

ЗАНЯТИЕ 1

«ФЕРМЕНТЫ. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ»

Цель занятия:

1. Знать строение и свойства простых и сложных ферментов;
2. Научиться методам качественного обнаружения ферментов в биологических объектах;
3. Изучить некоторые свойства ферментов на примере фермента *уреазы*.

Необходимый исходный уровень:

Из курса биоорганической химии студент должен знать:

- понятие о катализе и катализаторах;
- понятие об энергетическом барьере реакции (энергия активации);
- понятие о ферментах как о биокатализаторах, их особенности;
- принципы качественного обнаружения ферментов.

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

ОСНОВНАЯ УЧЕБНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биологическая химия с упражнениями и задачами [Текст]: учебник / под ред. С.Е. Северина.- М.: ГЭОТАР - Медиа, 2011.-622 с.

2. Чиркин, А.А. Биохимия/ А.А. Чиркин, Е.О. Данченко М.: Медицинская литература-2010.-605с.

ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ

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

2. Химическая природа ферментов. Изоферменты. Проферменты (зимогены). Мультиферментные комплексы.

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

4. Общие свойства ферментов: высокая активность и эффективность действия, термолабильность, зависимость активности от рН среды, специфичность, регулируемость.

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

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

7. Принципы качественного определения ферментов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ (*Домашнее задание*)

1. Изобразите графически зависимость активности фермента уреазы от температуры, рН среды.

2. Приведите примеры простых ферментов (ферментов-протеинов) и сложных - (ферментов - протеидов или холоферментов).

3. 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?

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Получение препарата уреазы и исследование ее свойств

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



Присутствие фермента в суспензии обнаруживается по изменению окраски индикатора (фенолфталеина) – развитие малиновой окраски.

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

Лабораторная работа № 1 «Получение препарата уреазы и обнаружение ее активности»

(готовят дежурные на всю группу)

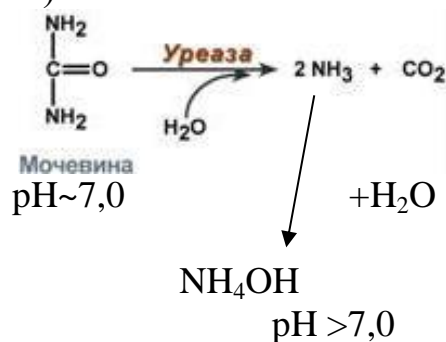
Дежурные при помощи группы готовят суспензию в количестве 40 мл. Для этого 7 арбузных семечек очищают от кожуры при помощи скальпеля и растирают с 5 мл дистиллированной воды, затем добавляют ещё 15 мл воды и фильтруют в стакан через влажную марлю, сложенную в четыре слоя, слегка отжимают, получают суспензию белого цвета. 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 рН среды вследствие ферментативного процесса).



Результат и выводы:

Лабораторная работа № 2 «Исследование специфичности уреазы»

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

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

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

Опишите наблюдаемые явления, сделайте вывод о специфичности уреазы.

Результат и выводы:

Лабораторная работа № 3. «Исследование влияния рН на активность уреазы»

Ход работы: В две пробирки отбирают по 1 мл полученной суспензии, используя мерную пробирку, в которой находится суспензия на рабочем месте. Затем, в первую пробирку наливают 1мл буферного раствора с рН 7,0, а в другую – 1 мл буферного раствора с рН 2,0. В обе пробирки добавляю по 2-3 капли раствора фенолфталеина и по 1 мл раствора мочевины.

Результат и выводы:

Лабораторная работа № 4. «Исследование влияния температуры на активность уреазы»

Ход работы: 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: