполнение работы*

***Реакции следует проводить под тягой!***

В одну пробирку наливают несколько капель неразбавленного яичного белка, прибавляют 1–2 мл концентрированной уксусной кислоты и осторожно нагревают до растворения выпавшего осадка, после чего охлаждают и **(осторожно!)** по стенке пробирки, наклонив её, наслаивают 1 мл концентрированной серной кислоты, следя, чтобы не произошло смешивания жидкостей. На границе двух слоев через некоторое время появляется красно-фиолетовое кольцо.

Эту же реакцию проделывают с раствором желатина – окрашивание не появляется, так как триптофан не входит в состав желатина.

**5 Реакция на аминокислоты, содержащие серу (цистеин, цистин)**

Известны три серосодержащие аминокислоты: цистеин, цистин и метионин.

В молекулах цистеина и цистина сера связана слабо и легко отщепляется при щелочном гидролизе в виде сероводорода, который реагирует со щелочью, образуя сульфиды натрия или калия. Сульфиды взаимодействуют с уксуснокислым свинцом (вернее, с плюмбитом) с образованием осадка сернистого свинца черного или буро-черного цвета. Реакции протекают по следующим уравнениям:

1. CH2 – SH CH2 – OH

׀ ׀

CH –NH2  + 2NaOH → CH –NH2  + Na2S + H2O

׀ ׀

COOH COOH

Цистеин Серин

2. Pb(CH3COO)2 + 2NaOH → Pb(OH)2 + 2CH3COONa

Pb(OH)2 + 2NaOH → Na2PbO2 + 2H2O

3. Na2S + Na2PbO2 + H2O → PbS**↓** + 4NaOH

*Реактивы:*

1. Водный раствор яичного или растительного белка;

2. Желатин, 1%-ный раствор;

3. Гидроксид натрия (NaOH), 15–20%-ный раствор;

4. Уксуснокислый свинец (Pb(CH3COO)2), 1%-ный раствор.

*Выполнение работы*

***Реакции следует проводить под тягой!***

В одну пробирку наливают 2 мл раствора яичного или растительного белка, в другую – столько же раствора желатина. В обе пробирки добавляют по 1–1,5 мл раствора щелочи и осторожно нагревают до кипения, кипятят 1–2 минуты, после чего в каждую пробирку прибавляют по 2–3 капли раствора уксуснокислого свинца (Pb(CH3COO)2).

В пробирке с яичным (или растительным) белком появляется буровато-черное или черное окрашивание, интенсивность которого зависит от концентрации раствора белка и содержания в нем цистеина и цистина. Раствор желатина окрашивания не дает. Это свидетельствует о том, что в состав желатина не входят серосодержащие аминокислоты.

*Результаты всех опытов и их объяснение оформляют в виде таблицы.*

*Лабораторная работа 2*

**Реакции осаждения белков**

Большинство белков относятся к высокомолекулярным соединениям, которые хорошо растворяются в воде. Растворение белков в воде связано с гидратацией его молекул и образованием вокруг частиц белка гидратной оболочки.

Любые физические и химические факторы, нарушающие гидратацию молекул белка и нейтрализующие их заряд, приводят к понижению растворимости белка и способствуют выпадению его в осадок.

Многие факторы влияют на физико-химические свойства белковых веществ, вызывают изменения структуры макромолекул. Данный про­цесс известен как денатурация. При денатурации нарушается активная конформация белковой макромолекулы. Эти изменения касаются в первую очередь вторичной и третичной структуры без нарушения при этом ковалентных (пептидных) связей.

Реакции осаждения белков бывают обратимыми и необратимыми.

При ***обратимом осаждении*** макромолекулы белка в основном не подвергаются глубокой денатурации, а осадки могут быть снова растворены в первоначальном растворителе (например, воде). Обратимое осаждение вызывается действием нейтральных солей аммония, щелочных и щелочноземельных металлов (высаливание), спирта, ацетона, эфира и некоторых других органических растворителей.

При ***необратимом осаждении*** происходит глубокая денатурация белка, он теряет свойства гидрофильности и становится гидрофобным. Денатурированный белок неспособен к восстановлению своих первоначальных физико-химических и биологических свойств. Необратимое осаждение вызывается высокой температурой, действием концентрированных минеральных и некоторых органических кислот, ионов тяжелых металлов, красителей.

**1 Осаждение белков нейтральными солями (высаливание)**

Выпадение белков в осадок при действии на них растворов нейтральных солей аммония, щелочных и щелочеземельных металлов называется ***высаливанием.*** Этот процесс основан на дегидратации белков и нейтрализации зарядов белковых частиц адсорбирующими на них ионами соли. При этом белковые растворы теряют устойчивость, частицы белка слипаются и выпадают в осадок. Высаливание – обратимый процесс. Осадки можно снова растворить в воде, при этом наблюдается значительная степень восстановления свойств белков.

*Реактивы:*

1. Раствор яичного белка с хлоридом натрия;

2. Сульфат аммония (NH4)2SO4, кристаллический (тонко растертый порошок);

3. Сульфат аммония (NH4)2SO4, насыщенный раствор;

4. Гидроксид натрия (NaOH), 10 %-ный раствор;

5. Сульфат меди (II) (CuSO4), 1 %-ный раствор.

*Выполнение работы*

В пробирку наливают 2–3 мл раствора белка, добавляют 2–3 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. Выпадает осадок глобулинов, альбумины остаются в растворе. Осадок отфильтровывают через бумажный фильтр.

К фильтрату добавляют порошок сульфата аммония до получения насыщенного раствора (последняя порция соли уже не растворяется). Выпадает осадок альбуминов, который также отфильтровывают.

С фильтратом проделывают биуретовую реакцию. Если произошло полное осаждение белков, она должна быть отрицательной.

**2 Осаждение белков органическими растворителями**

Органические растворители (спирт, эфир, ацетон) вызывают дегидратацию белковых макромолекул, разрушают их водные оболочки, что понижает устойчивость белков в растворе и ведёт к выпадению в осадок. Способствует осаждению присутствие электролитов (например, хлорида натрия) в растворе. Если при этом присутствует небольшое количество солей (например, NaCl), то осадок образуется полнее и быстрее. Ионы солей связываются коллоидными частицами белка и нейтрализуют их заряд. Это обстоятельство еще более снижает устойчивость раствора белка. Если осаждение проводить на холоду и полученный осадок быстро отделить от спирта, то белок может быть снова растворен в воде, т.е. свойства его в этом случае не изменяются, денатурация не успевает произойти и осаждение обратимо. При стоянии со спиртом белок денатурирует и становится нерастворимым в первоначальном растворителе.

*Реактивы:*

1. Раствор яичного белка;

2. Этиловый спирт (C2H5OH);

3. Ацетон;

4. Хлорид натрия (NaCl), кристаллический.

*Выполнение работы*

В пробирку наливают 1–2 мл раствора яичного белка, добавляют немного порошка хлорида натрия (NaCl) и взбалтывают до растворения. По каплям приливают 2 мл этилового спирта (либо ацетона) и взбалтывают. Выпадает осадок белка, который вновь растворяется при разбавлении водой.

**3 Осаждение белков минеральными кислотами**

Концентрированные минеральные кислоты вызывают необратимое осаждение белков из растворов. Это осаждение объясняется как явлением дегидратации белковых частиц и нейтрализацией их заряда, так и рядом других причин (например, образование комплексных солей белка с кислотами и др.). Осадки, вызванные действием минеральных кислот, растворяются в избытке серной и соляной кислоты, но не растворяются в избытке азотной.

*Реактивы:*

1. Раствор яичного белка;

2. Серная кислота (H2SO4), концентрированная;

3. Азотная кислота (HNO3), концентрированная;

4. Соляная кислота (HСl), концентрированная.

*Выполнение работы*

***Реакции следует проводить под тягой!***

Втри пробирки наливают по 1 мл раствора кислот: в первую – соляной, во вторую – серной, в третью – азотной. Осторожно по стенке пробирки, чтобы жидкости не смешивались, приливают равный объем раствора белка. На границе двух жидкостей образуется осадок в виде небольшого кольца. Пробирки осторожно встряхивают, добавляют избыток соответствующих кислот. Осадки белка растворяются в серной и соляной кислотах, но не растворяются в азотной.

**4 Осаждение белков органическими кислотами**

Органические кислоты необратимо осаждают белок из растворов. Различные кислоты отличаются по силе действия. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), сульфосалициловая кислота являются очень чувствительными и специфическими реактивами на белок, широко применяются с этой целью. Осаждение белков с помощью ТХУ в конечной концентрации 2,5–5 % часто применяется для полного удаления белка из биологических жидкостей (например, из сыворотки крови), т. к. ТХУ осаждает только белки, а продукты их распада остаются при этом в растворе. Это особенно важно, когда нужно определить отдельно содержание азота белка и азота более низкомолекулярных продуктов: аминокислот, мочевины и др. – так называемый «небелковый азот». В этом случае, если после осаждения белков требуется из фильтрата удалить ТХУ, то это достигается его кипячением, в результате чего ТХУ разлагается на хлороформ и угольный ангидрид, которые улетучиваются.

*Реактивы:*

1. Раствор яичного белка;

2. Сульфосалициловая кислота, 10 %-ый раствор;

3. Трихлоруксусная кислота, 10 %-ый раствор.

*Выполнение работы*

В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка и добавляют в первую 5–8 капель раствора сульфосалициловой, а во вторую – столько же раствора трихлоруксусной кислоты. В обеих пробирках белок выпадает в осадок.

**5 Осаждение белков солями тяжелых металлов**

Белки осаждаются солями свинца, ртути, серебра, меди и других тяже­лых металлов. В этом случае денатурация белка вызывается адсорбцией ионов тяжелых металлов на поверхности белковых молекул с образованием нерастворимых комплексов.

Избыток некоторых солей (сульфата меди, ацетата свинца и других) ве­дет к растворению осадка (пептизации). Ионы металла, адсорбируясь на поверхности белковых мицелл, придают им положительные заряды. Одноименно заряженные мицеллы отталкиваются, что способствует их переходу из осадка в раствор.

*Реактивы:*

1. Раствор яичного белка;

2. Сульфат меди (CuSO4), 1 %-ный раствор;

3. Ацетат свинца (Pb(CH3COO)2), 5 %-ный раствор;

4. Нитрат серебра (AgNO3), 1 %-ный раствор;

5. Хлорид железа (FeCl3), 5 %-ный раствор.

*Выполнение работы*

В четыре пробирки наливают по 1–2 мл раствора яично­го белка и по каплям добавляют растворы солей: в первую – сульфата меди, во вторую – уксуснокислого свинца, в третью – хлорного железа, в четвертую – нитрата серебра (до выпадения осадков). Затем прибавляют избыток солей и наблюдают растворение осадков в первых трех пробирках. Осадок, образованный нитратом серебра, не растворяется в избытке соли.