Міністерство освіти і науки України
Запорізький національний університет

Л. О. Омельянчик, В. І. Генчева, Н. В. Новосад

БІОХІМІЯ З ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Навчально-методичний посібник
для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра
спеціальності «Середня освіта»
освітньо-професійної програми «Середня освіта (біологія та здоров'я людини)»
денної форми здобуття освіти

Запоріжжя
2021

Міністерство освіти і науки України
Запорізький національний університет

Л. О. Омельянчик, В. І. Генчева, Н. В. Новосад

БІОХІМІЯ З ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Навчально-методичний посібник
для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра
спеціальності «Середня освіта»
освітньо-професійної програми «Середня освіта (біологія та здоров'я людини)»
денної форми здобуття освіти

Затверджено
вченою радою ЗНУ
Протокол № від р.

Запоріжжя
2021

УДК: 577(075.8)

О-572

Омельянчик Л. О., Генчева В. І., Новосад Н. В. Біохімія з основами молекулярної біології : навчально-методичний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра спеціальності «Середня освіта» освітньо-професійної програми «Середня освіта (біологія та здоров'я людини)» денної форми здобуття освіти. Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2021. 136 с.

У виданні відповідно до робочої програми навчальної дисципліни «Біохімія з основами молекулярної біології» подано теоретичні основи курсу та зміст чотирнадцяти лабораторних робіт (тематику, перелік матеріалів і реактивів, принципи біохімічних реакцій, методику проведення дослідів у їх логічній послідовності) із обґрунтуванням їх практичного значення.

Викладено правила техніки безпеки, дотримання яких є обов'язковим під час роботи у хімічній лабораторії. Пояснення та інструкції до виконання лабораторних робіт проілюстровано достатньою кількістю рисунків, графіків і формул.

Для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра, які навчаються за освітньо-професійною програмою «Середня освіта (біологія та здоров'я людини)».

Рецензент

В.В. Копійка, канд. біол. наук, доцент кафедри фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини

Відповідальний за випуск

О.А. Бражко, д-р біол. наук, проф., завідувач кафедри хімії

ЗМІСТ

Передмова..... 5
Техніка безпеки під час роботи в хімічній лабораторії..... 8
Особливості роботи з автоматичними піпетками..... 11
Особливості роботи з фотоколориметром (КФК-2)..... 14

Тема 1. Амінокислоти..... 18
Лабораторна робота № 1. Якісні реакції на амінокислоти та білки..... 21

Тема 2. Білки..... 26
Лабораторна робота № 2. Властивості білків..... 30

Тема 3. Виділення, очистка, розділення амінокислот і білків..... 32
Лабораторна робота № 3. Кількісне визначення загального білка в сироватці крові за допомогою біуретового реактиву..... 37

Тема 4. Біохімія ферментів..... 39
Лабораторна робота № 4. Загальні властивості ферментів..... 47

Тема 5. Перетравлення білків та їх обмін..... 53
Лабораторна робота № 5. Перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті..... 55
Лабораторна робота № 6. Визначення сечовини в біологічних рідинах діацетилмонооксимним методом..... 56

Тема 6. Будова, властивості та значення вуглеводів..... 58
Лабораторна робота № 7. Реакції з моносахаридами, дисахаридами та полісахаридами..... 62

Тема 7. Перетравлення вуглеводів та їх обмін..... 65
Лабораторна робота № 8. Визначення молочної кислоти в біологічному матеріалі..... 67
Лабораторна робота № 9. Визначення концентрації глюкози в біологічних рідинах глюкозооксидазним методом..... 68

Тема 8. Будова, властивості та значення ліпідів..... 70
Лабораторна робота № 10. Реакції на жири та жироподібні речовини..... 73

Тема 9. Перетравлення ліпідів та їх обмін..... 76
Лабораторна робота № 11. Дія фосфоліпаз підшлункової залози на гліцерофосфоліпіди яєчного жовтка..... 79

Тема 10. Будова, властивості та значення нуклеїнових кислот.

Транскрипція. Трансляція..... 80
Лабораторна робота № 12. Реакції на складові компоненти нуклеопротеїдів дріжджів…….. 89

Тема 11. Організація генетичного матеріалу..... 90

Тема 12. Молекулярні механізми транскрипцій..... 97

Тема 13. Молекулярні механізми трансляцій..... 103

Тема 14. Реплікація ДНК..... 111

Тема 15. Вітаміни..... 117
Лабораторна робота № 13. Якісні реакції на водорозчинні та жиророзчинні вітаміни……. 125

Тема 16. Біохімія гормонів..... 127
Лабораторна робота № 14. Якісні реакції на гормони……..……. 131

Рекомендована література…….……..... 134

Використана література..... 135

ПЕРЕДМОВА

Біохімія, біологічна хімія (грец. bios − життя + chemia − хімія) – це наука, яка вивчає хімічний склад живої матерії, хімічні процеси, що відбуваються в живих організмах і лежать в основі їх життєдіяльності. Сучасна біохімія вивчає будову біологічно важливих речовин з точки зору виконуваних ними функцій, їх хімічні перетворення, процеси, що відбуваються в живих організмах на молекулярному рівні. Біохімію ще називають наукою про молекулярну логіку живого. Досягнення біохімії є фундаментом для розвитку медицини, фармакології, мікробіології, вірусології, сільського господарства та становлення таких галузей науки, як генетична та клітинна інженерія, біотехнологія.

У результаті вивчення дисципліни «Біохімія з основами молекулярної біології» студент повинен засвоїти основні поняття біохімії, основи молекулярної біології; отримати міцні та ґрунтовні знання про склад, хімічну будову, властивості та функції амінокислот, білків, вуглеводів, ліпідів, нуклеїнових кислот, ферментів, вітамінів, гормонів; усвідомити сутність біохімічних процесів і механізми перебігу біохімічних реакцій; оволодіти методикою проведення біохімічних лабораторних досліджень; поглибити навички роботи з хімічними реактивами, посудом та обладнанням; розвинути логічне мислення, вміння аналізувати, робити аргументовані висновки та узагальнювати результати проведених досліджень.

Молекулярна біологія – галузь біології, яка вивчає біологічні процеси на рівні біополімерів: нуклеїнових кислот і білків та їхніх надмолекулярних структур.

Фундаментальними завданнями молекулярної біології є: встановлення молекулярних механізмів основних біологічних процесів, як-от відтворення та реалізація генетичної інформації, біосинтез білків та інших процесів, зумовлених структурно-функціональними властивостями і взаємодією нуклеїнових кислот і білків, а також вивчення регуляторних механізмів указаних процесів.

Метою вивчення навчальної дисципліни «Біохімія з основами молекулярної біології» є засвоєння теоретичних основ статичної та динамічної біохімії та основ молекулярної біології і набуття навичок практичного застосування знань.

Основними завданнями вивчення навчальної дисципліни «Біохімія з основами молекулярної біології» є: набуття студентами уявлення про хімічну будову макромолекул (біополімерів) у клітинах живих організмів, засвоєння їх фізико-хімічних властивостей та біологічної ролі, усвідомлення сутності процесів вуглеводного, білкового й ліпідного обміну в організмі людини; засвоєння особливостей перебігу транскрипції та трансляції.

У результаті вивчення курсу «Біохімія з основами молекулярної біології» студенти повинні оволодіти такими компетентностями:

− здатність вчитися і оволодівати сучасними знаннями (ЗК 3);

− здатність працювати як самостійно, так і в команді (ЗК 4);

− здатність застосовувати знання у практичних ситуаціях (ЗК 7);

− здатність до формування в учнів ключових і предметних компетентностей та здійснення міжпредметних зв'язків (СК 1);

− здатність використовувати біологічні поняття, закони, концепції, вчення й теорії біології для пояснення та розвитку в учнів розуміння цілісності та взаємозалежності живих систем і організмів (СК 8);

− здатність розуміти й застосовувати базові знання з медико-біологічних дисциплін для обрання ефективних шляхів і способів збереження, зміцнення та відновлення здоров'я людини (СК 15).

У результаті засвоєння програмного матеріалу курсу студент зможе:

− вільно оперувати понятійно-категоріальним апаратом дисципліни;

− розуміти концепції, принципи, теорії та закони в галузі біологічних наук і на межі предметних галузей;

− демонструвати знання будови живих організмів, їх фундаментальних біологічних процесів;

− застосовувати сучасні методи експериментальних досліджень для вирішення проблемних завдань біології.

У ході вивчення дисципліни студент повинен засвоїти основні поняття біохімії та основи молекулярної біології; отримати міцні та ґрунтовні знання про склад, хімічну будову, властивості та функції амінокислот, білків, вуглеводів, ліпідів, нуклеїнових кислот, ферментів, вітамінів, гормонів; усвідомити сутність біохімічних процесів і механізми перебігу біохімічних реакцій; оволодіти методикою проведення біохімічних лабораторних досліджень; поглибити навички роботи з хімічними реактивами, посудом та обладнанням; розвинути логічне мислення, вміння аналізувати, робити аргументовані висновки й узагальнювати результати проведених досліджень.

Базовими для успішного засвоєння курсу «Біохімія з основами молекулярної біології» є знання, отримані студентами в результаті вивчення таких дисциплін, як «Загальна хімія», «Органічна хімія», «Анатомія людини».

Своєю чергою біохімія з основами молекулярної біології є основою для вивчення дисципліни «Фізіологія людини», «Фізіологія рослин», «Гістологія з основами ембріології та імунології».

Запропоноване авторами навчально-методичне видання сприятиме засвоєнню біохімії та основ молекулярної біології, якісній підготовці до лабораторних робіт та успішному проведенню дослідів. Поданий теоретичний матеріал систематизований і чітко структурований; наведено зміст лабораторних робіт з інструкціями до проведення дослідів та оформлення звітів; запропоновано завдання для домашнього виконання.

Обов'язковою умовою допуску студента до виконання лабораторних завдань є ознайомлення з вимогами техніки безпеки, правилами роботи в біохімічній лабораторії (проходження інструктажу засвідчується підписом у журналі). Лабораторне заняття складається з теоретичної частини, яка спрямована на актуалізацію знань і перевірку готовності до виконання завдань лабораторної роботи, та експериментальної частини – передбачає виконання дослідів лабораторної роботи й оформлення звіту у вигляді таблиці.

Лабораторні заняття спрямовані на закріплення та поглиблення теоретичних знань, набуття вмінь, навичок і практичного досвіду, необхідних студентам для успішного здійснення професійної діяльності в майбутньому.

Кожна лабораторна робота має бути запротокольована в робочому зошиті. Записи необхідно вести за такою схемою: дата виконання лабораторної роботи, назва теми, короткий опис дослідів, основні механізми реакції, результати спостережень у вигляді таблиці та висновки.

Лабораторна робота оформлюється студентом в аудиторний час і надається викладачеві для перевірки наприкінці заняття.

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС РОБОТИ В ХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Студенти допускаються до роботи в хімічній лабораторії тільки в захисному одязі − халаті.

Сумки та особисті речі потрібно залишити у відведеному для цього місці.

Під час виконання лабораторних робіт студентам необхідно бути максимально уважними та чітко дотримуватися методики виконання дослідів.

Із реактивами треба працювати тільки на робочих столах, із концентрованими кислотами, лугами й леткими речовинами – у витяжній шафі, звідки їх категорично забороняється переносити.

Перш ніж використовувати реактиви, потрібно уважно ознайомитися з інформацією на етикетці.

Для досліду необхідно брати речовини в кількостях, указаних в інструкції до лабораторної роботи.

Сухі реактиви потрібно брати чистим шпателем або спеціальною ложечкою; розчини наливати в пробірки в невеликих кількостях (по краплях).

При нагріванні колби чи хімічного посуду на електричній плитці необхідно покласти товстий шар азбестової сітки.

Досліди з легкозаймистими речовинами потрібно проводити дуже обережно й подалі від вогню.

Під час нагрівання розчинів у пробірках необхідно використовувати тримачі із затискачами. Пробірку з рідиною при нагріванні необхідно тримати в нахиленому положенні так, щоб її отвір був спрямований в протилежний бік від себе та своїх сусідів.

Завжди потрібно наливати кислоту у воду, а не навпаки.

Працювати з їдкими лугами й концентрованими кислотами треба дуже обережно, уникаючи хімічних опіків і псування одягу.

Залишки концентрованих кислот, основ, солей важких металів, цінних реактивів (наприклад, аргентум нітрату) необхідно зливати тільки в спеціально відведені для цього склянки.

Під час роботи забороняється відволікати увагу тих, хто працює.

Після закінчення роботи всі електронагрівальні прилади необхідно вимкнути та прибрати своє робоче місце.

У разі виникнення пожежі потрібно використовувати для її гасіння вогнегасники, щільну ковдру, пісок.

Із метою уникнення травм, опіків, нещасних випадків **суворо забороняється:**

1) пити воду з хімічного посуду; пробувати хімічні речовини на смак; проливати й розсипати реактиви;

2) користуватися приладами та обладнанням без їх попередньої перевірки на справність та ознайомлення з інструкцією з експлуатації;

3) залишати без нагляду ввімкнені електронагрівальні прилади, палаючі спиртівки;

4) відміряти концентровані кислоти й луги, втягуючи їх ротом у піпетку;

5) зберігати леткі й легкозаймисті речовини поблизу джерел тепла, відкритого вогню, ввімкнених приладів;

6) торкатися руками неізольованих проводів;

7) вдихати пари отруйних речовин;

8) допускати потрапляння отруйних речовин на шкіру та одяг.

Під час роботи в лабораторії **студенти зобов'язані**:

− дотримуватися правил техніки безпеки та пожежної безпеки;

− чітко виконувати інструкції викладача (лаборанта).

− підтримувати в чистоті та порядку свої робочі місця.

Перша допомога

Перев'язувальні матеріали (вата, бинти, серветки), необхідні розчини та медикаменти знаходяться в аптечці першої медичної допомоги, якою забезпечена кожна лабораторія.

У разі поранень, отруєнь, опіків та інших нещасних випадків потерпілому на місці потрібно надати першу долікарську допомогу і за необхідності направити його до медичної установи. У разі потреби викликати лікаря на місце пригоди.

При виникненні пожежі в лабораторії необхідно негайно вимкнути всі газові та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини. Якщо осередок пожежі невеликий, загоряння можна спробувати ліквідувати первинними засобами пожежогасіння: засипати піском або накрити щільною тканиною чи ковдрою, шматком азбесту або ж залити тетрахлорметаном. Для припинення інтенсивного горіння треба скористатися вогнегасником. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою.

Якщо загорівся одяг, потерпілого необхідно негайно повалити на підлогу та намагатися збити полум'я, накинувши на нього мокру тканину.

Дерев'яні предмети, охоплені полум'ям, потрібно гасити водою або вогнегасником.

Під час роботи в хімічній лабораторії найбільш можливими є порізи склом, термічні та хімічні опіки, а також інгаляційне ураження парами токсичних речовин.

При теплових опіках роблять примочку з розчином 2%-го калій манганату або етанолу, а потім наносять мазь від опіків.

При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити відповідним розчинником речовину, яка стала їх причиною, а потім обробити уражену ділянку етанолом і змазати маззю від опіків.

При опіках кислотами уражену ділянку насамперед треба промити сильним струменем проточної води, а потім обробити 3%-им розчином натрій гідрогенкарбонату; при опіках їдкими лугами – промити водою, обробити 3%-им розчином оцтової або борної кислоти, а потім знову обполоснути водою.

При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 3%-му розчині натрій гідрогенкарбонату, і знову промити водою; при опіках очей лугом – промити їх

великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 3%-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього потрібно негайно звернутися до лікаря.

При порізах насамперед необхідно пінцетом, попередньо обробленим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, промити рану дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етанолі, після чого змастити 5%-им спиртовим розчином йоду й забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

ОСОБЛИВОСТІ РОБОТИ З АВТОМАТИЧНИМИ ПІПЕТКАМИ

Відмірювання рідини є найважливішим технологічним елементом під час роботи в клініко-діагностичній лабораторії. Дозування проби та реагентів є обов'язковим етапом. Точність вимірювання безпосередньо впливає на точність результату лабораторного дослідження.

На сьогодні в усіх лабораторіях для відмірювання відомої кількості речовини використовують механічні, електронні автоматичні піпетки (рис. 1) − пристрої з пневматичним механізмом, дія яких ґрунтується на витісненні рідини повітрям.

Рисунок 1 − Механічна одноканальна піпетка зі змінним об'ємом (BIOHIT Proline): 1 − операційна кнопка; 2 − упор; 3 − рукоятка; 4 − цифровий дисплей; 5 − видаляч наконечників; 6 − змінний наконечник

Автоматичні піпетки бувають різних видів: починаючи з піпеток із фіксованим об'ємом (самплери) і закінчуючи піпетками з електронним контролем дозування. Ці піпетки мають різні межі дозування – від 1 мкл (0,001 мл) до 50 мл.

На кінчик кожної піпетки вдягається одноразовий наконечник, через який набирається відповідна речовина (за винятком концентрованих кислот).

Автоматичні піпетки мають суттєві переваги, порівняно зі скляними, завдяки вищій швидкості відбору, вдосконаленому механізму регулювання об'єму рідини, точності та відтворюваності, зручності у використанні.

Автоматичні піпетки мають деякі недоліки. Наприклад, більшість цих пристроїв не призначені для відбирання агресивних речовин (концентрованих кислот, лугів, розчинників тощо). Під час роботи з такими речовинами відбувається псування механізму для дозування, що робить піпетку непридатною для подальшого використання.

Розрізняють такі автоматичні піпетки:

1) механічні та електронні;

2) одноканальні та багатоканальні;

3) фіксованого та змінного об’єму.

Механічні та електронні піпетки можуть бути одноканальними, багатоканальними, фіксованого та змінного об’єму.

Механічні автопіпетки мають пружинний механізм і пристрій, який дозує об’єм рідини − мікрометричний гвинт (налаштовується вручну).

Електронні автопіпетки мають пневматичний механізм, який приводиться в дію електромотором та управляється мікрокомп’ютером з електроживленням від акумуляторів. Якщо автопіпеткою не користуються, її встановлюють у тримач, який одночасно є живильним пристроєм для її акумуляторів. Тримач підключають до електромережі.

Одноканальні автопіпетки − це універсальні прилади, які використовуються в біохімічних лабораторіях.

Обсяги виробництва багатоканальних автопіпеток значно перевищують одноканальні, але сфера їх використання обмежується вузькоспеціалізованою апаратурою. Наприклад, дев’ятиканальна піпетка для автоаналізаторів «Фінпіпет» фірми «Лабсистемс» (Фінляндія); багатоканальні автопіпетки для імунологічних досліджень, які розраховані на роботу з планшетами визначених параметрів.

Автопіпетки фіксованого об’єму використовуються для вимірювання тільки одного суворо визначеного об’єму рідини.

Автопіпетки змінного об’єму використовуються для вимірювання об’ємів рідини у великому діапазоні. Наприклад, піпетки фірми «Лабсистемс» (Фінляндія) розраховані на вимірювання об’ємів рідини від 5 мкл до 5000 мкл (0,005 мл до 5 мл відповідно). Комплект містить автопіпетки для вимірювання об’ємів рідини від 5 мкл до 40 мкл, від 40 мкл до 200 мкл, від 200 мкл до 1000 мкл, від 1000 мкл до 5000 мкл. Такі автопіпетки є найбільш практичними.

Правила роботи з автопіпеткою.

1. На піпетці встановлюють необхідний об’єм рідини для вимірювання. Це досягається обертанням головки плунжера за годинниковою стрілкою (зменшення об’єму) або проти годинникової стрілки (збільшення об’єму). Кожний крок обертання головки плунжера супроводжується клацанням. Обраний об’єм фіксується у віконці цифрового індикатора. Цифри мають бути на індикаторі автопіпетки.

2. Рукоятку піпетки вкладають в долоню («рукоятка кинджала»), вушко рукоятки навішують на вказівний палець. Цим забезпечується мінімальне напруження кисті руки при роботі з піпеткою. На нижню частину стволової частини піпетки щільно насаджують відповідний наконечник. Під час роботи автопіпетка повинна знаходитися у **вертикальному положенні**. Відбір і дозування рідини проводять, використовуючи плунжер. За ходом руху плунжера передбачено два натискання.

3. Піпетування можна проводити двома способами − прямим і зворотним. При **прямому** способі пікетування надавлюють на головку плунжера великим пальцем до першого натискання. Опускають наконечник піпетки в розчин, повільно вивільняючи плунжер. У наконечник набирається необхідний об’єм рідини. Для того щоб злити рідину, повторно надавлюють на головку

плунжера, але тепер уже до другого натискання, тобто до упору. При цьому із наконечника видаляють усі залишки рідини. Потім палець піднімають, і плунжер повертається у вихідне положення.

При **зворотному** способі пікетування натискають на головку плунжера великим пальцем до упору. Опускають наконечник піпетки в розчин та повільно вивільнюють плунжер. Набирається об'єм рідини, але дещо більший від необхідного. Для дозування визначеного об'єму надавлюють на головку плунжера тільки до першого натискання. Частина рідини, яка залишилася в наконечнику, не входить у вимірюваний об'єм. Її необхідно видалити. Для цього повторно натискають на плунжер до упору. Потім піднімають палець, і плунжер повертається у вихідне положення. Зворотний спосіб зручний при дозуванні в'язких рідин і рідин, які легко утворюють піну.

Для того щоб зняти наконечник, натискають на видаляч до упору, після чого він самостійно від'єднується від кінця піпетки. Використаний наконечник потрібно опустити в 6%-й розчин гідроген пероксиду для очищення та знезараження. Після миття та просушування наконечник можна використовувати повторно.

Порядок роботи з механічними багатоканальними автопіпетками аналогічний описаному вище для одноканальних. Багатоканальні піпетки комплектуються відповідними для їх конфігурації змінними блоками наконечників. Точність вимірювань, які проводять за допомогою автопіпеток, коливається в межах від ±0,5% до ±3% залежно від їх типу.

ОСОБЛИВОСТІ РОБОТИ З ФОТОЕЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРОМ (КФК-2)

Колориметр фотоелектричний концентраційний (КФК-2) (рис. 2-3) призначений для вимірювання в окремих діапазонах довжин хвиль (315-980 нм), які виділяються світлофільтрами, визначення коефіцієнта пропускання та оптичної щільності рідких розчинів, твердих тіл, а також концентрації речовин у розчинах методом побудови градуйованих графіків.

Правила експлуатації КФК-2

1. Якщо колориметр було внесено до приміщення з морозу, тоді його розпакування та розконсервація повинні проводитися не раніше ніж через 12 год.

Після довгого зберігання колориметр необхідно включити та провести тренування протягом 2-5 год.

2. Вимірювання на колориметрі потрібно проводити при температурі повітря від плюс 10 ^{0}С до плюс 35 ^{0}С.

3. При вимірюванні зі світлофільтрами 315, 364, 400, 440, 490, 540 нм, які відмічені на передній панелі колориметра чорним кольором, ручку ЧУТЛИВІСТЬ встановлюють в одне із трьох положень («1», «2», «3»), так само позначених чорним кольором.

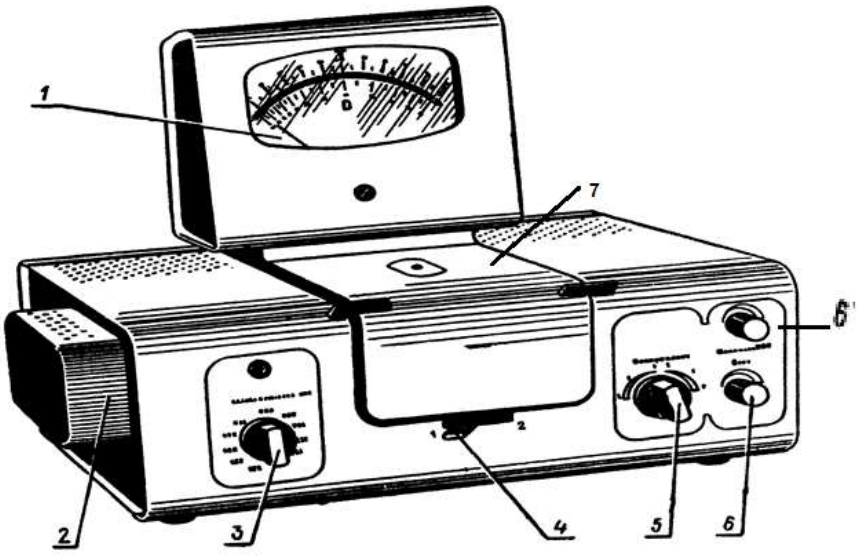


Рисунок 2 − Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2: 1 – мікроамперметр (за верхньою шкалою вимірюють коефіцієнт світлопропускання (від 0 до 100%), а за нижньою − оптичну щільність розчину або екстинкції (від 0 до 1,5); 2 − джерело світла; 3 – рукоятка установки світлофільтра у світловий пучок із маркуванням певної довжині хвилі; 4 − ручка для переміщення кювет у кюветному відділенні; 5 − ручка чутливості фотоприймачів (позначена цифрами 1, 2 і 3 чорного кольору при роботі в діапазоні хвиль від 315 до 540 нм і червоного кольору − в діапазоні від 590 нм до 980 нм); 6 – рукоятка встановлення чутливості («грубо») мікроамперметра; 6‘ – рукоятка встановлення чутливості («точно») мікроамперметра; 7 – кришка кюветного відділення

Рисунок 3 − Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2 (зовнішній вигляд)

При вимірюванні зі світлофільтрами 590, 670, 750, 870, 980 нм, які відмічені на передній панелі колориметра червоним кольором, ручку ЧУТЛИВІСТЬ встановлюють в одне із трьох положень («1», «2», «3»), так само позначених червоним кольором.

4. Робочі поверхні кювет (рис. 4) перед кожним вимірюванням необхідно протирати спиртово-ефірною сумішшю. При установці кювет у кюветотримач торкатися пальцями робочих установок поверхонь (нижче від рівня рідини в кюветі) **забороняється**.

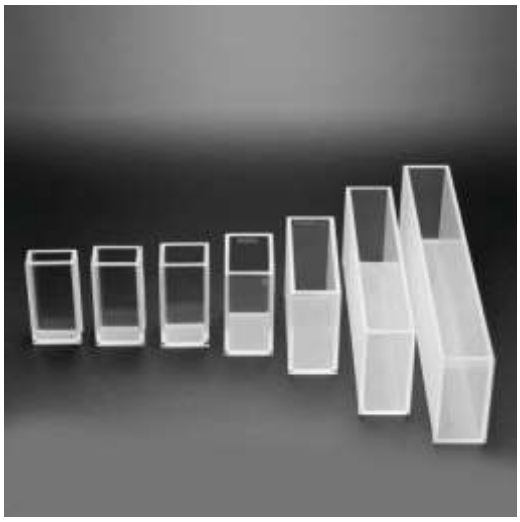


Рисунок 4 − Різновиди кювет

Наявність забруднень або крапель розчину на робочих поверхнях кювети призводить до недостовірних результатів вимірювань.

Рідину в кювету необхідно наливати по бічній стінці. Рідина в обмеженому об’ємі кювети в деяких випадках утворює меніск. За капілярами, особливо по кутах кювети, рідина піднімається на значну висоту (на 4-6 мм).

Не треба нахиляти кювету з рідиною при встановленні в кюветотримач.

5. Після зміни світлофільтра вимірювання починають проводити після 5-хвилинного засвічення фотоприймача.

6. При переключенні світлофільтрів ЧУТЛИВІСТЬ повинна знаходитися в положенні «1», а ручка 6 – РУКОЯТКА ВСТАНОВЛЕННЯ 100 ГРУБО − у крайньому лівому положенні (мінімальна чутливість). Це дозволяє запобігти перевантаженню приладу, який реєструє дані, та його псуванню.

Вказівки щодо заходів безпеки

1. Робота на колориметрі має відбуватися в чистому приміщенні, в якому немає пилу, парів кислот і лугів.

2. Поблизу колориметра не повинні знаходитися громіздкі вироби, що перешкоджають роботі оператора.

3. Роботи, пов'язанні з проникненням усередину колориметра (заміна ламп, несправних деталей тощо), мають відбуватися після від'єднання колориметра від електромережі.

4. При експлуатації колориметр має бути надійно заземлений.

Визначення концентрації речовини в розчині. При визначенні концентрації речовини в розчині необхідно дотримуватися такої послідовності: вибір світлофільтра; вибір кювети; побудова градуйованої кривої для речовини; вимірювання оптичної густини досліджуваного розчину та визначення концентрації речовини в розчині.

1. Вибір світлофільтра. Наявність у колориметрі наборів світлофільтрів і кювет дозволяє підібрати оптимальне їх поєднання, при якому похибка у визначенні концентрації буде мінімальною.

Вибір світлофільтра проводять таким чином: наливають розчин у кювету і визначають оптичну густину для всіх світлофільтрів.

За отриманими даними будують криву, відкладаючи по осі абсцис (x) довжини хвиль, які відповідають максимуму коефіцієнта пропускання світлофільтрів, а по осі ординат (y) – відповідні значення оптичної густини розчину. Відмічають ту ділянку кривої, де:

− оптична густина має максимальну величину;

− хід кривої приблизно паралельний осі абсцис, тобто оптична густина мало залежить від довжини хвиль.

Світлофільтр для роботи обирають так, щоб довжина хвилі відповідала максимуму коефіцієнта пропускання і знаходилася на відміченій вище ділянці спектральної кривої досліджуваного розчину.

2. Вибір кювети. Абсолютна похибка вимірювання коефіцієнта пропускання не перевищує 1%. Відносна похибка визначення концентрації розчину буде різною при роботі на різних шкалах колориметра, досягаючи мінімуму при значенні оптичної густини 0,4. Тому при використанні колориметра рекомендується шляхом відповідного вибору кювет працювати, наближаючись до вказаного значення оптичної густини.

Попередній вибір кювет проводять візуально відповідно до інтенсивності забарвлення розчину. Якщо розчин інтенсивно забарвлений (темний), потрібно користуватися кюветами з малою робочою довжиною. У випадку

слабозабарвленого розчину рекомендується працювати з кюветами з більшою робочою довжиною.

У попередньо обрану кювету наливають розчин і вимірюють його оптичну густину, вводячи у хід променів відповідний для даного розчину світлофільтр.

При вимірюванні певної кількості розчинів кювету заповнюють розчином середньої концентрації. Якщо отримане значення оптичної густини становить приблизно 0,3-0,5 − обирають відповідну кювету, призначену для роботи саме з цим розчином. Якщо вказана вище умова не виконується, потрібно перевірити іншу кювету. Якщо величина оптичної густини, яку визначили, перевищує 0,5-0,6, обирають кювету з меншою робочою довжиною. Якщо величина оптичної густини менше 0,2-0,3, обирають кювету з більшою робочою довжиною.

3. Побудова калібрувальної кривої для даної речовини. Побудова калібрувальної кривої виконується в такій послідовності:

1) Готують розчини речовини, яку визначають, із відомими концентраціями таким чином, щоб охопити діапазон можливих змін концентрацій у досліджуваному розчині.

2) Вимірюють оптичні густини всіх розчинів.

3) Будують калібрувальну криву, відкладаючи по осі абсцис (x) відомі концентрації, а по осі ординат (y) − відповідні значення екстинкції (або оптичної густини).

4. Визначення концентрації речовини в розчині. За калібрувальною кривою (рис. 5) визначають невідому концентрацію речовини в досліджуваному розчині.. Для цього розчин наливають у ту саму кювету, для якої побудована калібрувальна крива, вводять той самий світлофільтр і визначають оптичну густину розчину. Потім за калібрувальною кривою знаходять концентрацію, що відповідає значенню оптичної густини; можна використовувати градуйовані таблиці, що складаються за даними калібрувальної кривої.

Калібрувальну криву час від часу необхідно перевіряти.

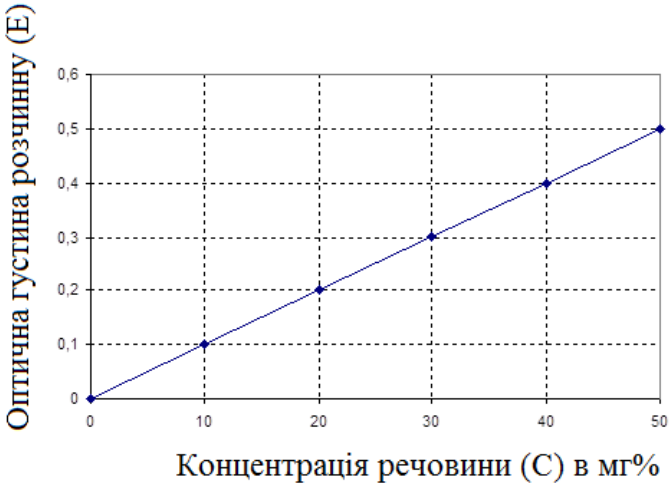


Рисунок 5 – Приклад побудови графіка залежності оптичної густини розчину (Е − екстинкція) від концентрації речовини (С) у мг%

ТЕМА 1. АМІНОКИСЛОТИ

Амінокислоти − речовини, які є мономерами білків; похідні карбонових кислот; молекула яких містить карбоксильну групу (-COOH) та аміногрупу ($-NH_2$) біля α-атома Карбону (рис. 6).

У природі існує близько 150 амінокислот, серед них 20 (22) α-амінокислот входять до складу білків (гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін, цистеїн, цистин, метіонін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, аспарагін, глутамін, лізин, аргінін, фенілаланін, тирозин, триптофан, гістидин, пролін, оксипролін).

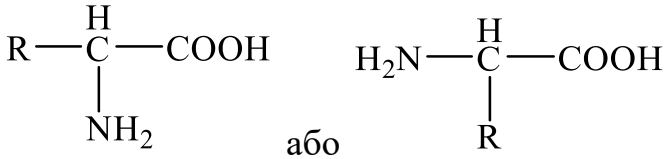


Рисунок 6 − Загальна формула структури α-амінокислот, де R − радикал (-H, $-CH_3$, $-C_6H_5$: структури гліцину, аланіну, фенілаланіну відповідно)

З амінокислот утворюються необхідні для життєдіяльності речовини: білки, пептиди, ферменти, гормони тощо.

Класифікація амінокислот:

1. За кількістю аміногруп і карбоксильних груп у структурі амінокислот:

1.1 моноаміномонокарбонові амінокислоти (гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин);

1.2 моноамінодикарбонові амінокислоти (аспарагінова кислота, глутамінова кислота);

1.3 діаміномонокарбонові амінокислоти (лізин, аргінін);

1.4 діамінодикарбонові амінокислоти.

2. За особливостями будови радикала (R) у структурі амінокислот (хімічна класифікація):

2.1 ациклічні (гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін, цистеїн, цистин, метіонін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, аспарагін, глутамін, лізин, аргінін);

2.2 циклічні:

2.2.1 ароматичні (карбоциклічні) (фенілаланін, тирозин);

2.2.2 гетероциклічні:

2.2.2.1 амінокислоти з первинною $-NH_2$ групою в бічному ланцюзі (триптофан, гістидин);

2.2.2.2 імінокислоти (пролін, оксипролін).

3. За особливостями властивостей радикала (R) у структурі амінокислот:

3.1 **на основі полярності радикала (R):**

3.1.1 полярні (гідрофільні) амінокислоти: неіногенні (тирозин, цистеїн, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, лізин, аргінін, гістидин); неіногенні (серин, треонін, аспарагін, глутамін);

3.1.2 неполярні (гідрофобні) амінокислоти (гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, триптофан, пролін);

3.2 **на основі кислотності радикала (R):**

3.2.1 кислі (негативно заряджені амінокислоти) (аспарагінова кислота, глутамінова кислота);

3.2.2 основні (позитивно заряджені амінокислоти) (аргінін, лізин, гістидин).

4 За можливістю синтезу та відсутністю синтезу в організмі людини (біологічна класифікація):

4.1 **замінні** − амінокислоти, які можуть синтезуватися в організмі тварин та людини з інших амінокислот або небілкових компонентів (гліцин, аланін, серин, цистеїн, аспарагін, глутамін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, тирозин, пролін);

4.2 **незамінні («есенціальні»)** − амінокислоти, які не синтезуються в організмі людини та повинні обов'язково надходити з їжею (валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, треонін, лізин, фенілаланін, триптофан);

4.3 **частково незамінні** (аргінін, гістидин).

Амінокислоти − це безбарвні нелеткі кристалічні речовини з високими температурами плавлення (220-315 ^{0}C), розчинні у воді, оптично активні (крім гліцину, який не має асиметричного атома Карбону), належать до L-ряду. L-Амінокислоти мають солодкий смак, D-амінокислоти не мають смаку або гіркі. Амінокислоти D-ряду − складові елементи деяких антибіотиків і білків оболонок мікроорганізмів (рис. 7).

L-аланін D-аланін

Рисунок 7 − Структура L-аланіну, D-аланіну

Амінокислоти здатні утворювати цвітер-іон (біполярний іон) (рис. 8).

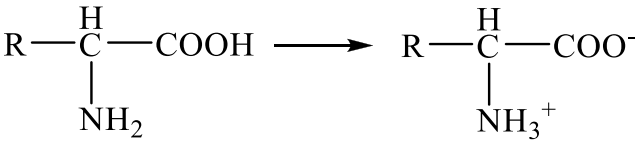


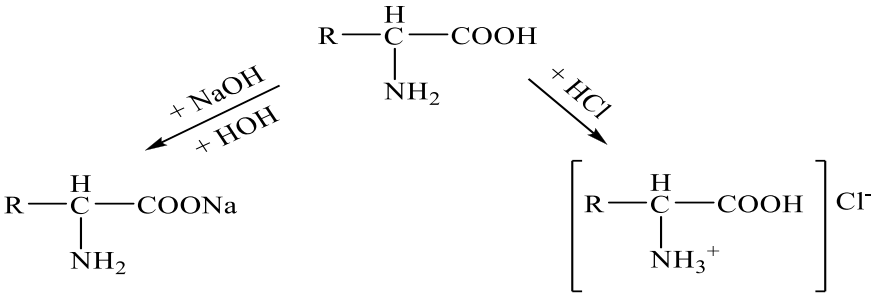
Рисунок 8 − Схема утворення біполярного іона (цвітер-іона) амінокислоти

Залежно від pH середовища вони можуть мати кислі або основні властивості; мають сумарний нульовий, позитивний або негативний заряд.

Амінокислоти − амфотерні сполуки, які містять дві протилежні за властивостями функціональні групи; амінокислоти можуть утворювати солі, реагуючи як з основами, так і з кислотами (рис. 9).

Амфотерні властивості амінокислот використовуються при їх розподілі й ідентифікації за методом іонообмінної хроматографії та електрофорезу.

Значення pH, при якому сумарний заряд амінокислоти дорівнює нулю та амінокислоти не здатні рухатися в електричному полі ні до анода, ні до катода, називається **ізоелектричною точкою (ІЕТ)** і позначається pI.



натрієва сіль амінокислоти хлорид амінокислоти

Рисунок 9 − Схема утворення натрієвої солі амінокислоти, хлориду амінокислоти

Ізоелектричну точку амінокислоти (pI) можна знайти із співвідношення: якщо ми знаємо значення pK_2 зарядженої амінокислоти (звичайно в межах від 1 до 3) та значення pK_1 біполярного іона (значення знаходиться в межах 9-10):

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

Наприклад, у глутамінової кислоти pI = 3,2; у валіну pI = 5,95; в аланіну pI = 6,02; у лізину pI = 9,8.

В інтервалі pH від 4 до 9 майже всі амінокислоти існують переважно у формі цвітер-іонів із протонованою аміногрупою та дисоційованою карбоксильною групою.

Ізоелектрична точка білка залежить від кількості та природи заряджених груп у молекулі. Білкова молекула заряджена позитивно, якщо pH середовища нижче від pI, та негативно, якщо pH середовища вище від pI.

? Питання для самоконтролю

1. Поясніть особливості будови та наведіть класифікації амінокислот.
2. Розкрийте фізико-хімічні властивості амінокислот.
3. Наведіть якісні реакції на амінокислоти.

✍ Завдання для домашнього виконання

Напишіть реакції, які доводять амфотерність амінокислоти на прикладі моноаміномонокарбонової амінокислоти. Напишіть реакцію утворення цвітер-іона цієї амінокислоти.

Лабораторна робота № 1
ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА АМІНОКИСЛОТИ ТА БІЛКИ

Мета роботи: провести якісні реакції на амінокислоти та білки; засвоїти механізм цих реакцій.

Практичне значення роботи: якісні реакції на амінокислоти та білки широко використовуються для встановлення білкової природи речовини, вивчення амінокислотного складу різноманітних природних білків, пептидів, для ідентифікації індивідуальних амінокислот, виявлення амінокислот у гідролізатах білків, біологічних рідинах, тканинах організму, в лікарських засобах.

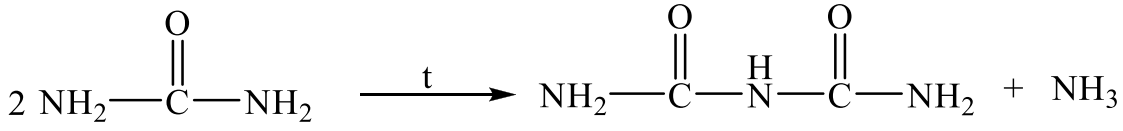
Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, пробіркотримач, піпетки автоматичні, сухе пальне, сірники; дистильована вода, 1%-й розчин яєчного білка або концентрований розчин яєчного білка, 10%-й розчин натрій гідроксиду, 1%-й розчин купрум (II) сульфату, розчин нінгідрину, концентрована нітратна кислота, волосся або шматочок нігтя, розчин плюмбум ацетату, розчин натрій нітриту, концентрована оцтова кислота.

Хід роботи

Дослід 1. Біуретова реакція (реакція Піотровського).

Принцип реакції. Біуретова реакція доводить наявність у молекулах білків пептидних зв'язків (-CO-NH-). Сполуки, які мають у своєму складі не менше двох пептидних зв'язків (білки, пептиди), у лужному середовищі утворюють із купрум сульфатом комплекс *фіолетового кольору*.

Біуретову реакцію вперше було досліджено О. Я. Данілевським. Реакція отримала назву від одного з похідних сечовини – біурету, який утворюється при взаємодії 2-х молекул сечовини внаслідок відщеплення амоніаку, при температурі 180 ^{0}C.

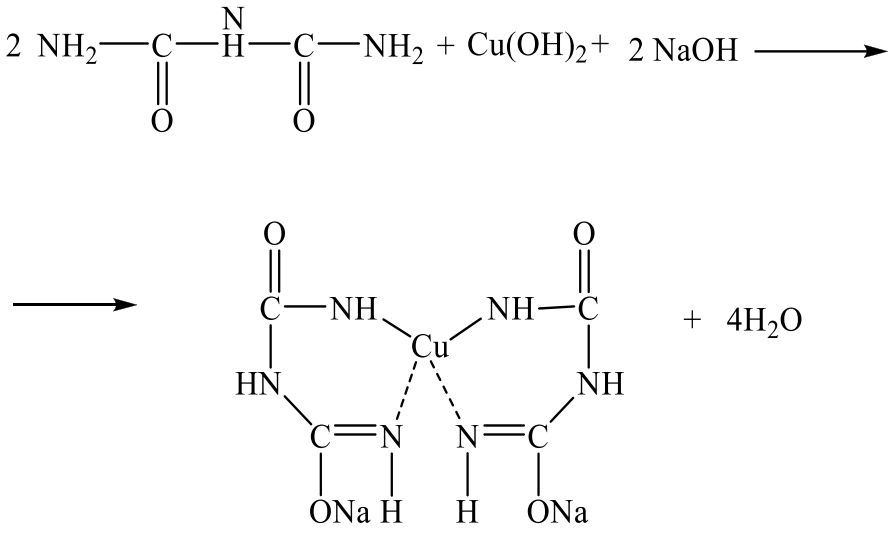


сечовина біурет

Купрум (II) гідроксид для проведення біуретової реакції отримують, як правило, в результаті взаємодії купрум (II) сульфату з натрій гідроксидом:

$$CuSO_4 + 2\ NaOH \rightarrow Cu(OH)_2 + Na_2SO_4$$

Утворення комплексу біурету з купрум (II) гідроксидом відбувається за схемою:



хелатний комплекс біурету з Cu^{2+}

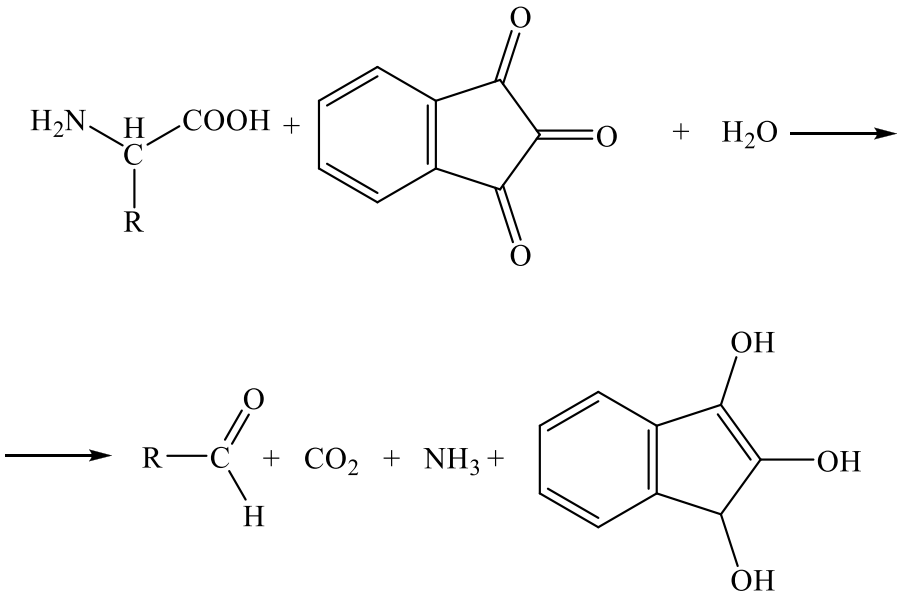
Хід роботи. До 5 крапель 1%-го розчину яєчного білка (або концентрованого яєчного білка) додають 5 крапель 10%-го розчину натрій гідроксиду, 2 краплі 1%-го розчину купрум (II) сульфату та все перемішують. Вміст пробірки набуває *фіолетового забарвлення*.

Примітка. Не можна додавати надлишок купрум (II) сульфату, оскільки маскується характерне *фіолетове забарвлення* біуретового комплексу білка.

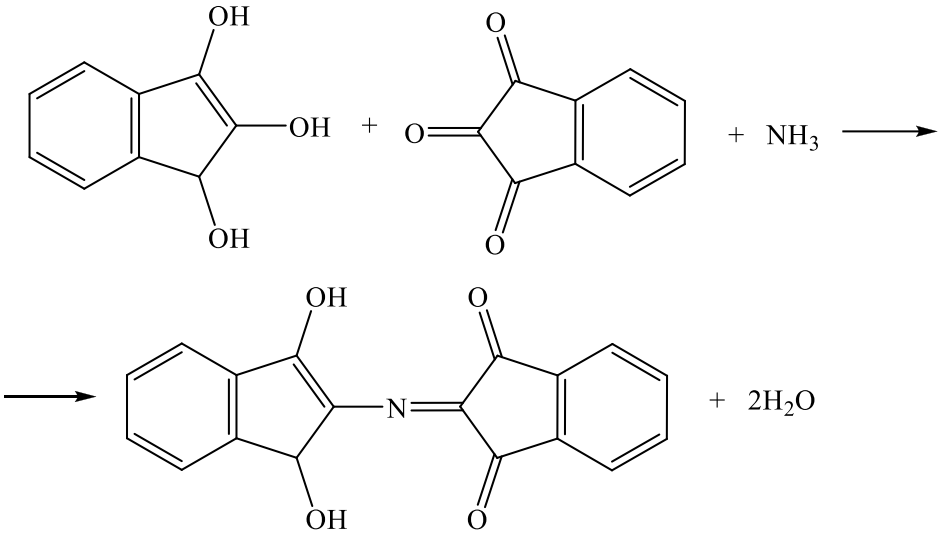
Дослід 2. Нінгідринова реакція.

Принцип реакції. Білки, поліпептиди, вільні амінокислоти при нагріванні з нінгідрином дають *рожево-фіолетове забарвлення*. Реакція характерна для α-NH_2-групи, використовується для виявлення α-амінокислот.

Реакція ґрунтується на окисно-відновних властивостях нінгідрину. Внаслідок нагрівання до 70 ^{0}C, окиснювального дезамінування та декарбоксилювання від амінокислоти відщеплюється аміногрупа з утворенням амоніаку, виділяється карбон (IV) оксид та утворюється альдегід. Нінгідрин за цих умов відновлюється.



Відновлений нінгідрин конденсується з амоніаком та окисненою формою нінгідрину й утворює комплексну сполуку *рожево-фіолетового кольору:*



комплексна сполука

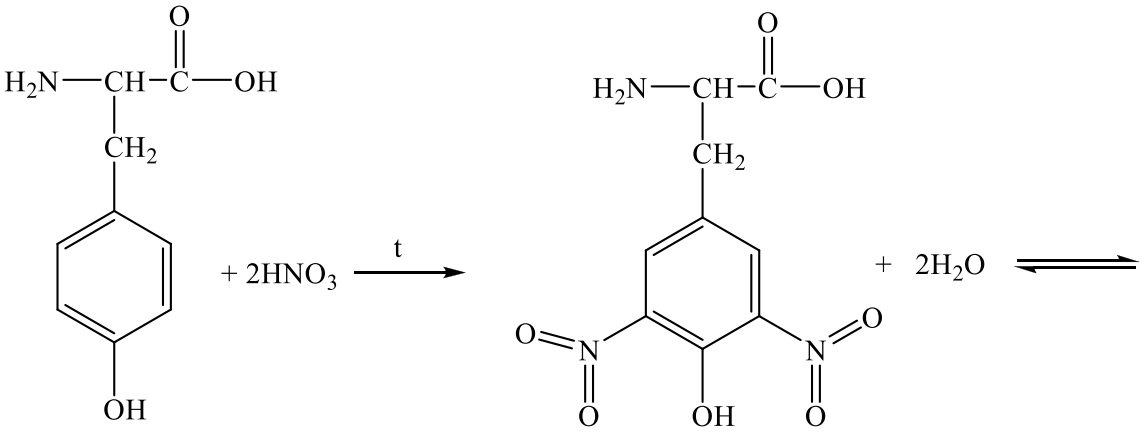
Ця реакція не є специфічною лише для амінокислот, оскільки її дають деякі аміни й аміди.

Обережно!!! Нінгідрин токсичний, тому потрібно уникати його потрапляння на шкіру та слизові оболонки.

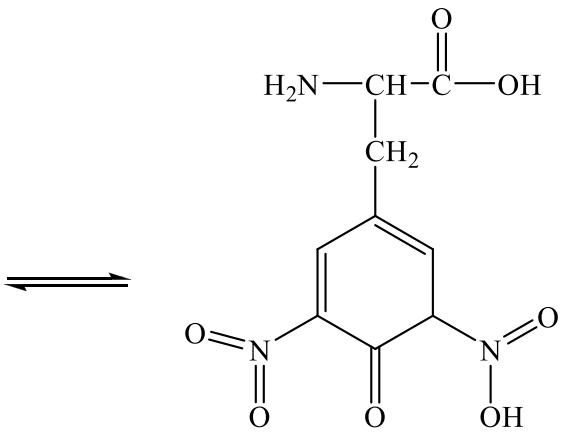
Хід роботи. До 3-4 крапель 1%-го розчину яєчного білка або концентрованого яєчного білка додають 1-2 краплі розчину нінгідрину та нагрівають пробірку. У ній спостерігається поява *рожево-фіолетового забарвлення.*

Дослід 3. Ксантопротеїнова реакція (реакція Мульдера).

Принцип реакції. Реакція характерна для бензенового ядра ароматичних амінокислот (фенілаланіну, тирозину, триптофану). Ароматичне кільце амінокислот нітрується при дії концентрованої нітратної кислоти з утворенням нітросполук, забарвлених у *жовтий колір:*



тирозин

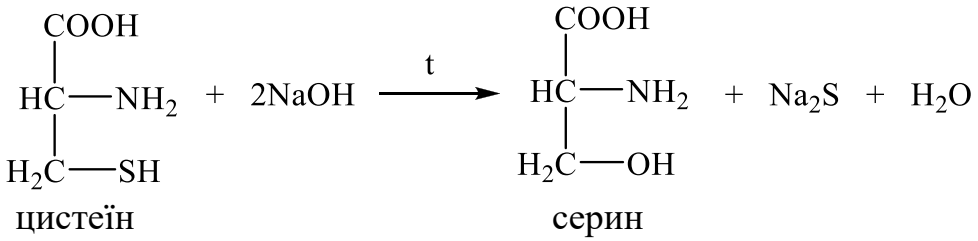


При додаванні амоніаку забарвлення переходить в *оранжеве.*

Хід роботи. У пробірку до 3-4 крапель 1%-го розчину яєчного білка або концентрованого яєчного білка додають 1-2 краплі концентрованої нітратної кислоти. Пробірку обережно нагрівають, спостерігаючи за зміною забарвлення. Утворюється нітросполука *жовтого кольору*.

Дослід 4. Реакція Фоля.

Принцип реакції. Реакція відкриває сульфуровмісні амінокислоти (цистин, цистеїн). При нагріванні цистеїну (або цистину) в лужному середовищі від них легко відщеплюється Сульфур у вигляді гідрогенсульфіду, який у лужному середовищі утворює натрій сульфід:



Утворення натрій сульфіду можна визначити за допомогою іонів важких металів, наприклад, іонів плюмбуму, які утворюють з іонами Сульфуру нерозчинний плюмбум сульфід *чорного кольору*.

Для виявлення Сульфуру можна використовувати плюмбум ацетат, який при взаємодії з натрій гідроксидом утворює натрій плюмбіт. Своєю чергою натрій плюмбіт, реагуючи з натрій сульфідом, зумовлює утворення плюмбум сульфіду:

$$Pb(CH_3COO)_2 + 2\ NaOH \rightarrow Pb(ONa)_2 + 2\ CH_3COOH$$

плюмбум ацетат	натрій гідроксид	натрій плюмбіт	оцтова кислота

$$Na_2S + Pb(ONa)_2 + 2\ H_2O \rightarrow PbS\downarrow + 2\ NaOH$$

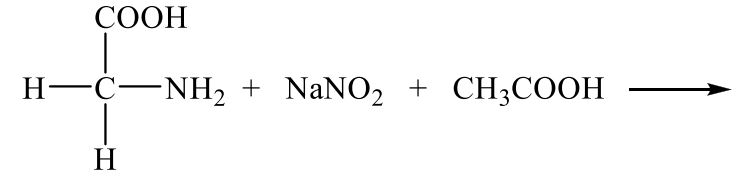
Хід роботи. В 1-у пробірку поміщають трохи волосся або шматочок нігтя, а в 2-у пробірку − 5 крапель 1%-го розчину яєчного білка або концентрованого яєчного білка. В кожну із пробірок додають по 1 краплі розчину плюмбум ацетату, а потім 1 краплю розчину натрій гідроксиду. Пробірки нагрівають до

кипіння. У першій пробірці з'являється *осад чорного кольору*, у другій пробірці – нічого не відбувається або ж утворюється осад білого кольору.

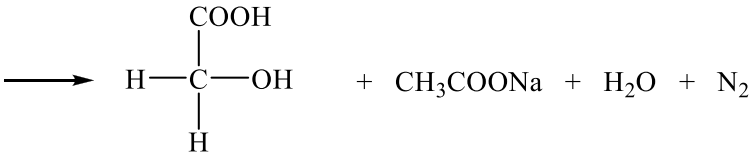
Дослід 5. Реакція Ван-Слайка.

Принцип реакції. Реакція дозволяє визначити NH_2-групу в амінокислотах і білках.

У результаті взаємодії амінокислоти з натрій нітритом та оцтовою кислотою відбувається утворення газоподібного азоту.



гліцин



гідроксиоцтова кислота

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл 1%-го розчину яєчного білка (або концентрованого яєчного білка) або амінокислоти, додають рівний об'єм (1 мл) розчину натрій нітриту та декілька крапель концентрованої оцтової кислоти. При цьому утворюється нітритна кислота, яка вступає в реакцію з аміногрупою. Виділяються бульбашки газу – азоту.

Результати дослідів 1-5 запишіть у таблицю 1 за аналогією:

Таблиця 1 − Якісні реакції на амінокислоти та білки

№ з/п	Назва досліду	Реактиви, які використовуються	Зміни, що відбуваються під час реакції	Висновок
1	2	3	4	5
1	Біуретова реакція	1) 5 крапель 1%-го розчину яєчного білка (або концентрованого яєчного білка); 2) 5 крапель 10%-го розчину натрій гідроксиду; 3) 2 краплі 1%-го розчину купрум (II) сульфату; все перемішують.	Фіолетове забарвлення	Реакція доводить наявність у молекулах білків, пептидів, пептидних зв'язків (-CO-NH-).
2 і т.д.				

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

ТЕМА 2. БІЛКИ

Білки – високомолекулярні полімерні природні сполуки; мономерами яких є α-амінокислоти. Білки синтезуються на рибосомах з α-амінокислот і транспортних РНК (т-РНК).

Є 4 рівні організації білка (структури білка):

Первинна структура білка − лінійна послідовність залишків α-амінокислот у ланцюзі, зв'язаних між собою пептидним (амідним ковалентним) зв'язком (рис. 10), що утворюється при взаємодії карбоксильної групи однієї α-амінокислоти та аміногрупи іншої α-амінокислоти (лінійний поліпептидний ланцюг).

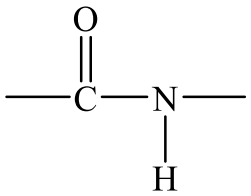


Рисунок 10 − Пептидний зв'язок

Залежно від кількості з'єднаних пептидним зв'язком α-амінокислот розрізняють дипептиди, трипептиди, і т.д. та поліпептиди. На одному кінці поліпептидного ланцюга є вільна аміногрупа (N-кінець), а на іншому − вільна карбоксильна група (С-кінець) (рис. 11).

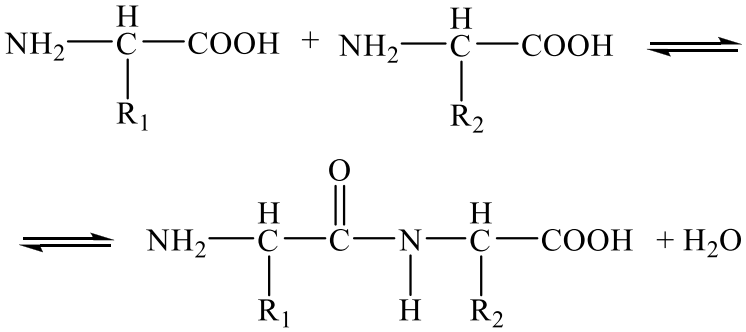
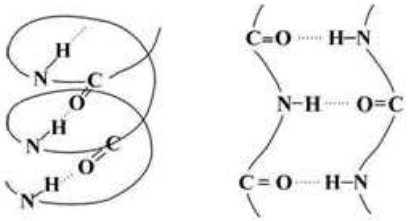


Рисунок 11 – Схема утворення дипептиду

Приклади білків, які мають первинну структуру: глутатіон, інсулін, окситоцин, вазопресин, рибонуклеаза тощо.

Вторинна структура білка − впорядкована просторова конформація поліпептидного ланцюга, що утворюється за рахунок водневих зв'язків між пептидними групами в одному поліпептидному ланцюзі або між сусідніми поліпептидними ланцюгами. При цьому конформація може набувати вигляду α-спіральних, β-складчастих і нерегулярних (змішаних) структур (рис. 12 а, б).



а б

Рисунок 12 − Схематичне зображення вторинної структури білка:
а − α-спіраль (правозакручена), б − β-складчаста структура

У природних білках виявлено тільки правозакручені а-спіралі.

Приклади білків, які мають вторинну структуру: фіброїн (білок шовку), β-кератин (білок сполучної тканини), хімотрипсин тощо.

Третинна структура білка − просторове розташування вторинних структур білка (або форма упакування білкової молекули в просторі) (рис. 13).

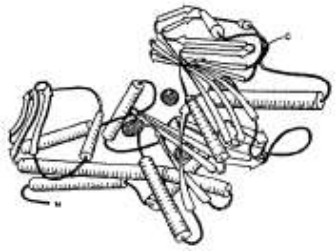


Рисунок 13 − Схематичне зображення третинної структури білка
(ферменту гексакінази)

У формуванні третинної просторової структури білків, окрім ковалентних зв’язків (пептидних і дисульфідних), основну роль відіграють нековалентні зв’язки: водневі, іонні, вандерваальсові сили, гідрофобна взаємодія та ін.

За формою третинної структури білки поділяють на **глобулярні** (альбуміни, глобуліни, гістони) та **фібрилярні** (колаген, еластин, α-кератин). Глобулярні білки мають еліпсоїдну форму, а фібрилярні – видовжену (палички, нитки). Більшість білків у нативному стані мають компактну структуру.

Кератини − білки волосся та шерсті, які за третинною структурою належать до фібрилярних білків.

Для вивчення третинної структури білка найчастіше застосовують метод рентгеноструктурного аналізу та електронної мікроскопії.

Приклади білків, які мають третинну структуру: гексокіназа, α-кератин опорних тканин тощо.

Четвертинна структура білка − взаємне розташування в просторі кількох (частіше чотирьох) молекул білка або поліпептидних ланцюгів у просторі (вищий рівень організації) (рис. 14).

Рисунок 14 − Схематичне зображення четвертинної структури білка

Четвертинна структура стабілізується та підтримується в нативному стані в основному за рахунок слабких нековалентних зв'язків (іонних і водневих) та гідрофобних взаємодій, які виникають між різними функціональними групами, розташованими на поверхні субодиниць.

Білки, які мають четвертинну структуру, називаються **олігомерними**.

Кожний окремий поліпептидний ланцюг у складі олігомерного білка називається **протомером** (або **субодиницею**), який може бути представлений як одним протомером, так і декількома. Наприклад, у білка з чотирьох однакових субодиниць (А4) протомером є мономер А, а білок із двох типів субодиниць (А4В4) має 2 протомери складу АВ.

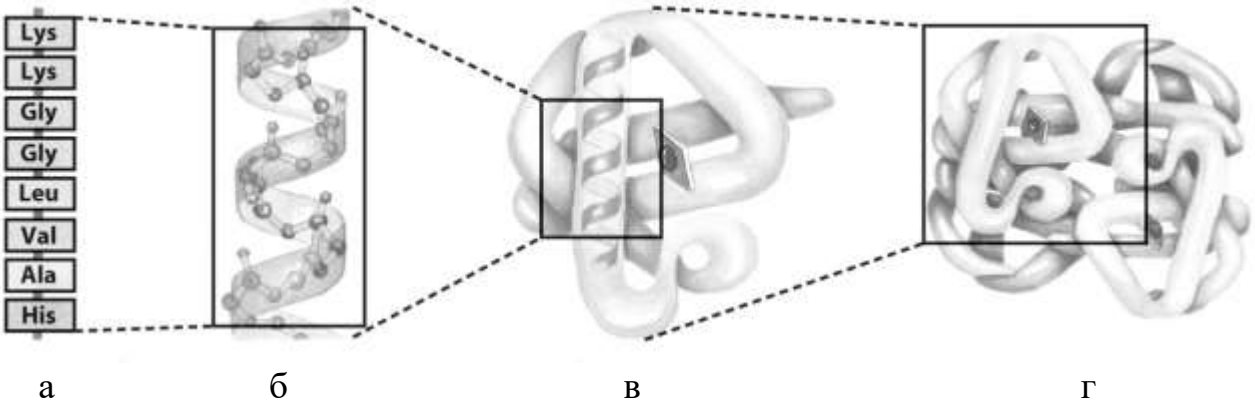
Олігомерні білки найчастіше побудовані з парного числа протомерів − від 2 до 4 (димери, тетрамери), рідше від 6 до 8, 10, 12 і більше з молекулярною масою в межах від декількох тисяч до 100000 дальтон.

Дальтон − одиниця вимірювання маси атомів, молекул, а також вірусів, клітин та їх структур (хромосом, рибосом, мітохондрій та ін.), що дорівнює 1/12 маси атома Карбону (^{12}C), або 1,661 10^{-24} м.

Приклад білка, який має четвертинну структуру: гемоглобін.

Гемоглобін − білок, який складається з чотирьох субодиниць. Кожна із субодиниць − глобулярний білок.

Чотири структури білка можна представити так, як це зображено на рис. 15 (а, б, в, г):



а б в г

Рисунок 15 − Структури білка: а − первинна (залишки α-амінокислот); б − вторинна (α-спіраль); в − третинна (глобула); г − четвертинна (протомери або субодиниці)

Класифікація білків

Розрізняють **прості (протеїни)** (містять тільки залишки α-амінокислот) та **складні (протеїди)** (містять залишки α-амінокислот і простетичну групу) **білки.**

До простих білків (протеїнів) можна віднести: альбуміни, глобуліни, гістони, протаміни, колаген, еластин, кератин.

До складних білків (протеїдів) можна віднести: глюкопротеїди (імуноглобулін G); ліпопротеїди (ліпопротеїд крові), фосфопротеїди (казеїн молока), нуклеопротеїди, гемопротеїди (гемоглобін), металопротеїди (феритин, алкогольдегідрогеназа, кальмодулін, динітрогеназа), флавопротеїди (сукциналдегідрогеназа).

Функції білків

Білки виконують функції, характерні для живих організмів, а саме:

1) **енергетичну функцію** − при розкладанні білка виділяється енергія (1 г білка утворює 17 кДж);

2) **каталітичну функцію** − всі біологічні каталізатори – ферменти (глобулярні білки); вони визначають швидкість хімічних реакцій у біологічних системах. Наприклад, рибонуклеаза, трипсин;

3) **запасну функцію** − резервні білки виконують функцію живлення, є джерелами для розвитку плоду. Наприклад, білок молока (казеїн), гліадин (пшениця), яєчний овальбумін (яйце), феритин;

4) **захисну функцію** − функцію захисту в організмі виконує імунна система, яка забезпечує синтез специфічних захисних білків-антитіл у відповідь на надходження в організм бактерій, токсинів або вірусів. Наприклад, антитіла, фібриноген, тромбін, ботулінічний токсин, дифтерійний токсин, зміїна отрута, рицин;

5) **скорочувальну функцію** − в акті м’язового скорочення та розслаблення беруть участь білкові речовини. Наприклад, актин, міозин, тубуліни, динеїни;

6) **структурну функцію** − найважливішу роль відіграє колаген у сполучній тканині, кератин − у волоссі, нігтях, шкірі, еластин − у судинній стінці та ін. Наприклад, кератин, фіброїн, колаген, еластин, протеоглікани, мукопротеїни;

7) **гормональну функцію** − обмін речовин в організмі регулюється різноманітними механізмами. У цій регуляції важливу роль відіграють гормони (білкової або пептидної природи), що виробляються в залозах внутрішньої секреції. Наприклад, інсулін, гормон росту, кортикотропін;

8) **сигнальну функцію** − через білки передаються сигнали і направляються у внутрішньоклітинні центри. При цьому подразники – хімічні чи механічні – зумовлюють певні зміни в структурі білків, це є своєрідною реакцією на зовнішнє подразнення (принцип діяльності нервової системи). Наприклад, родопсин;

9) **транспортну функцію** − дихальна функція крові, зокрема перенесення кисню, здійснюється молекулами гемоглобіну. У транспорті ліпідів бере участь альбумін сироватки крові. Наприклад, гемоглобін, сироватковий альбумін, міоглобін, β_1-ліпопротеїн.

? Питання для самоконтролю

1. Порівняйте особливості первинної, вторинної, третинної та четвертинної структури білка. Назвіть характерні типи зв'язків у структурах білків. Наведіть приклади білків.
2. Охарактеризуйте класифікацію та розкрийте функції білків.
3. Наведіть реакції, що дозволяють перевірити властивості білків.

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Напишіть реакцію утворення дипептидів − аланілфенілаланіну, валілсерину. Вкажіть N-кінець (N-кінцеву амінокислоту), С-кінець (С-кінцеву амінокислоту), пептидний зв'язок у структурах дипептидів.
2. Охарактеризуйте прості (протеїни) та складні (протеїди) білки. Наведіть приклади білків і поясніть їх біологічну роль.

Лабораторна робота № 2
ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ

Мета роботи: провести реакції зворотного й незворотного осадження білка (висолювання та денатурацію відповідно); визначити ізоелектричну точку білка (желатину).

Практичне значення роботи: осадження білків методом висолювання використовують для розділення білкових фракцій при одержанні очищених білків, для розділення альбумінів і глобулінів, визначення їх співвідношення у сироватці крові. Осадження білків методом денатурації білків використовується для осадження білків у біологічному матеріалі з подальшим визначенням у ньому небілкових і низькомолекулярних речовин. За допомогою ізоелектричної точки індивідуальних білків можна підібрати умови для осадження їх із біологічних рідин, що містять суміш різних білків.

Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, пробіркотримач, піпетки автоматизовані, сухе пальне, сірники; дистильована вода, 1%-й розчин яєчного білка або концентрований розчин яєчного білка, розчин амоній сульфату, 1%-й розчин купрум (II) сульфату, 10%-й розчин плюмбум ацетату; концентрована нітратна кислота, концентрована хлоридна кислота; 1%-й розчин желатину; 0,1 моль/л, 1 моль/л розчини оцтової кислоти, 0,1 моль/л розчин натрій ацетату, 96%-й етиловий спирт або 95%-й ацетон.

Дослід 1. Зворотне осадження білків – висолювання.

Принцип реакції. Реакція висолювання зумовлена дегідратацією макромолекул білка з одночасною нейтралізацією його електричного заряду.

При додаванні солей лужних і лужноземельних металів $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_4, NaCl, $MgSO_4$ до розчину білка відбувається дегідратація білкових часток, і білки випадають в осад. *При додаванні води* до цього розчину гідратаційна оболонка білкових часток відновлюється, *осад розчиняється*.

Хід роботи. До 1 мл нерозведеного яєчного білка або концентрованого розчину яєчного білка додають 1 мл розчину амоній сульфату. Рідину

збовтують і спостерігають незначне помутніння. Доливають 1 мл води − *помутніння зникає.* Висолювання є зворотним процесом осадження білків.

Дослід 2. Незворотне осадження білків – денатурація.

Принцип реакції. Осаджуються білки з розчинів солями важких металів (купрум сульфат, плюмбум ацетат), мінеральними й органічними кислотами, кип'ятінням. При незворотному осадженні порушується гідратаційна оболонка та заряд білка. *При додаванні води* до розчину гідратаційна оболонка білкових часток не відновлюється, *осад не розчиняється*.

Хід роботи.

а) осадження білків солями важких металів. У дві пробірки наливають по 1 мл концентрованого розчину яєчного білка, в 1-у пробірку додають декілька крапель 1%-го розчин купрум (II) сульфату, в 2-у пробірку – 10%-й розчин плюмбум ацетату;

б) осадження білків неорганічними кислотами. У дві пробірки наливають по 1 мл кислот: у 1-у пробірку – концентровану нітратну кислоту, в 2-у пробірку – концентровану хлоридну кислоту. Потім у кожну пробірку обережно по стінці доливають рівний об’єм концентрованого розчину яєчного білка;

в) осадження білків при нагріванні. У пробірку наливають 1 мл концентрованого розчину яєчного білка та кип’ятять.

!!! Доливають 1 мл води в усі пробірки – *осад не зникає.* Денатурація є незворотним процесом осадження білків.

Результати дослідів 1-2 запишіть у таблицю 2 за аналогією:

Таблиця 2 − Властивості білків

№ з/п	Назва досліду	Реактиви, які використо-вуються	Зміни, що відбуваються під час реакції	Зміни після додавання води	Висновок
1	2	3	4	5	6
1	Зворотне осадження білків – висолювання	1)1 мл нерозведеного яєчного білка; 2) 1 мл розчину амоній сульфату; збовтують	Слабке помутніння	Помут-ніння зникає	Висолю-вання − зворотний процес осадження білків

Дослід 3. Визначення ізоелектричної точки білка (желатину).

Принцип реакції. Визначення ізоелектричної точки білків ґрунтується на здатності білків легко осаджуватися під дією осаджувачів, що викликають

дегідратацію білків, при значенні pH середовища, яке відповідає їх ізоелектричній точці.

Ізоелектрична точка (ІЕТ) − значення pH, при якому білок має сумарний нульовий заряд, тобто є електронейтральним.

Хід роботи. У 6 пробірок поміщають відповідну кількість (мл) дистильованої води, розчинів оцтової кислоти (0,1 моль/л або 1 моль/л), натрій ацетату (0,1 моль/л) та желатину (таблиця 3).

Таблиця 3 − Схема визначення ізоелектричної точки білка (желатину)

№ пробірки	Вода (мл)	CH_3COOH (0,1 моль/л) (мл)	CH_3COOH (1 моль/л) (мл)	CH_3COONa (0,1 моль/л) (мл)	Розчин желатину (1%-й)	Спирт або ацетон (мл)	pH середовища	Зміни, що спостерігаються*
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	3,8	0,2	–	2,0	2,0	2,0	5,6	
2	3,5	0,5	–	2,0	2,0	2,0	5,3	
3	3,2	–	0,8	2,0	2,0	2,0	5,0	
4	3,0	1,0	–	2,0	2,0	2,0	4,7	
5	2,0	2,0	–	2,0	2,0	2,0	4,4	
6	–	4,0	–	2,0	2,0	2,0	4,1	

Примітка. * − «–» – помутніння відсутнє; «+» – слабкий ступінь помутніння; «++» – середній ступінь помутніння; «+++» − максимальний ступінь помутніння.

Вміст кожної пробірки перемішують. Потім у всі пробірки повільно по стінці доливають по 2 мл спирту (або ацетону).

Через 30 хв визначають ізоелектричну точку. Вона буде відповідати значенню pH у пробірці з максимальним ступенем помутніння.

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

ТЕМА 3. ВИДІЛЕННЯ, ОЧИСТКА, РОЗДІЛЕННЯ АМІНОКИСЛОТ І БІЛКІВ

Для дослідження фізико-хімічних, біологічних властивостей білків, вивчення їх хімічного складу, структури необхідною умовою є отримання білків у хімічно чистому, гомогенному стані.

Послідовність таких операцій із виділення білків: подрібнення біологічного матеріалу (гомогенізація); вилучення білків із гомогенату (перехід їх у розчинений стан); виділення досліджуваного білка із суміші інших (очистка та розділення індивідуального білка).

Операції з виділення білків проводять у «м’яких» умовах при температурі не вище ніж 4 ^{0}C. При підвищенні температури білки піддаються денатурації (втрачають нативні властивості, зокрема, розчинність і біологічну активність).

Виділення індивідуальних білків є ступінчастим процесом, тому на перших етапах очистки фракції містять безліч домішок. На кожному ступені розділення повинна утворюватися фракція, що містить більшу кількість необхідної речовини, ніж попередня. Такий процес називають **фракціонуванням**.

На кожній стадії розділення білок повинен перебувати або у вигляді розчину, або у вигляді осаду.

Для осадження за допомогою дегідратації необхідно знизити розчинність білка. Розчинність білка залежить від його здатності до гідратації. У глобулярних водорозчинних білків високий рівень гідратації забезпечується розташуванням гідрофільних груп на поверхні. Додавання органічних розчинників знижує ступінь гідратації та зумовлює осадження білка. Як розчинник використовують ацетон. Осаджують білки також за допомогою солей (наприклад, амоній сульфату). Цей метод ґрунтується на тому, що при підвищенні концентрації солі в розчині відбувається стискання іонних атмосфер, утворених протиіонами білка, що сприяє зближенню їх до критичної відстані. Це зумовлює злипання білкових частинок та їх випадання в осад.

Діаліз – метод очистки білків від низькомолекулярних домішок (солей). Метод ґрунтується на використанні мембран (плівки з целофану − нітрат целюлози), проникних для води та низькомолекулярних речовин (солей), але непроникних для білків (рис. 16 а).

Розчин білка поміщають у мішок із целофану й занурюють у посудину з водою (рис. 16 б). Безперервний струм води пропускають крізь посудину з білком. Білок залишається всередині в целофановому мішку, а домішки – в буферному розчині.

а б

Рисунок 16 – Діаліз: а − схема діалізу; б − особливості процесу очистки розчину білка до та після діалізу

Гель-фільтрація − метод молекулярного просіювання молекул білка крізь гранули сефадексу (тримірні полісахаридні ланцюги декстрану, що мають пори), які збільшуються в об’ємі.

Швидкість проходження білків крізь колонку, що заповнена сефадексом, залежить від їх молекулярної маси (рис. 17 а, б, в). Через колонку, заповнену гранулами сефадексу, пропускають суміш високомолекулярних і низькомолекулярних білків (рис. 17 а). Низькомолекулярні білки проникають у гранули сефадексу; високомолекулярні білки проходять між гранулами. Крупні

молекули білка не потрапляють усередину гранул (рис. 17 б). На останньому етапі відбувається розділення білків на фракції (рис. 17 в).

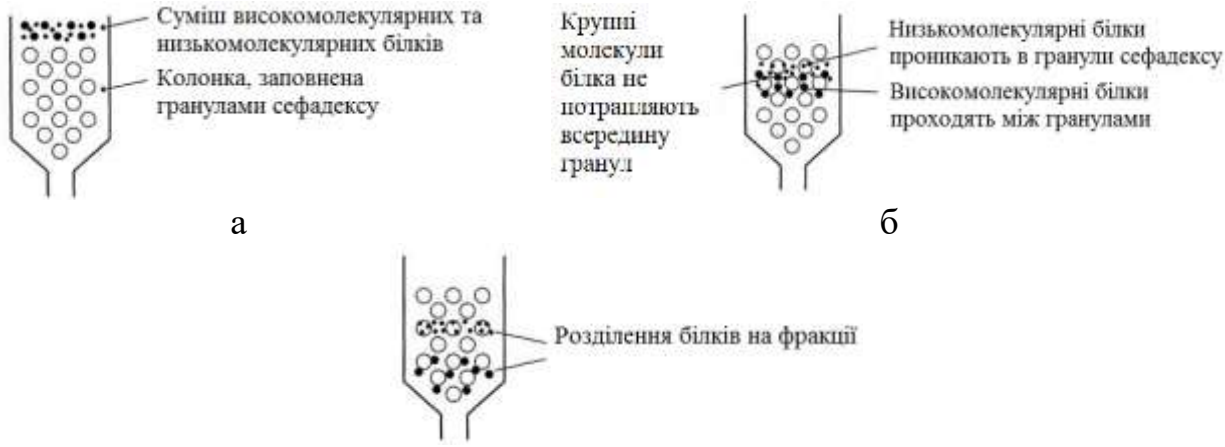
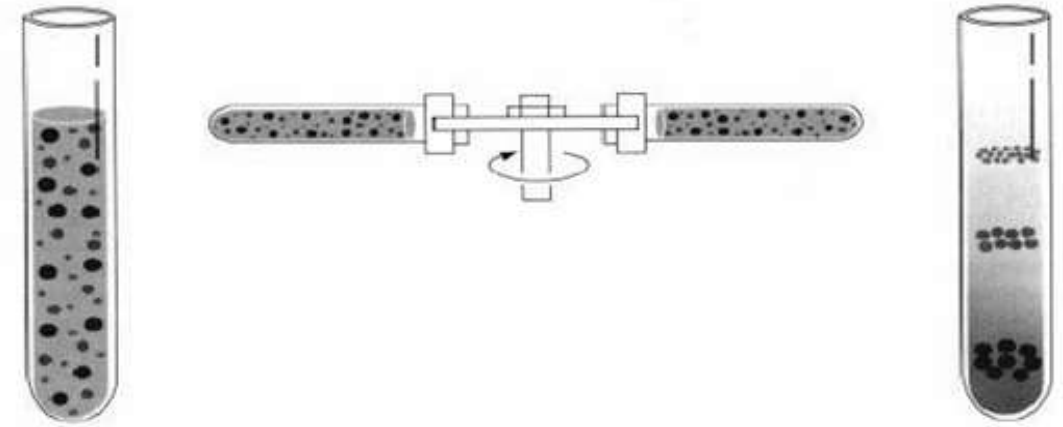


Рисунок 17 – Гель-фільтрація на колонці із сефадексом: а − I етап; б − II етап; в − III етап

Центрифугування − метод розділення білків за молекулярною масою фракцій білків під час центрифугування (рис. 18).

При обертанні ротора центрифуги швидкість зсідання білків пропорційна їх молекулярній масі: більш важкі білки утворюють фракції, розміщені на дні пробірки, більш легкі − на поверхні. При центрифугуванні осад білка, що випав, можна виділити фільтруванням.



1. Однорідна суміш білків

2. Центрифугування

3. Сформований градієнт і смуги розділених молекул білка

Рисунок 18 – Центрифугування суміші білків

Електрофорез − метод, в основі якого лежить різниця у швидкості руху білків в електричному полі. Електрофорез білків проводять на папері (швидкість руху білків пропорційна тільки їх заряду) або в поліакриламідному гелі, що має певну величину пор (швидкість руху білків пропорційна їх заряду та молекулярній масі) (рис. 19).

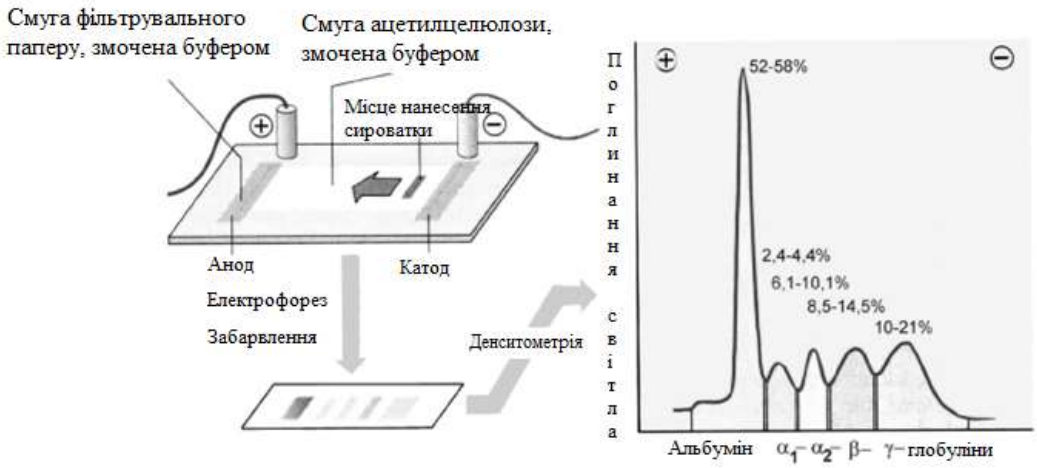


Рисунок 19 – Електрофорез білків сироватки крові

Тонкошарова хроматографія − метод розділення суміші білків або суміші амінокислот на хроматографічному папері; або метод ідентифікації амінокислот, що містяться в розчині.

Суміш амінокислот наносять на смужку хроматографічного паперу (нерухома фаза), кінець якого занурюють у буферну систему (суміш бутанол : оцтова кислота : вода − 4 : 1 : 5) (рухома фаза) (рис. 20 а). Буферна система піднімається вздовж хроматографічного паперу від лінії старту до лінії фінішу; розчиняє нанесені на хроматографічний папір амінокислоти та захоплює їх за собою. При цьому відбувається процес розділення суміші амінокислот (рис. 20 б).

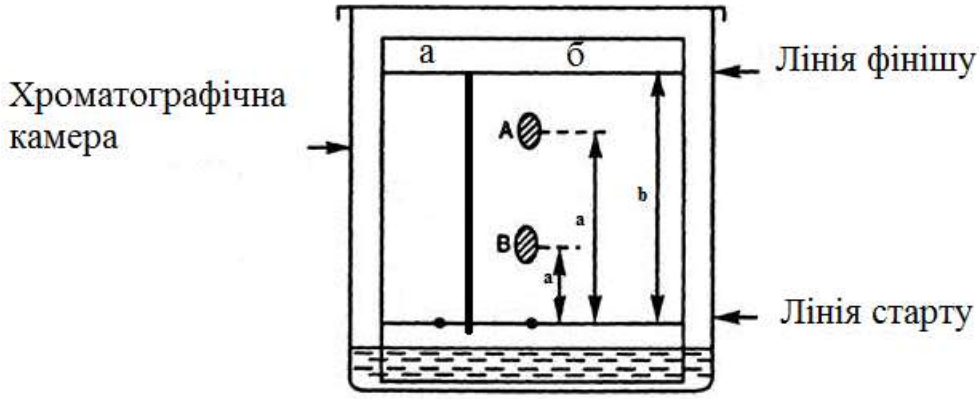


Рисунок 20 – Тонкошарова хроматографія (а − до експерименту, б − після експерименту): А, В − плями, а − відстань від лінії старту до середини плями (мм); b − відстань від лінії старту до лінії фінішу (мм)

Амінокислоти, що розчиняються в органічному розчиннику краще, просуваються вздовж хроматографічного паперу далі; ті ж, що розчиняються в ньому гірше, проходять від місця нанесення коротший шлях.

Для кожної амінокислоти характерний свій коефіцієнт швидкості руху − R_f, який легко визначити практично за формулою:

$$Rf = \frac{a}{b},$$

де a − відстань від лінії старту до середини плями (мм);
b − відстань від лінії старту до лінії фінішу (мм).

R_f постійний для цих умов досліду та використовується для ідентифікації речовин. Для цього порівнюють R_f амінокислот суміші, що досліджують, із R_f відомих стандартних амінокислот. Наприклад, значення R_f для гліцину (R_f = 0,23), аланіну (R_f = 0,3), валіну (R_f = 0,51), лейцину (R_f = 0,7).

Іонно-обмінна хроматографія − метод фракціонування, що ґрунтується на зв'язуванні іонізованих груп білків із протилежно зарядженими групами іонно-обмінних нерозчинних полімерів (рис. 21). Міцність зв'язування білка зі смолою пропорційна заряду білка. Білки, адсорбовані на іонно-обмінному полімері, можна змивати підвищуваними концентраціями NaCl. Чим менше заряд білка, тим менша концентрація NaCl необхідна, щоб змити білок, прикріплений до іоногенних груп смоли.

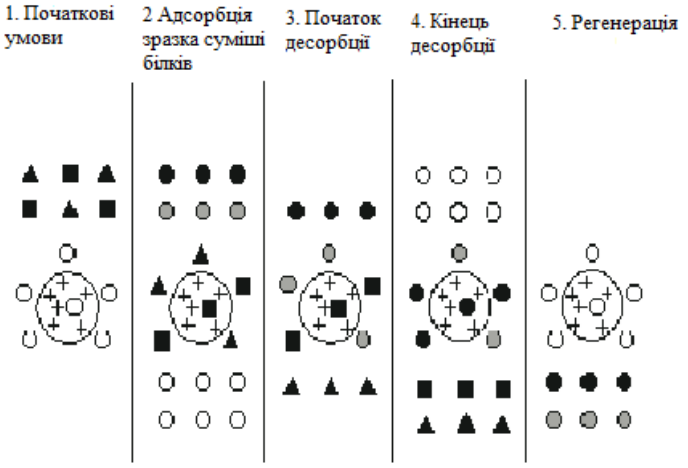


Рисунок 21 − Іонно-обмінна хроматографія: прозорі кружечки – початкові буферні протиіони; чорні квадратики, чорні трикутники – суміш білків, яку розділяють; чорні та сірі кружечки – градієнт-іони; 1-5 − етапи іонно-обмінної хроматографії

Афінна хроматографія − специфічний метод виділення індивідуальних білків. До інертного полімеру ковалентно приєднується ліганд якого-небудь білка (рис. 22). При пропусканні розчину білків крізь колонку з полімером за рахунок комплементарного зв'язування білка з лігандом на колонці адсорбується тільки специфічний для цього ліганду білок.

Рисунок 22 − Афінна хроматографія

? Питання для самоконтролю

1. Поясніть особливості виділення, очистки, розділення розчину амінокислот і білків.
2. Назвіть та охарактеризуйте методику кількісного визначення загального білка в сироватці крові за допомогою біуретового реактиву.

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Опишіть етапи виділення білка з біологічного об’єкта (матеріалу).
2. Опишіть методи очистки та розділення білків (укажіть особливості методу та надайте рисунок): діаліз, центрифугування, гель-фільтрація, електрофорез, тонкошарова хроматографія, іонно-обмінна хроматографія, афінна хроматографія.
3. Охарактеризуйте метод Лоурі та метод Бредфорда. Укажіть відмінності цих методів. Результати порівняння подайте в таблиці.

Лабораторна робота № 3
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКА В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА ДОПОМОГОЮ БІУРЕТОВОГО РЕАКТИВУ

Мета роботи: навчитися кількісно визначати загальний білок у сироватці крові за допомогою біуретового реактиву.

Практичне значення роботи: у клініко-біохімічних лабораторіях для встановлення діагнозу захворювання проводять кількісне визначення концентрації загального білка в біологічних рідинах організму (сироватці крові, сечі, спинномозковій рідині).

У нормі вміст загального білка в сироватці крові становить у дорослих 65-85 г/л (6,5-8,5 мг/мл).

Гіпопротеїнемія (зниження рівня концентрації білка) спостерігається при недостатньому надходженні білків з їжею або зниженні процесів біосинтезу білків в органах, втраті білка організмом при гострих і хронічних кровотечах, підвищеній проникності капілярних стінок, при крововиливах і набряках.

Гіперпротеїнемія (підвищення рівня концентрації білка) відзначається рідко: при згущенні крові через значні втрати рідини, при інфекційному чи

токсичному ураженні ретикулоендотеліальної системи, в клітинах якої синтезуються глобуліни, при хронічному поліартриті, ревматизмі.

Гіпопротеїнемія майже завжди пов'язана з гіпоальбунемією, гіперпротеїнемія − з гіперглобулінемією.

Матеріали та реактиви: біохімічні пробірки, піпетки автоматичні, робочий розчин біуретового реактиву, стандартний розчин альбуміну (1 мл стандартного розчину альбуміну, що містить 10 мг або 0,01 г білка), фотоелектроколориметр (КФК-2 або КФК-3), кювети з товщиною шару 1 см, міліметровий папір.

Принцип реакції. Реакція утворення комплексу описана в лабораторній роботі №1, дослід 1.

Хід роботи. До 5 мл робочого розчину біуретового реактиву додають 0,1 мл 0,9%-й розчин натрій хлориду (фізіологічний розчин) (*холоста* або *контрольна проба*). Вміст пробірки перемішують.

До 5 мл робочого розчину біуретового реактиву додають, уникаючи утворення піни, 0,1 мл сироватки крові (*дослідна проба*). Вміст пробірки перемішують.

До 5 мл робочого розчину біуретового реактиву додають відповідно у 5 пробірок 0,2 мл; 0,4 мл; 0,6 мл; 0,8 мл; 1,0 мл розчину альбуміну, що містить 10 мг або 0,01 г білка в 1 мл (*калібрувальна проба*). Загальний об'єм у кожній пробірці доводять до 1 мл дистильованою водою. Вміст пробірок перемішують.

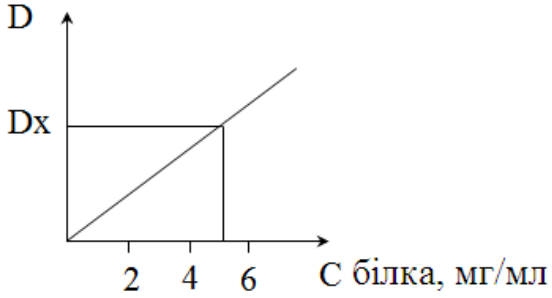
Через 30 хв, але не пізніше ніж через 1 год, усі проби (холосту або контрольну, дослідну, калібрувальну) колориметрують на фотоелектроколориметрі (КФК-2 або КФК-3) в кюветі з товщиною шару 10 мм при зеленому світлофільтрі (максимум пропускання – 540-560 нм, найкраще – 546 нм).

У холостій або контрольній пробі спостерігається розчин *синього кольору*. У дослідній та калібрувальних пробах розчин набуває *синьо-фіолетового забарвлення.*

Визначають експериментально показник екстинкції у всіх пробах при довжині хвилі 540 нм або 546 нм.

Будують калібрувальну криву за значеннями показників екстинкції 5 калібрувальних проб (див. пункт 3 − Побудова калібрувальної кривої для речовини та пункт 4 − Визначення концентрації речовини в розчині (рис. 5).

Розрахунки концентрації загального білка в сироватці крові виконують за калібрувальною кривою; розраховують на 1 мл нерозведеної сироватки крові. Графік будують на міліметровому папері за поданим нижче прикладом.



За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

ТЕМА 4. БІОХІМІЯ ФЕРМЕНТІВ

Ферменти − каталізатори, що прискорюють протікання біохімічних реакцій в організмі; є білками (Дж. Самнер, 1926 р.) із різними молекулярними масами − від 9 кДа (АОМ) до 1000 кДа.

Ферменти проявляють свою дію у звичайних умовах (t = 36 ^{0}C, pH = 7, але є деякі виключення). Ферменти містяться в ядрі, у внутрішній мембрані мітохондрій, лізосомах, цитоплазмі, матриксі мітохондрій та плазматичній мембрані.

За своєю хімічною природою ферменти бувають **простими** та **складними.**

Прості ферменти складаються тільки з білкової частини − **апоферменту**.

Складні ферменти складаються з білкової частини − **апоферменту** та небілкової частини − **коферменту** (вітаміни, нуклеотиди, залізопорфіринові структури та ін.); складні ферменти мають назву **холофермент**.

Коферменти можуть бути переносниками Гідрогену та електронів; переносниками угруповань; речовинами, що беруть участь у синтезі та розриві Карбон-Карбонових зв'язків (С–С).

У структурі ферменту виокремлюють такі центри:

1) **Активний центр ферменту** − центр, утворений із залишків амінокислот, що наявні у складі різних ділянок поліпептидного ланцюга або різних поліпептидних ланцюгів, просторово зближених (рис. 23). Утворюється на рівні третинної структури білка-ферменту.

Активний центр має у своїй структурі **субстратний (адсорбційний)** та **каталітичний центри.** Відповідно він визначає специфічність ферменту та каталітичну активність.

Субстратний (адсорбційний) центр ферменту − це ділянка активного центру ферменту, що безпосередньо бере участь у процесах зв'язування субстрату з ферментом та передачі цього комплексу в зручному положенні на каталітичний центр (рис. 23).

Субстрат − речовина, на яку діє фермент. Субстрат прикріплюється до ферменту за рахунок слабких типів зв'язків між певними бічними радикалами амінокислотних залишків та відповідними групами молекули субстрату, тому реакція є **зворотною**.

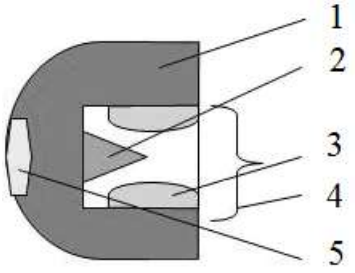


Рисунок 23 − Будова ферменту: 1 − апофермент; 2 − каталітичний центр; 3 − субстратний центр; 4 − активний центр; 5 − алостеричний центр

Структура субстратного (адсорбційного) центру визначає **субстратну специфічність ферменту**.

Каталітичний центр ферменту – це ділянка активного центру ферменту, що безпосередньо бере участь у хімічних перетвореннях субстрату (рис. 23). Формується каталітичний центр за рахунок радикалів 2-х або 3-х амінокислот, розташованих у різних місцях поліпептидного ланцюга ферменту, але просторово зближених між собою за рахунок вигинів цього ланцюга.

2) **Алостеричний центр ферменту** − це ділянка ферменту, що знаходиться за межами активного центру ферменту, де відбувається зв'язування слабкими типами зв'язків (зворотно) з тією чи іншою речовиною. Це зв'язування зумовлює конформаційну перебудову молекули ферменту, що поширюється й на активний центр, полегшуючи або ускладнюючи (сповільнюючи) його роботу. Відповідно такі речовини називаються **алостеричними активаторами** або **алостеричними інгібіторами** даного ферменту.

Алостеричні центри є у ферментах, робота яких може змінюватися під дією гормонів, медіаторів та інших біологічно активних речовин.

Інгібітори – речовини, що зменшують активність ферментів і сповільнюють хімічні реакції. Розрізняють такі види інгібування (рис. 24).

Рисунок 24 − Види інгібування активності ферментів

Якщо інгібітор зв'язується з молекулою ферменту слабкими зв'язками, такий інгібітор легко можна відділити, активність ферменту відновлюється.

Якщо інгібітор зв'язується з молекулою ферменту міцними ковалентними зв'язками, відбувається незворотне пригнічення активності ферменту, активність ферменту не відновлюється:

Незворотне інгібування відбувається при денатурації ферментів-білків під дією концентрованих кислот, лугів, солей важких металів, ультрафіолетовому випромінюванні.

Наприклад, ціаніди зв'язуються з Ферумом у ферментах-гемопротеїнах. Фосфорорганічні отрути (зарин, табун) утворюють міцні зв'язки із залишками серину, треоніну, що входять до складу багатьох ферментів.

Зворотне інгібування буває **конкуретне** та **неконкурентне**.

Конкурентне інгібування відбувається в присутності речовини, що структурно подібна до субстрату та взаємодіє з активним центром ферменту.

Наприклад, малонова кислота є конкурентним інгібітором сукцинатдегідрогенази, оскільки схожа на бурштинову кислоту (має також 2 карбоксильні групи); тому малонова кислота легко зв'язується з активним

центром сукцинатдегідрогенази, витісняючи звідти субстрат − бурштинову кислоту. Однак фермент не здатний таким чином подіяти на малонову кислоту яка коротша на 1 атом Карбону.

Конкурентні інгібітори доволі часто використовуються як лікарські засоби.

Наприклад, антимікробні препарати сульфаніламіди є структурними аналогами n-амінобензенової кислоти, з якої мікроорганізми синтезують необхідний їм для розмноження вітамін B_9 (фолієву кислоту). Багато антибіотиків конкурентно пригнічують синтез білка мікроорганізмами або реплікацію ДНК.

Неконкурентні інгібітори не мають структурної подібності до субстрату і приєднуються не до активного центру, а до інших частин ферменту (наприклад, до алостеричного центру).

Механізм дії ферментів та основні етапи ферментативної реакції.

Схематичне зображення механізму дії ферментів та основних етапів ферментативної реакції (1, 2, 3 етапи) наведено на рис. 25.

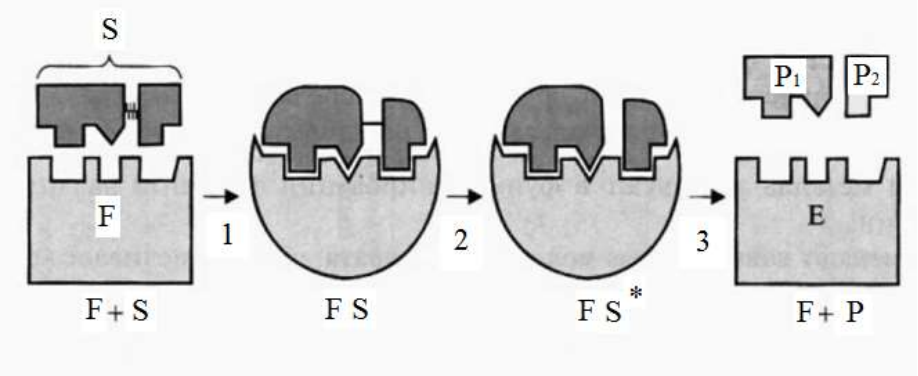


Рисунок 25 − Схематичне зображення механізму дії ферментів та основних етапів ферментативної реакції (1, 2, 3 етапи)

1) На 1-ому етапі відбувається сорбція субстрату на субстратному (адсорбційному) центрі ферменту, що супроводжується утворенням зворотного фермент-субстратного комплексу (F · S) (рис. 25). Молекула субстрату подається на каталітичний центр у найбільш зручному для нього положенні.

Кінетична характеристика 1-ого етапу ферментативного каталізу – константа Міхаеліса (K_m).

2) На 2-ому етапі відбуваються хімічні перетворення молекули субстрату у складі фермент-субстратного комплексу (Fe · S) з утворенням комплексу ферменту з хімічно перетвореним субстратом (Fe · S*) (рис. 25).

На 2-ому етапі розриваються одні ковалентні зв’язки та виникають нові. Цей етап протікає значно повільніше, ніж 1-й та 3-й етапи. Швидкість 2-ого етапу визначає швидкість усієї ферментативної реакції загалом. Швидкість ферментативного процесу загалом характеризується величиною k_{+2}, що є майже завжди найменшою з усіх констант швидкостей (рис. 25). Цей етап незворотний. Кінетична характеристика 2-ого етапу ферментативного каталізу – максимальна швидкість (V_{max}).

3) На 3-ому етапі відбувається десорбція продукту реакції та вивільнення ферменту в незмінному стані (рис. 25). Цей етап протікає легше, ніж 2-й етап і також є незворотним.

Кінетика ферментативної реакції (ферментативного каталізу).

Етапи та кінетика ферментативної реакції (ферментативного каталізу) наведено на рис. 26.

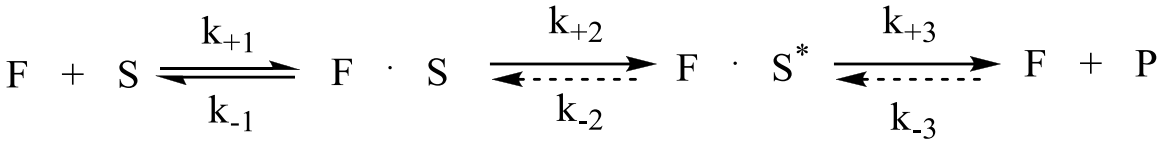


Рисунок 26 − Етапи та кінетика ферментативної реакції (ферментативного каталізу): F − фермент; S − субстрат; F · S − фермент-субстратний комплекс; F · S*– активний фермент-субстратний комплекс; P − продукт; k_{+1}, k_{+2}, k_{+3} − константи швидкості 1, 2, 3 етапів прямої реакції; k_{-1}, k_{-2}, k_{-3} − константи швидкості 1, 2, 3 етапів зворотної реакції

Зі збільшенням концентрації субстрату [S] збільшується швидкість (V) ферментативної реакції (рис. 27).

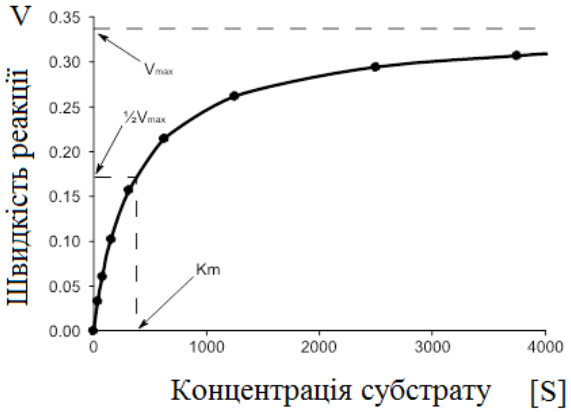


Рисунок 27 − Залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату (крива Міхаеліса)

При постійних кількостях ферменту швидкість реакції пропорційна концентрації субстрату, але тільки в зонах низьких концентрацій. При високих концентраціях субстрату відбувається **насичення ферменту субстратом**.

Швидкість реакції виходить на максимальний рівень (V_{max}) і далі вже не залежить від концентрації субстрату. Залежність швидкості реакції від концентрації субстрату необхідно визначати в тій частині кривої, яка нижче від V_{max}. Технічно легше визначити не максимальну швидкість, а ½ V_{max}. Цей параметр є основною характеристикою ферментативної реакції та дозволяє визначити константу Міхаеліса (K_m) (рис. 27).

Рівняння залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату має такий вигляд:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

де V − швидкість реакції;
V_{max} − максимальна швидкість;
K_m − константа Міхаеліса;
S − концентрація субстрату

$$V = k_{+1} \cdot [F] \cdot [S] \quad (2)$$

Константа Міхаеліса (Km) − відношення суми констант швидкості розкладу фермент-субстратного комплексу до константи швидкості утворення фермент-субстратного комплексу.

$$Km = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (3)$$

$$Km \approx \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = Ks \quad (4)$$

Ця константа визначає спорідненість ферменту із субстратом. Чим нижча константа Міхаеліса-Ментена, тим більша спорідненість ферменту із субстратом і тим вища швидкість ферментативної реакції. За величиною K_m каталітичні реакції можна розподілити на швидкі (K_m 10^{-6} моль/л та менше) та повільні (K_m 10^{-2} до 10^{-6} моль/л).

Константа Міхаеліса (K_m) прирівнюється до константи дисоціації (K_s).

Субстратна специфічність – здатність ферменту взаємодіяти або лише з одним або декількома певними субстратами. Розрізняють:

1) **абсолютну субстратну специфічність** − здатність ферменту каталізувати перетворення тільки одного, строго визначеного субстрату (лактаза, сахараза, мальтоза, уреаза);

2) **відносну субстратну специфічність** – здатність ферменту каталізувати перетворення декількох субстратів, подібних за будовою (пептидаза, естераза, глікозидаза);

3) **стереоспецифічність** – здатність ферменту каталізувати перетворення визначених стереоізомерів субстрату (лактатдегідрогеназа).

Специфічність дії – здатність ферменту каталізувати тільки визначений тип хімічної реакції.

Вплив чинників (температури, pH середовища) на кінетику ферментативної реакції.

Зі збільшенням температури каталітична активність ферменту зростає (рис. 28). Максимальна каталітична активність спостерігається при t = 37-38 ^{0}C (оптимум температури для більшості ферментів), при досягненні t = 40 ^{0}C каталітична активність знижується.

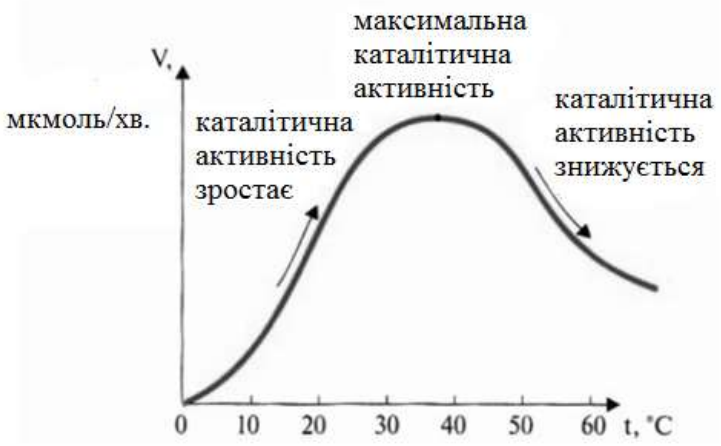


Рисунок 28 − Залежність швидкості ферментативної реакції від температури

Залежність активності ферментів від температури називається **термолабільністю**. Ферменти краще зберігаються при низьких температурах − їх активність знижується, але денатурація не відбувається. Ця властивість використовується в медицині для виробництва препаратів ферментів. При деяких операціях необхідно знизити швидкість обміну речовин, тоді проводять охолодження органів (наприклад, при пересадці нирок, серця та інших органів).

Для різних ферментів характерне певне значення pH середовища, в якому відбувається ферментативна реакція (рис. 29).

Наприклад, для пепсину (оптимум pH = 1,5-2); для трипсину (оптимум pH = 7); для лужної фосфатази (оптимум pH = 10).

Рисунок 29 − Залежність швидкості ферментативної реакції від pH середовища

Активність ферменту − це умовна величина, що прямо пропорційна швидкості біохімічної реакції, яку каталізує певний фермент.

У біохімічній практиці для кількісної характеристики реакцій, що каталізуються ферментами, використовують умовні величини − одиниці ферменту.

Одиниці активності ферменту:

1) **юніт** (англ. − *unit*, U) − це кількість ферменту, що каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хвилину. 1 Юніт (1 U) = 16,67 нкатал.

$$1\ U = 1\ мкмоль\ S\ /\ хв$$

2) **катал** (кат) − це кількість ферменту, що каталізує перетворення 1 моля субстрату за 1 секунду.

$$1\ кат = 1\ моль\ S\ /\ с$$

3) **питома активність ферменту** − одиниця активності ферменту, яка визначається кількістю одиниць ферментної активності, що припадають на 1 мг субстрату в біологічному об'єкті.

Номенклатура ферментів.

Розрізняють систематичну, робочу та тривіальну номенклатуру ферментів:

1) **систематична номенклатура.** Назва ферменту включає: хімічну назву субстрату; тип хімічної реакції (згідно з Міжнародною класифікацією ферментів); суфікс «-аза» (наприклад, L-Лактат НАД$^+$-оксидоредуктаза);

2) **робоча номенклатура**. Назва ферменту утворюється із хімічної назви субстрату шляхом додавання суфікса «-аза» (наприклад, фермент, що каталізує перетворення жиру, – ліпаза);

3) **тривіальна номенклатура.** Не дає уявлення про субстрат або тип хімічного перетворення (наприклад, пепсин, ренін, трипсин, тромбін).

Ферменти розподіляються на 6 класів згідно з типом реакції, яку вони каталізують (Комісія Міжнародного біохімічного союзу, 1961 р.).

1-й клас. Оксидоредуктази − ферменти, що каталізують окисно-відновні реакції різних типів (наприклад, дегідрогенази, оксидази, цитохроми).

2-й клас. Трансферази − ферменти, що каталізують реакції міжмолекулярного перенесення хімічних груп (наприклад, амінотрансферази, метилтрансферази, ацилтрансферази, фосфотрансферази, глікозилтрансферази, кінази).

3-й клас. Гідролази − ферменти, що каталізують реакції гідролізу, тобто розклад субстратів за участю молекули води (наприклад, естерази, пептидази, протеази, глікозидази).

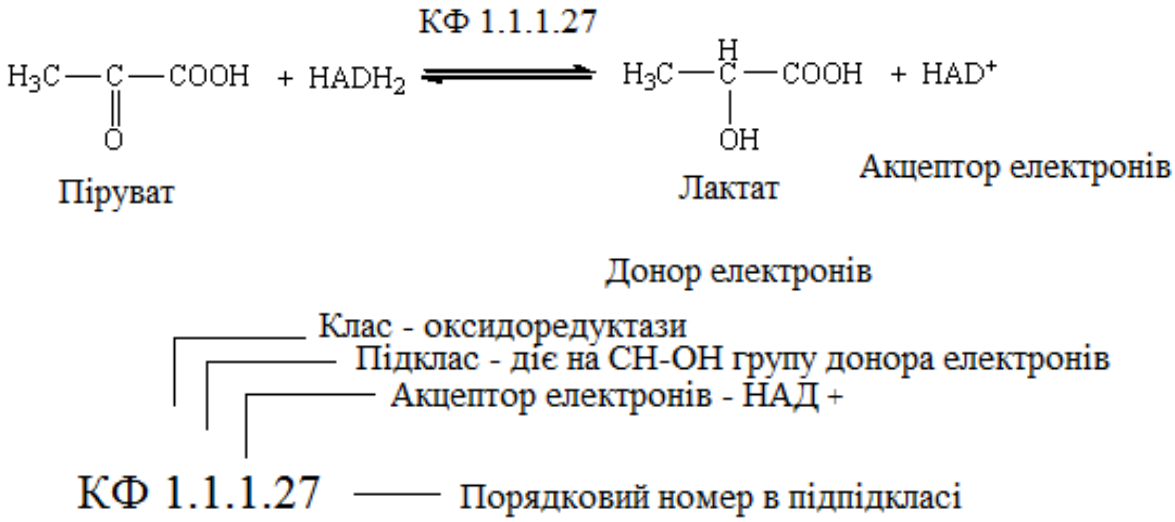
4-й клас. Ліази − ферменти, що каталізують реакції розриву ковалентних зв'язків між атомами C, O, N, S негідролітичним шляхом (наприклад, альдолази, дегідратази).

5-й клас. Ізомерази − ферменти, що каталізують реакції ізомеризації субстратів (наприклад, рацемази, епімерази).

6-й клас. Лігази (синтетази) − ферменти, що каталізують реакції синтезу біомолекул, тобто утворення нових хімічних зв'язків за рахунок енергії АТФ.

Класи ферментів розподіляються на підкласи, а останні − на підпідкласи, у складі яких кожному ферменту відповідає певний номер.

Наприклад, реакція відновлення пірувату до лактату.



? Питання для самоконтролю

1. Розтлумачте такі поняття, як фермент, субстрат, каталіз. Наведіть приклади ферментів.
2. Розкрийте особливості будови простих і складних ферментів.
3. Що являють собою активний (субстратний, каталітичний) та алостеричний центри ферменту?
4. Що таке кофермент, апофермент, ізофермент? Поясніть їх роль.
5. Поясніть механізм дії ферментів та охарактеризуйте основні етапи ферментативної реакції.
6. Розкрийте особливості кінетики ферментативної реакції.
7. Розтлумачте такі поняття, як юніт, катал, питома активність ферменту.
8. Назвіть види специфічності ферментів.
9. Порівняйте вплив чинників (температури, pH середовища) на кінетику та швидкість ферментативної реакції. Що являють собою активатори й інгібітори ферментів. Назвіть види інгібування.
10. Охарактеризуйте номенклатуру ферментів.
11. Охарактеризуйте оксидоредуктази, трансферази, гідролази, ліази, ізомерази, лігази (синтетази) як класи ферментів.

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Схематично зобразіть будову ферменту. Позначте розташування активного (субстратного (адсорбційного), каталітичного) й алостеричного центрів ферменту. Вкажіть роль кожного центру.
2. Напишіть приклади назв основних класів ферментів: оксидоредуктази, трансферази, гідролази, ліази, ізомерази, лігази (синтетази).
3. Складіть таблицю «Основні галузі застосування ферментів».

Лабораторна робота № 4
ЗАГАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Мета роботи: засвоїти загальні властивості ферментів у ході виконання дослідів.

Практичне значення роботи: вивчення властивостей ферментів необхідне для вибору оптимальних умов дії ферментів або визначення їх активності в наукових або клінічних дослідженнях, а також для проведення фармакологічного аналізу ферментативних препаратів.

Матеріали і реактиви: штатив для пробірок, пробірки, автоматичні піпетки, крапельниці, фарфорова ступка з товкачиком, термостат, водяна баня з термометром, сірники, спиртівка, скляні палички, годинникове або предметне скло, чашка Петрі; лід, розчин амілази слини, дистильована вода, 1%-й розчин крохмалю, реактив Люголя (1%-й розчин йоду в калій йодиді), варена й сира картопля, 3%-й розчин H_2O_2, 5%-й розчин сахарози або 2%-й розчин сахарози, препарат сахарази (гідролізат дріжджів), 0,4%-й розчин натрій гідроксиду, 0,4%-й розчин хлоридної кислоти, 1%-й розчин натрій хлориду, 1%-й розчин купрум (II) сульфату, реактив Фелінга (реактив Фелінга I та реактив Фелінга II).

Хід роботи

Дослід 1. Дія амілази.

Принцип методу. Амілаза є ферментом, який каталізує гідроліз α-глюкозидного зв'язку α-1-4-крохмалю до проміжних продуктів – декстринів. Крохмаль утворює з йодом сполуку *синього* кольору, амілодекстрин – *фіолетового*, еритродекстрин – *червоно-бурого*, ахродекстрин – *жовтого*.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 2 мл 1%-го розчину крохмалю, в одну із пробірок додають 2 мл розчину амілази слини; вміст пробірки добре перемішують. Обидві пробірки із зануреними в них скляними паличками одночасно поміщають у водяну баню при температурі 40 ^{0}С. Через 4 хв із кожної пробірки за допомогою скляної палички відбирають по краплі рідини, змішують їх окремо з краплею реактиву Люголя, заздалегідь нанесеною на годинникове або предметне скло. Повторюють взяття проб через 6 хв та l0 хв.

Забарвлення з йодом проб із пробірки, що містить **слину**, змінюється від *синього* до *синьо-фіолетового, буро-червоного, червоного* і, зрештою, – *жовтого.*

До вмісту пробірки з розчином амілазою слини додають реактив Фелінга (реактив Фелінга I та реактив Фелінг II – по 0,5 мл відповідно) і нагрівають до кипіння. Утворюється червоний осад купрум (I) оксиду.

Дослід 2. Дія каталази.

Принцип методу. Каталаза прискорює реакцію розщеплення гідроген пероксиду на H_2O та O_2:

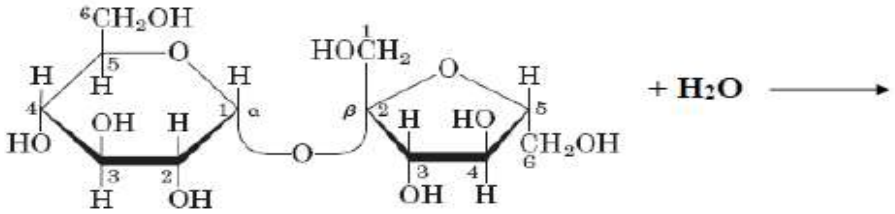
$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

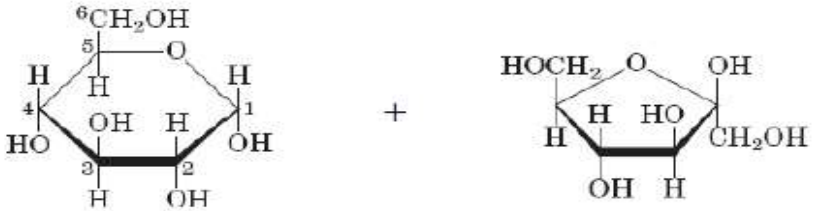
Хід роботи. Розрізати сиру та варену картоплю, додати на зрізи по 2 краплі розчину H_2O_2.

На зрізі сирої картоплі внаслідок утворення молекулярного кисню утворюється велика кількість бульбашок. На вареній картоплі бульбашки газу не спостерігатимуться.

Дослід 3. Дія сахарази.

Принцип методу. Сахараза каталізує гідроліз сахарози до глюкози та фруктози.





Моносахариди, які утворюються, визначають реакцією Фелінга. Сахароза не містить вільної альдегідної групи й тому не має відновних властивостей.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 1 мл препарату сахарази (гідролізат дріжджів). Вміст однієї з них (контроль) кип'ятять протягом 3 хв, після чого в обидві охолоджені пробірки додають по 3 мл 5%-го розчину сахарози або 2%-го розчину сахарози, добре перемішують і ставлять у термостат (або у водяну баню) при температурі 38 ^{0}С. Через 15 хв у пробірки вносять реактив Фелінга (реактив Фелінг I та реактив Фелінг II по 0,5 мл відповідно), перемішують і нагрівають до кипіння.

У контрольній пробірці осаду немає, а в пробірці з активним ферментом сахаразаю (дослід) утворюється *червоний осад купрум (I) оксиду*.

Дослід 4. Термолабільність ферментів. Вплив температури на активність амілази слини.

Принцип методу. Швидкість розщеплення крохмалю під дією амілази залежить від температури й визначається за інтенсивністю забарвлення розчину крохмалю чи продуктів його перетворення з йодом.

Хід роботи. У чотири пробірки наливають по 5 мл 1%-го розчину крохмалю. Пробірку 1 залишають при кімнатній температурі, пробірку 2 поміщають у термостат при температурі 40 ^{0}С, пробірку 3 – у киплячу водяну баню, а пробірку 4 − ставлять у лід.

Через 15 хв у всі пробірки за тих самих умов додають по 1 мл розчину амілази слини та перемішують скляною паличкою. За гідролізом крохмалю спостерігають за реакцією з краплею реактиву Люголя, заздалегідь нанесеною на годинникове або предметне скло через 1, 2, 4, 6, 8, 10 та 12 хвилин.

У пробірці 1 при кімнатній температурі спостерігається *червоне* чи *фіолетово-червоне забарвлення*, у пробірці 2 при оптимальній температурі (40 ^{0}C) – *жовте забарвлення*, у пробірці 3 (100 ^{0}C) та пробірці 4 (лід) – *синє забарвлення*.

Дослід 5. Вплив pH середовища на активність амілази слини.

Принцип методу. Для амілази слини оптимальне значення при pH = 6,8. У дуже кислому й сильнолужному середовищі активність амілази знижується.

Хід роботи. У 1-у, 2-у та 3-ю пробірки додати по 0,5 мл 1,0%-го розчину крохмалю, 0,5 мл розчину амілази слини; в 1-у пробірку − 1,0 мл 0,4%-го розчину натрій гідроксиду, в 2-у пробірку – 1,0 мл 0,4%-го розчину хлоридної кислоти, в 3-ю пробірку – 1,0 мл води. Нагрівають у термостаті при t = 38 ^{0}C (або на водяній бані). Через 15 хв у кожну пробірку додають по 3 краплі реактиву Люголя.

У 1-й пробірці спостерігається *жовте забарвлення*, у 2-й і 3-й пробірках − *фіолетове забарвлення.*

Дослід 6. Дія активаторів та інгібіторів на активність амілази слини.

Принцип методу. Активатором амілази є натрій хлорид, а інгібітором – купрум (II) сульфат. Вплив цих речовин на активність амілази визначають за ступенем гідролізу крохмалю під впливом ферменту за наявності натрій хлориду та купрум (II) сульфату.

Хід роботи. В 1-у пробірку наливають 1,5 мл води, в 2-у пробірку – 1 мл води та 0,5 мл розчину NaCl, у 3-ю пробірку – 1 мл води та 0,5 мл розчину купрум (II) сульфату. В усі пробірки додають по 1,5 мл розчину амілази слини, перемішують, вносять по 1,5 мл 1%-го розчину крохмалю, знову перемішують і ставлять у термостат при температурі 38 ^{0}C (або у водяну баню). Через 5 хв додають по 5 крапель 1%-го розчину реактиву Люголя.

У 1-й пробірці спостерігається *фіолетове* або *червоне забарвлення*, у 2-й пробірці – *прозора рідина* або *жовте забарвлення*, у 3-й пробірці – *синє забарвлення.*

Дослід 7. Специфічність дії амілази та сахарази.

Принцип методу. Амілаза розщеплює полісахарид крохмаль і не діє на дисахариди (мальтозу чи сахарозу). Сахараза розщеплює тільки сахарозу й не розщеплює крохмаль та інші дисахариди.

Хід роботи. В 1-у та 2-у пробірки наливають по 1 мл 1%-го розчину крохмалю. У 1-у пробірку додають 1 мл розчину амілази слини, в 2-у пробірку – 1 мл препарату сахарази (гідролізат дріжджів), потім вміст

пробірок перемішують і поміщають їх у термостат при температури 38 ^{0}С (або у водяну баню).

У 3-ю та 4-у пробірки наливають по 1 мл 5%-го розчину сахарози або 2%-го розчину сахарози. У 3-ю пробірку додають 1 мл препарату сахарази (гідролізат дріжджів), а 4-у пробірку – 1 мл розчину амілази слини й залишають за тих самих умов.

Через 5 хв у 1-у та 2-у пробірки додають по 5 крапель реактиву Люголя та спостерігають за забарвленням.

У 3-ю та 4-у пробірки додають реактив Фелінга (реактив Фелінга І та реактив Фелінга ІІ по 0,5 мл відповідно) та нагрівають до кипіння.

У 1-й пробірці з розчином амілазою слини синє забарвлення розчину зникає внаслідок розщеплення крохмалю амілазою та спостерігається *прозора рідина* або *жовте забарвлення*. У 2-й пробірці розчин набуває *синього забарвлення*.

Сахароза відновних властивостей не має, тому в пробірці, де під впливом сахарази (гідролізату дріжджів) 5%-й розчин сахарози або 2%-й розчин сахарози розщепився на глюкозу та фруктозу, відзначається *червоне забарвлення*, утворюється червоний осад купрум (І) оксиду.

Результати дослідів 1-7 внесіть у таблицю 5 за аналогією:

Таблиця 5 − Загальні властивості ферментів

<table>
<tr><td colspan="6">Дослід 1. Дія амілази</td></tr>
<tr><td>№ пробірки</td><td>Субстрат</td><td>Фермент</td><td>Умови</td><td>Час</td><td>Спостереження із реактивом Люголя</td></tr>
<tr><td rowspan="3">1</td><td rowspan="3">1%-й розчин крохмалю</td><td rowspan="3">Вода</td><td rowspan="6">Водяна баня, 40 ^{0}С</td><td>4 хв</td><td></td></tr>
<tr><td>6 хв</td><td></td></tr>
<tr><td>10 хв</td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="3">2</td><td rowspan="3">1%-й розчин крохмалю</td><td rowspan="3">Розчин амілази слини</td><td>4 хв</td><td></td></tr>
<tr><td>6 хв</td><td></td></tr>
<tr><td>10 хв</td><td></td></tr>
<tr><td>№ пробірки</td><td colspan="2">Реактив</td><td colspan="2">Умови</td><td>Спостереження із реактивом Фелінга</td></tr>
<tr><td>2</td><td colspan="2">Фелінга</td><td colspan="2">Після кипіння, 10 хв</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="6">Дослід 2. Дія каталази</td></tr>
<tr><td colspan="2">Картопля</td><td>Реактив</td><td colspan="3">Спостереження із H_2O_2</td></tr>
<tr><td colspan="2">Сира</td><td>H_2O_2</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td colspan="2">Варена</td><td>H_2O_2</td><td colspan="3"></td></tr>
</table>

Дослід 3. Дія сахарази					
	Фермент	Субстрат	Умови	Реактив	Спостереження із реактивом Фелінга
К	Сахараза кип'ячена (кип'ячений гідролізат дріжджів)	5%-й розчин сахарози або 2%-й розчин сахарози	Термостат 38 ^{0}C, 15 хв	Фелінга	
Д	Сахараза (гідролізат дріжджів)	5%-й розчин сахарози або 2%-й розчин сахарози		Фелінга	

Дослід 4. Термолабільність ферментів					
№	Субстрат	Фермент	Умови	Час	Спостереження із реактивом Люголя
1	1%-й розчин крохмалю	Розчин амілази слини	Кімнатна температура	1 хв	
				2 хв	
				4 хв	
				6 хв	
				8 хв	
				10 хв	
				12 хв	
2			Термостат 40 ^{0}C	1 хв	
				2 хв	
				4 хв	
				6 хв	
				8 хв	
				10 хв	
				12 хв	
3			Кипляча водяна баня 100 ^{0}C	1 хв	
				2 хв	
				4 хв	
				6 хв	
				8 хв	
				10 хв	
				12 хв	
4			Лід	1 хв	
				2 хв	
				4 хв	
				6 хв	
				8 хв	
				10 хв	
				12 хв	

Дослід 5. Вплив pH середовища на активність амілази слини				
№	Субстрат / Фермент	Реактив	Умови	Спостереження із реактивом Люголя
1	1%-й розчин крохмалю / розчин амілази слини	NaOH	Термостат 38 ^{0}C, 15 хв	
2		HCl		
3		вода		

Дослід 6. Дія активаторів та інгібіторів на активність амілази слини				
№	Субстрат / Фермент	Реактив	Умови	Спостереження із реактивом Люголя
1	1%-й розчин крохмалю / розчин амілази слини	вода	Термостат 38 ^{0}C, 5 хв	
2		NaCl		
3		$CuSO_4$		

Дослід 7. Специфічність дії амілази та сахарази					
№	Субстрат	Фермент	Умови	Спостереження	
				Із реактивом Люголя	Із реактивом Фелінга
1	1%-й розчин крохмалю	розчин амілази слини	Термостат 38 ^{0}C, 5 хв		
2	1%-й розчин крохмалю	сахараза (гідролізат дріжджів)			
3	5%-й розчин сахарози або 2%-й розчин сахарози	сахараза (гідролізат дріжджів)			
4	5%-й розчин сахарози або 2%-й розчин сахарози	розчин амілази слини			

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

ТЕМА 5. ПЕРЕТРАВЛЕННЯ БІЛКІВ ТА ЇХ ОБМІН

Послідовність **перетравлення білків**:

− у ротовій порожнині відбувається механічна обробка білків; немає протеїназ;

− у шлунку при pH = 1,5-2,0 гідрогенхлоридна кислота активує пепсин, пригнічує гнильні процеси; пепсин розщеплює приблизно 20 % пептидних зв'язків, залишаються високомолекулярні пептиди й небагато вільних амінокислот;

− у тонкому кишечнику при pH = 7,0-8,7 гідрогенхлоридна кислота взаємодіє з натрій гідрогенкарбонатом, у результаті чого утворюється натрій хлорид і гідрогенкарбонатна кислота; діють ферменти протеїнази: трипсин, хімотрипсин, карбоксипептидази панкреатичного соку, аміно- та дипептидази кишкового соку; трипсин розщеплює приблизно 30 % пептидних зв'язків, у результаті чого утворюються низькомолекулярні пептиди, дипептиди та вільні амінокислоти; хімотрипсин розщеплює приблизно 50 % пептидних зв'язків, у результаті чого залишається небагато пептидів, дипептидів та вільні амінокислоти; карбокси-, аміно- та дипептидази розщеплюють інші пептидні зв'язки;

− у товстому кишечнику діють аеробні та анаеробні мікроорганізми, найпростіші та ферменти бактеріального походження; відбувається «гниття» розщепленого білка, тобто гідроліз білка, декарбоксилювання, дезамінування та переамінування. Кінцеві продукти гниття отруйні, вони мають неприємний запах (фенол, крезол, індол, скатол та ін.). Частина цих речовин інактивується в печінці за участю специфічних ферментів.

Харчові амінокислоти, які утворюються при перетравленні білків із кров'ю, транспортуються до різних органів і тканин, де використовуються для синтезу білків. Наприклад, в організмі дорослої людини щодоби синтезується 1,3 г білка на 1 кг ваги (в середньому 90-100 г). Харчові амінокислоти становлять лише 1/4 частину. Це свідчить про те, що в тканинах організму білки піддаються постійному оновленню.

Різні білки оновлюються з різною швидкістю (наприклад, активність інсуліну становить 20-30 хв, білків слизової кишечника − 2-4 доби, гемоглобіну − 100-120 діб, колагену − 6-8 місяців).

Молекули білків піддаються дії тканинних пептидогідролаз і руйнуються до вільних амінокислот за схемою: білок → високомолекулярні поліпептиди → низькомолекулярні поліпептиди → амінокислоти, які всмоктуються в кров і транспортуються до всіх клітин тканин. Білковий обмін координує та інтегрує більшість хімічних перетворень в організмі.

Процеси обміну білків в людському організмі регулюються за участю певних гормонів. Наприклад, соматропін підсилює синтетичні процеси білка;

тироксин підвищує швидкість біосинтезу білків; інсулін забезпечує домінування синтезу білків над їх розкладом; адреналін підвищує швидкість розщеплення білків у тканинах і виділення нітрогенвмісних продуктів обміну із сечею; кортизон гальмує синтез білків, посилює їх розклад і виділення нітрогенвмісних продуктів обміну із сечею; тестостерон стимулює біосинтез білка в м'язовій тканині, зумовлюючи накопичення в організмі нітрогену.

До кетогенних амінокислот належать: Лей, Ліз.

До глюкогенних амінокислот належать: Глі, Ала, Вал, Сер, Тре, Про, Цис, Асп, Глу, Мет, Арг, Гіс.

У результаті обміну білків частина амінокислот піддається розкладу, тобто відбувається дезамінування або переамінування.

При розкладі амінокислот утворюються три кінцеві продукти – H_2O, CO_2, NH_3. H_2O і CO_2 безпечні для клітин та організму, а NH_3 має токсичну дію (у людини і тварин він уражає нервову систему).

В організмі є декілька шляхів знешкодження амоніаку:

1) синтез сечовини (орнітиновий цикл) – основний шлях знешкодження NH_3 у присутності амінокислоти – орнітину;

2) синтез амідів аспарагінової та глутамінової кислот – додатковий шлях знешкодження NH_3; особливо активний у нервовій та м'язовій тканинах, а також у нирках;

3) утворення амонійних солей – у тканинах нирок NH_3 з органічними та неорганічними кислотами утворює нейтральні й кислі солі, що виділяються із сечовиною.

Таким чином, продуктами розкладу білків та амінокислот є небілкові нітрогенвмісні сполуки: сечовина, деякі амінокислоти та солі амонію.

? Питання для самоконтролю

1. Як відбувається перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті? Поясніть дію протеолітичних ферментів, їх специфічність. Що зумовлює активацію ферментів?
2. Охарактеризуйте загальні шляхи розкладання амінокислот в організмі: дезамінування, декарбоксилювання, переамінування. Наведіть приклади реакцій.
3. Розкрийте сутність орнітинового циклу. Укажіть послідовність процесів циклу сечовини. Які ферменти беруть у ньому участь?
4. Назвіть шляхи перенесення амоніаку в печінку та нирки з периферичних тканин і м'язів. Поясніть, яким чином відбувається виведення амінного азоту з організму.
5. Надайте класифікацію живих організмів за виведенням амінного азоту.

6. Поясніть практичне значення визначення активності ферментів лікарських засобів, одержаних із підшлункової залози та слизової кишечника (трипсин, хімотрипсин, панкреатин, фестал та ін.).

7. Розкрийте механізм визначення концентрації сечовини в сироватці крові діацетилмонооксимним методом. Обґрунтуйте його практичне значення.

8. Як проводиться розрахунок концентрації сечовини? Якою має бути концентрація сечовини в нормі? Що включає в себе контроль якості?

✍ Завдання для домашнього виконання

Складіть на окремому аркуші *схему метаболізму білків*, що включає: перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті; реакції загальних шляхів розкладу амінокислот в організмі; реакції утворення амоніаку; реакції орнітинового циклу; глюкогенні та кетогенні амінокислоти.

Лабораторна робота № 5

ПЕРЕТРАВЛЕННЯ БІЛКІВ У ШЛУНКОВО-КИШКОВОМУ ТРАКТІ

Мета роботи: провести дослідження процесу перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті на моделі *in vitro*.

