

ЗАНЯТИЕ 3.5

ВВЕДЕНИЕ В БИОКИНЕТИКУ.

ФЕРМЕНТЫ КАК СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ГРУППА БЕЛКОВ. СТРОЕНИЕ И ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ.

Ферменты (энзимы) – специализированные белки, входящие в состав всех клеток и тканей живых организмов и выполняющие роль биологических катализаторов. Процессы метаболизма в организме осуществляются при участии ферментов. Любые проявления живого организма - дыхание, нервно-психическая деятельность, секреция, мышечное сокращение и другие тоже непосредственно связаны с действием соответствующих ферментных систем.

Именно поэтому важно знать, что представляют собой ферменты, их строение, свойства, механизм действия, а также использование ферментов для диагностики и лечения заболеваний.

Цель занятия: сформировать представление о ферментах как об уникальных биокатализаторах, строении и свойствах простых и сложных ферментов; изучить некоторые уникальные свойства ферментов на примере фермента уреазы.

Необходимый исходный уровень: студент должен знать понятие о катализе и катализаторах; понятие об энергетическом барьере реакции (энергия активации); понятие о ферментах.

Основные понятия темы: ферменты, скорость реакции, активность фермента, изоферменты, проферменты, мультиферментные комплексы, кофакторы, общие свойства ферментов.

ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ

1. Понятие о скорости химической реакции. Каталитические и некаталитические реакции.

2. Ферменты как биокатализаторы: сходства и отличия ферментов и неорганических катализаторов. Понятие об активности ферментов, единицы активности ферментов. Принципы качественного и количественного определения ферментов.

3. Белковая природа ферментов. Примеры ферментов с третичной и четвертичной структурой. Понятие об изоферментах.

4. История развития учения о ферментах. Номенклатура и классификация ферментов.

5. Классификация ферментов по составу: простые и сложные ферменты. Примеры простых и сложных ферментов. Холоферменты, апоферменты, кофакторы.

6. Кофакторы ферментов: химическая природа, классификация, роль в биологическом катализе. Роль витаминов в построении кофакторов. Коферменты и простетические группы.

7. Общие свойства ферментов: высокая каталитическая активность и эффективность действия, термолабильность, зависимость активности от pH среды, специфичность, регулируемость.

8. Зависимость активности ферментов от реакции среды и температуры: биологическое и медицинское значение этих свойств ферментов.

9. Специфичность действия ферментов. Виды специфичности. Биологическое значение специфичности действия ферментов.

10. Принципы качественного определения ферментов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ (домашнее задание)

Задание 1. Изобразите графически зависимость активности амилазы слюны от температуры, pH среды.

Задание 2. Решите следующую ситуационную задачу: У больного, поступившего на обследование в клинику, обнаружилось в крови увеличение общей активности ЛДГ, которое характерно для болезни сердца, печени, почек. Какой вид современного анализа целесообразно использовать в этом случае для целей дифференциальной диагностики?

Задание 3. Составьте соответствующие уравнения реакций, дайте рабочие названия ферментам, укажите их положение в классификации ферментов:

А) пируват+CO₂+АТФ→оксалоацетат+АДФ+Н₃Р₄

Б) малат→фумарат+Н₂О

В) аспарагин+ Н₂О→аспартат+NH₃

Г) ПВК→ЩУК→Малат

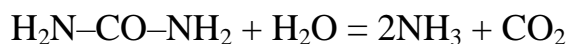
Д) Глюкозо -1-фосфат→Глюкозо-6-фосфат

Ж) Гликоген→Глюкозо-1-фосфат

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Опыт 1. Получение препарата уреазы и обнаружение ее активности (выполняется дежурными для всей группы)

Уреаза относится к III Классу ферментов (Гидролазы), подклассу амидазы. Реакция, катализируемая уреазой, сопровождается образованием аммиака и изменением pH раствора – смещением pH в щелочную сторону:



Присутствие фермента в суспензии обнаруживается по изменению окраски индикатора (фенолфталеина) – развитие малиновой окраски при инкубации с раствором мочевины.

Оборудование и реактивы. Фарфоровая ступка и пестик, химический стакан на 100 мл, воронка, марля для фильтрования, мерные пробирки (2шт), арбузные семечки (4-5 шт), вода дистиллированная, мочевина (1%-ый раствор), фенолфталеин (0,1%-й спиртовой раствор), (1%-ый раствор тиомочевины), спиртовка, буферный раствор с pH=2, буферный раствор с pH=7, штативы, пробирки, автоматические пипетки, наконечники.

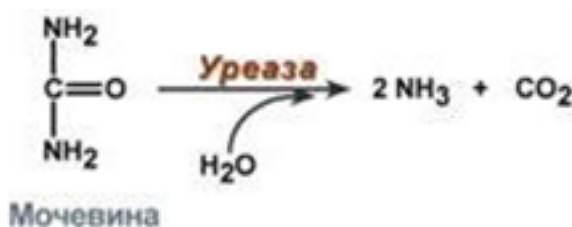
Ход работы: Дежурные при помощи группы готовят суспензию в количестве 40 мл. Для этого 5 арбузных семечек растирают с в ступке, затем

добавляют 5 мл дистиллированной воды, продолжая гомогенизацию и экстракцию, затем добавляют ещё 15 мл воды и фильтруют в стакан через влажную марлю, сложенную в четыре слоя, слегка отжимают, получают суспензию. К полученной суспензии (20 мл) добавляют 20 мл дистиллированной воды, перемешивают.

Передают стакан с суспензией «по конвейеру» на каждое рабочее место, где рабочая группа отбирает в мерную пробирку 6 мл полученного препарата уреазы (суспензии), предварительно перемешивая содержимое стакана.

Обнаружение активности уреазы (демонстрационно):

В пробирку наливают 1 мл суспензии, добавляют 2-3 капли фенолфталеина, затем добавляют 1 мл свежеприготовленного 1% р-ра мочевины. С течением времени наблюдается развитие малинового окрашивания (реакция фенолфталеина на изменение pH среды вследствие протекающего ферментативного процесса).



Результат и выводы:

Опыт 2. Исследование специфичности уреазы

В две пробирки отбирают по 1 мл полученной суспензии, используя мерную пробирку, в которой находится суспензия на рабочем месте.

В обе пробирки добавляют по 2-3 капли раствора фенолфталеина. Затем, в первую пробирку наливают 1 мл раствора мочевины, используя мерную пробирку для мочевины (на рабочем месте).

Во вторую пробирку наливают 1 мл раствора тиомочевины (общий стол), используя дозатор.

Результат и выводы:

Опыт 3. Исследование влияния pH на активность уреазы

В две пробирки отбирают по 1 мл полученной суспензии, используя мерную пробирку, в которой находится суспензия на рабочем месте. Затем, в первую пробирку наливают 1 мл буферного раствора с pH=7,0, а в другую – 1

мл буферного раствора с $\text{pH}=2,0$. В обе пробирки добавляю по 2-3 капли раствора фенолфталеина и по 1 мл раствора мочевины.

Результат и выводы:

Опыт4. Исследование влияния температуры на активность уреазы

В две пробирки отбирают по 1 мл полученной суспензии, используя мерную пробирку, в которой находится суспензия на рабочем месте. Затем, содержимое первой пробирки нагревают на спиртовке до кипения и кипятят 1 мин. Охлаждают на воздухе и под струей воды до комнатной температуры. В обе пробирки добавляю по 2-3 капли раствора фенолфталеина и по 1 мл раствора мочевины.

Результат и выводы: