

## **Лабораторне заняття №6** **ПЕРЕТРАВЛЕННЯ ТА ОБМІН БІЛКІВ (СЕМІНАР)**

**Мета заняття:** узагальнити особливості перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті та їх обміну в організмі людини.

Перед початком лабораторного заняття вдома виконати ~~з~~ **домашнє письмове завдання:**

Скласти **схему метаболізму білків** на окремому аркуші, що включає: перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті; загальні шляхи розпаду амінокислот в організмі; утворення амоніаку; орнітиновий цикл; глюкогенні та кетогенні амінокислоти.

### **Лабораторна робота №3** **ПЕРЕТРАВЛЕННЯ БІЛКІВ У ШЛУНКОВО-КИШКОВОМУ ТРАКТІ**

**Мета роботи:** провести дослід, щодо перетравлення білків на моделі *in vitro*.

**Практичне значення роботи:** дослідження проводиться для визначення активності ферментів лікарських засобів, що отримані, із підшлункової залози та зі слизової кишківника (трипсин, хімотрипсин, панкреатин, фестал та ін.)

**Матеріали і реактиви:** штатив для пробірок, пробірки, термостат; шматочок вареного курячого яйця, 0,4%-ий розчин натрію карбонату, дистильована вода, 0,1 моль/л розчин хлоридної кислоти, 0,1%-ий розчин трипсину, біуретовий реактив.

#### **Хід роботи**

Беруть три пробірки і наливають в одну з них 2 мл 0,4%-ий розчину натрію карбонату, у другу – воду й у третю – розчин хлоридної кислоти (0,1 моль/л). У першу і третю пробірки додають по 1 мл 0,1%-ого розчину трипсину (або панкреатину) і в другу – 1 мл розчину трипсину (або панкреатину), що попередньо прокип'ятили.

Перемішують проби струшуванням.

У кожен пробірку поміщають по однаковому шматочку звареного курячого яйця і ставлять їх у термостат при 38 °С на 10 хв., слідкуючи за розчиненням білка.

Відзначають зміни, що відбуваються з денатурованим білком у ході інкубації.

Потім вміст пробірок зливають в інші пробірки і проробляють біуретову реакцію.

Результати дослідів запишіть у таблицю 6 за аналогією:

Таблиця 6

## Перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті

№ з/п	Реактиви, які використовують	Зміни, що відбуваються з денатурованим білком у ході інкубації	Зміни, що відбуваються під час реакції біуретової реакції	Висновок
1	2	3		5
1	1) 2 мл 0,4%-ого розчину натрій карбонату; 2) 1 мл 0,1%-ого розчину трипсину (або панкреатину); Струшують. 3) шматочок вареного курячого яйця; Термостат при 38 °С на 10 хв.	Розщеплення білка	Відсутнє забарвлення	Під час дії трипсину (або панкреатину) на шматочок вареного яйця у лужному середовищі відбувається процес руйнування пептидних зв'язків; тому біуретова реакція негативна

**За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.**

#### Лабораторна робота №4

#### ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ДІАЦЕТИЛМОНООКСИМНИМ МЕТОДОМ

**Мета роботи:** засвоїти метод визначення концентрації сечовини в біологічних рідинах (діацетилмонооксимним методом).

**Практичне значення роботи:** найчастіше показником білкового обміну та функціонального стану нирок і печінки з діагностичними цілями є вміст сечовини в крові та сечі.

**Підвищення концентрації сечовини** в крові спостерігається при порушенні видільної функції нирок, при посиленому розпаді білків, надлишковому білковому харчуванні. **Зниження рівня сечовини** в крові та виділення її із сечею спостерігається при захворюванні печінки – цирозі.

**Матеріал:** сироватка.

**Реактиви:** реагент діацетилмонооксиму, реагент тіосемікарбазиду, калібрувальний розчин сечовини (16,65±0,832) ммоль/л, розчин трихлороцтової

кислоти, сульфатна кислота, дистильована вода, фізіологічний розчин (0,9%-ий розчин натрій хлориду).

### **Приготування робочих розчинів.**

**Розчин діацетилмонооксиму.** У мірну колбу на 100 мл переносять вміст 1 ампули реагенту діацетилмонооксиму, доливають дистильованою водою до мітки. Розчин стійкий при температурі від 0 до плюс 25 °С не більше 2 місяців.

**Розчин сульфатної кислоти.** У мірну колбу місткістю 200 мл наливають (60-80 ) мл дистильованої води і додають, при перемішуванні, вміст флакона із сульфатною кислотою. Після охолодження, об'єм розчину доводять до мітки дистильованою водою. Розчин стійкий.

**Розчин тіосемікарбазиду.** У мірну колбу на 100 мл переносять вміст 1 ампули реагенту тіосемікарбазиду і доводять розчином сульфатної кислоти до мітки. Розчин стійкий при температурі від 0 до плюс 25 °С не більше 2 місяців.

**Калібрувальний розчин сечовини** – готовий до роботи.

**Розчин трихлороцтової кислоти.** У мірну колбу на 50 мл переносять 50%-ий розчин трихлороцтової кислоти і доводять розчин, при перемішуванні, до мітки дистильованою водою. Розчин стійкий.

### **Хід роботи**

Аналіз проводиться у відповідності зі схемою, наведеною у таблиці 7.

**Принцип методу:** сечовина з діацетилмонооксिमом, у присутності іонів  $Fe^{3+}$ , та тіосемікарбазиду утворює комплекс *червоно-рожевого забарвлення*, що визначається фотометрично при довжині хвилі 520 нм.

Окремо пробірки холостої проби (контрольної проби), калібрувальної проби, дослідної проби закривають ковпачком (або накривають алюмінієвою фольгою), перемішують вміст і одночасно поміщають у бурхливо киплячу водяну баню на 10 хв.

Потім пробірки швидко охолоджують у проточній воді.

**Проти холостої проби** вимірюють оптичну щільність калібрувальної проби (Е калібрувальної проби) та дослідної проби (Е дослідної проби).

Забарвлення стабільне впродовж 15 хв. Якщо після нагрівання розчин у пробірці з дослідною пробєю мутний, то його центрифугують впродовж 5 хв. або депротейнують розчином трихлороцтової кислоти.

Таблиця 7

Робоча схема проведення досліду, щодо визначення концентрації сечовини в біологічних рідинах (діацетилмонооксимним методом)

Фізіологічний розчин (мл)	Калібрувальний розчин сечовини (мл)	Матеріал, що аналізують (мл)	Розчин тіо-семі-карбазиду (мл)	Розчин діацетил монооксиму (мл)	Показники оптичної щільності	
					Е калібрувальної проби	Е дослідної проби
Холоста проба (контрольна проба)						
0,02	–	–	2,00	2,00	–	–
Калібрувальна проба						
–	0,02	–	2,00	2,00		–
Дослідна проба (1, 2, 3, ... 10)*						
–	–	0,02	2,00	2,00	–	

Примітка. \* – кількість дослідних проб повинна коливатися від 3-х до 10-и відповідно до достовірності результатів, мінімум 1, 2, 3.

**Розрахунок концентрації сечовини (С, ммоль/л) за формулою:**

$$C = 16,65 \cdot E \text{ дослідної проби} / E \text{ калібрувальної проби}$$

де: 16,65 – концентрація сечовини в калібрувальному розчині, ммоль/л;

Е дослідної проби – оптична щільність дослідної проби;

Е калібрувальної проби – оптична щільність калібрувальної проби

**Контроль якості:** достовірність одержуваних результатів контролюють за допомогою атестованих контрольних сироваток «Ліонорм» (Чехія) або «Біоконт С» (Росія).

**Нормальна концентрація сечовини у сироватці венозної крові 3,53-8,3 ммоль/л.**

**За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.**