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

Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, термостат; шматочок вареного курячого яйця, 0,4%-й розчин натрію карбонату, дистильована вода, 0,1 моль/л розчину гідрогенхлоридної кислоти, 0,1%-й розчин трипсину або розчин панкреатину, біуретовий реактив.

Хід роботи

Беруть три пробірки й наливають до *першої* пробірки 2 мл 0,4%-го розчину натрій карбонату, до *другої* пробірки – воду, до *третьої* пробірки – розчин гідрогенхлоридної кислоти (0,1 моль/л). У 1-у та 3-ю пробірки додають по 1 мл 0,1%-го розчину трипсину (або розчину панкреатину) і в 2-у пробірку – 1 мл розчину трипсину (або розчину панкреатину), попередньо прокип’яченого.

Перемішують проби струшуванням.

У кожну пробірку поміщають по однаковому шматочку вареного курячого яйця та ставлять їх у термостат при температурі 38 ^{0}С на 10 хв, спостерігаючи за розчиненням білка.

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

Потім вміст пробірок зливають в інші пробірки та виконують біуретову реакцію.

Результати досліду запишіть у таблицю 6 за аналогією:

Таблиця 6 − Перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті

№ з/п	Реактиви, які використовуються	Зміни, що відбуваються з денатурованим білком у ході інкубації	Зміни, що відбуваються під час біуретової реакції	Висновок
1	2	3		5
1	1) 2 мл 0,4%-го розчину натрій карбонату; 2) 1 мл 0,1%-го розчину трипсину (або панкреатину); струшують. 3) шматочок вареного курячого яйця; термостат при температурі 38 ^{0}C на 10 хв	Розщеплення білка	Забарвлення відсутнє	Під час дії трипсину (або панкреатину) на шматочок вареного курячого яйця в лужному середовищі відбувається процес руйнування пептидних зв'язків; біуретова реакція негативна

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

Лабораторна робота № 6
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 діагностичною метою є вміст сечовини в крові та сечі.

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

Матеріали та реактиви: сироватка крові; реагент діацетилмонооксиму, реагент тіосемікарбазиду, калібрувальний розчин сечовини (16,65±0,832 ммоль/л), розчин трихлороцтової кислоти, сульфатна кислота, дистильована вода, фізіологічний розчин (0,9%-й розчин натрій хлориду).

Приготування робочих розчинів.

Розчин діацетилмонооксиму. В мірну колбу на 100 мл переносять вміст 1 ампули реагенту діацетилмонооксиму, об'єм доводять до позначки дистильованою водою. Розчин стійкий при температурі від 0 ^{0}C до +25 ^{0}C протягом 2 місяців.

Розчин сульфатної кислоти. В мірну колбу на 200 мл наливають 60-80 мл дистильованої води і додають при перемішуванні вміст флакона із сульфатною кислотою. Після охолодження об'єм розчину доводять до позначки дистильованою водою. Розчин стійкий.

Розчин тіосемікарбазиду. В мірну колбу на 100 мл переносять вміст 1 ампули реагенту тіосемікарбазиду й доводять розчином сульфатної кислоти до позначки. Розчин стійкий при температурі від 0 ^{0}C до +25 ^{0}C протягом 2 місяців.

Калібрувальний розчин сечовини – готовий до роботи.

Розчин трихлороцтової кислоти. В мірну колбу на 50 мл переносять 50%-й розчин трихлороцтової кислоти і доводять його при перемішуванні до позначки дистильованою водою. Розчин стійкий.

Хід роботи

Аналіз проводиться згідно зі схемою, поданою в таблиці 7.

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

Окремо пробірки холостої (контрольної), калібрувальної та дослідної проб закривають ковпачком (або накривають алюмінієвою фольгою), перемішують вміст і одночасно поміщають у бурхливо киплячу водяну баню на 10 хв. Потім пробірки швидко охолоджують під струменем проточної води.

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

Забарвлення стабільне протягом 15 хвилин.

Розрахунок концентрації сечовини (С, ммоль/л) проводять 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 одержаних результатів контролюють за допомогою атестованих контрольних сироваток «Ліонорм» (Чехія).

У нормі концентрація сечовини в сироватці венозної крові становить 3,53-8,3 ммоль/л.

Таблиця 7 – Робоча схема проведення досліду з визначення концентрації сечовини в біологічних рідинах діацетилмонооксимним методом

Фізіологічний розчин (мл)	Калібрувальний розчин сечовини (мл)	Матеріал, що аналізується (мл)	Розчин тіосемікарбазиду (мл)	Розчин діацетил моноксиму (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 має коливатися від трьох до десяти відповідно до достовірності результатів; мінімум 1, 2, 3.

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

ТЕМА 6. БУДОВА, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗНАЧЕННЯ ВУГЛЕВОДІВ

Вуглеводи – група природних органічних сполук, які складаються з Карбону, Гідрогену та Оксигену. Загальна формула вуглеводів – $C_n(H_2O)_m$.

Вуглеводи класифікують на **моносахариди, олігосахариди (дисахариди)** та **полісахариди.**

Моносахариди містять гідроксильні групи, альдегідну або кетонну групу, тобто належать до альдегідоспиртів і кетоспиртів.

Розрізняють моносахариди:

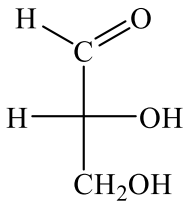
1) за кількістю атомів Карбону в молекулі: триози (C_3); тетрози (C_4); пентози (C_5): рибоза, дезоксирибоза, арабіноза, ксилоза; гексози (C_6): маноза, галактоза, глюкоза, фруктоза; гептози (C_7): седогептулоза;

2) за хімічною природою: альдози та кетози.

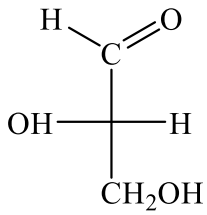
Наприклад, найпростіша альдолаза (гліцероальдегід) містить один хіральний центр та має два різних оптичних ізомери − D-ряд та L-ряд (рис. 30).

У живих організмах моносахариди наявні в основному в D-конфігурації, яку називають природною. Виключення становить L-арабіноза бактерій, L-рамноза та L-сорбоза рослин.

Найбільше значення мають пентози (рис. 31 а, б), гексози (рис. 31 в, г), які можуть зустрічатися у вигляді лінійних структур (структури Фішера) та циклічних структур (структури Хеуорса) (рис. 32 а, б, в, г).



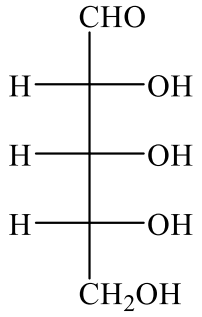
а



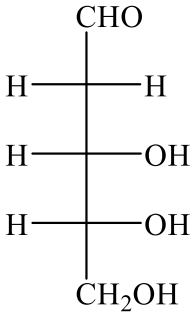
б

Рисунок 30 − а − D-гліцероальдегід; б − L-гліцероальдегід

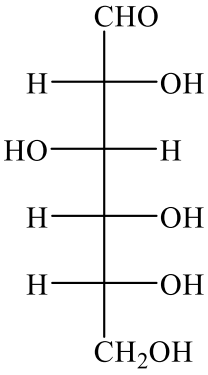
Рибоза та дезоксирибоза є компонентами нуклеотидів і нуклеїнових кислот. Глюкоза – кінцевий продукт гідролізу більшості дисахаридів і полісахаридів. Фруктоза входить до складу дисахариду сахарози (тростинного цукру).



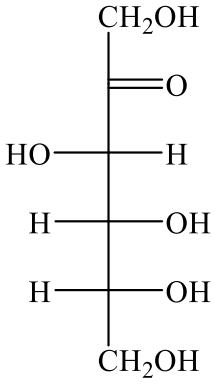
а



б

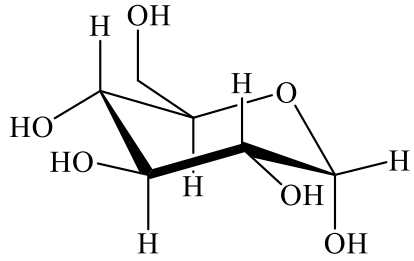


в

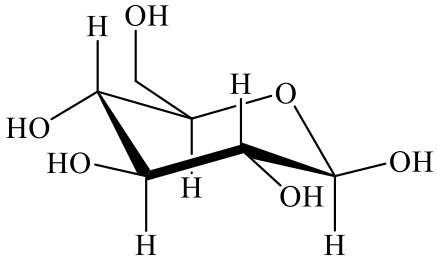


г

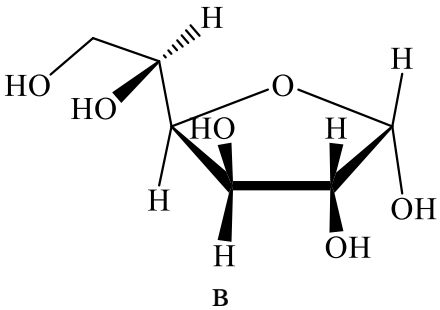
Рисунок 31 − Лінійні структури моносахаридів (структури Фішера):
а − D-рибоза; б − D-дезоксирибоза; в − D-глюкоза; г − D-фруктоза



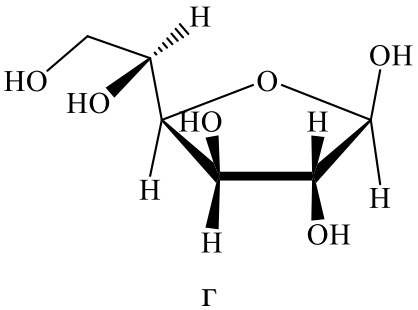
а



б



в



г

Рисунок 32 − Циклічні структури моносахаридів: глюкози (структури Хеуорса):
а − α,D-глюкозопіраноза; б − β,D-глюкопіраноза,
в − α, D-глюкозофураноза; г − β,D-глюкофураноза

Будь-який моносахарид із конкретними фізичними властивостями (температура плавлення, розчинність) характеризується специфічною величиною питомого обертання $[\alpha]_D^{20}$. Величина питомого обертання при розчиненні будь-якого моносахариду поступово змінюється і лише при тривалому стоянні розчину досягає певного значення. Наприклад, для свіжоприготовленого розчину глюкози $[\alpha]_D^{20} = +112{,}2^0$ ця величина досягає рівноважного значення $[\alpha]_D^{20} = +52{,}5^0$. Зміна величини питомого обертання при стоянні (у часі) розчинів моносахаридів називається **мутаротацією**.

Усі природні моносахариди завдяки наявності в їх молекулі асиметричних атомів Карбону оптично активні; тому у водних розчинах обертають площину поляризованого променя. При наявності вільних альдегідних і кетонних груп вони мають сильні відновлювальні властивості. Вуглеводи можуть також піддаватися різним видам бродіння (спиртове, молочнокисле, маслянокисле, лимоннокисле) під впливом ферментів мікроорганізмів.

Загальна формула дисахаридів − $C_{12}H_{22}O_{11}$. Дисахариди утворюються з двох молекул моносахаридів при взаємодії або глікозидного гідроксилу однієї гексози та спиртового гідроксилу іншої (мальтоза, лактоза, целобіоза), або двох глікозидних гідроксилів (сахароза) з виділенням молекули води (рис. 33).

Сполучення молекул гексоз у дисахаридах відбувається за рахунок глікозидних зв'язків. Мальтоза володіє відновлювальними властивостями, оскільки має вільну гідроксильну групу; сахароза не володіє відновлювальними властивостями, бо не має вільної гідроксильної групи.

а б

Рисунок 33 − Дисахариди: а − мальтоза; б − сахароза

Найпоширенішим природним дисахаридом є сахароза. При кислотному або ферментативному гідролізі дисахариди розкладаються на моносахариди.

Наприклад:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

сахароза глюкоза фруктоза

Моносахариди та дисахариди – кристалічні речовини, мають солодкий смак (глюкоза, фруктоза, мальтоза, сахароза), без кольору й запаху. Вони легко розчиняються у воді, погано – у спирті, не розчиняються в діетиловому етері.

Полісахариди мають загальну формулу $(C_6H_{10}O_5)_n$. Складаються із сотні або тисячі залишків моносахаридів.

Найпоширенішими полісахаридами є **крохмаль, глікоген** (розгалужені ланцюги), **целюлоза** (лінійні ланцюги) (рис. 34).

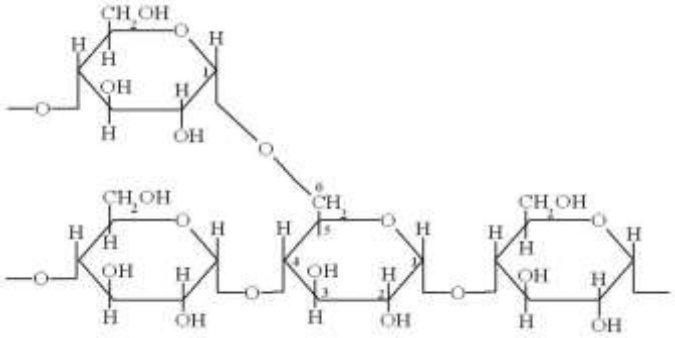


Рисунок 34 − Фрагмент структури полісахариду − крохмалю

Полісахариди, побудовані із залишків моносахаридів одного типу, називаються **гомополісахаридами (гомогліканами)** (крохмаль, глікоген, целюлоза побудовані із залишків глюкози).

Полісахариди, побудовані із залишків моносахаридів різних типів, називаються **гетерополісахаридами (гетерогліканами)** (хітин, гепарин, гіалуронова кислота, хондроітинсульфат).

Полісахариди погано розчиняються у воді (крохмаль, глікоген) або й зовсім не розчиняються у воді (целюлоза). Полісахариди не володіють відновлювальними властивостями.

Вуглеводи відіграють важливу роль у життєдіяльності організму.

Основні функції вуглеводів в організмі: енергетична, структурна, захисна, гемостатична, антикоагулянтна, гомеостатична, опорна, механічна, осморегуляторна, знешкоджувальна.

? Питання для самоконтролю

1. Надайте загальну характеристику вуглеводів. Наведіть класифікацію вуглеводів. Розкрийте функції вуглеводів.

2. Надайте характеристику та наведіть основні формули моносахаридів: рибоза, дезоксирибоза, арабіноза, ксилоза, глюкоза, фруктоза. Охарактеризуйте оксикарбонільні (лінійні структури Фішера) та циклічні (структури Хеуорса) форми моносахаридів.

3. Поясніть особливості таутомерії та мутаротації вуглеводів.

4. Назвіть фізичні та хімічні властивості моносахаридів.

5. Охарактеризуйте дисахариди: мальтоза, сахароза. Розкрийте особливості їх будови, фізичні та хімічні властивості.

6. Охарактеризуйте полісахариди: крохмаль, целюлоза, хітин, гепарин. Розкрийте особливості їх будови, фізичні та хімічні властивості.

7. Поясніть, як проводяться якісні реакції на глюкозу, фруктозу, крохмаль.

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Розтлумачте значення таких термінів, як таутомерія та мутаротація вуглеводів (на прикладі глюкози).

2. Чому мальтоза володіє відновлювальними властивостями, а сахароза не володіє? Напишіть формули цих дисахаридів.

3. Розкрийте функції вуглеводів (функція та приклад вуглеводу).

Лабораторна робота № 7
РЕАКЦІЇ З МОНОСАХАРИДАМИ, ДИСАХАРИДАМИ ТА ПОЛІСАХАРИДАМИ

Мета роботи: вивчити властивості моносахаридів, дисахаридів, полісахаридів.

Практичне значення роботи: за допомогою якісних реакцій можна визначити наявність вуглеводів у пробах (моносахаридів, дисахаридів, полісахаридів).

Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, водяна баня; дистильована вода, автоматичні піпетки, сірники, спиртівка; 5%-й розчин глюкози, 5%-й розчин фруктози, 5%-й розчин сахарози, 1%-й розчин крохмалю, реактив Фелінга I, II (складається з розчинів купрум (II) сульфату, натрій гідроксиду, сегнетової солі), кристалічний резорцин, концентрована гідрогенхлоридна кислота, амонійний розчин аргентум гідроксиду, реактив Люголя (1%-й розчин йоду в калій йодиді).

Хід роботи

Дослід 1. Відновлення купрум (II) гідроксиду глюкозою – реакція Фелінга.

Принцип реакції. Всі моносахариди, а також більш складні цукри, які мають вільну альдегідну або кетонну групу, здатні відновлювати метали в лужному середовищі. Метали при цьому відновлюються з окисної форми в закисну чи навіть до вільного стану.

$$1)\ CH_2OH(CHOH)_4COH + 2CuSO_4 + 5NaOH \rightarrow$$
$$\rightarrow CH_2OH(CHOH)_4CONa + 2CuOH + 2Na_2SO_4 + 2H_2O$$
$$2)\ 2CuOH \rightarrow Cu_2O\downarrow + H_2O$$

Хід роботи. У пробірку до 1 мл 5%-го розчину глюкози доливають рівний об’єм реактиву Фелінга (по 1 мл реактиву Фелінга I та Фелінга II). Суміш нагрівають до кипіння. Утворюється *червоно-бурий осад* купрум (I) оксиду (Cu_2O).

Дослід 2. Відновлення аргентум гідроксиду глюкозою – реакція «срібного дзеркала».

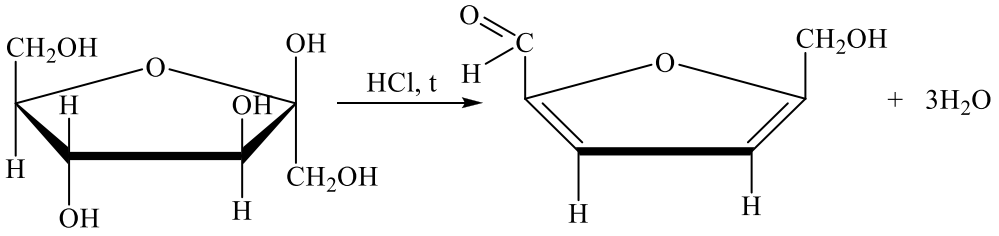
Принцип реакції. Глюкоза відновлює амонійний розчин аргентум гідроксиду, що утворений при взаємодії аргентум нітрату з натрій гідроксидом та водним розчином амоніаку, до металевого аргентуму.

$$1)\ AgNO_3 + 3NH_4OH \rightarrow [Ag(NH_3)_2]OH + NH_4NO_3 + 2H_2O$$
$$2)\ CH_2OH(CHOH)_4COH + 2[Ag(NH_3)_2]OH \rightarrow$$
$$CH_2OH(CHOH)_4COONH_4 + 2Ag\downarrow + 3NH_3 + H_2O$$

Хід роботи. У пробірку до 4 крапель 5%-го розчину глюкози додають 4 краплі амонійного розчину аргентум нітрату та нагрівають. Спостерігають випадіння металічного срібла на стінках пробірки у вигляді блискучого дзеркального нальоту.

Дослід 3. Реакція Селіванова на фруктозу.

Принцип реакції. При нагріванні розчину фруктози із хлоридною кислотою утворюється оксиметилфурфурол. Оскиметилфурфурол із резорцином утворює сполуку (продукт конденсації), забарвлену у *вишнево-червоний колір.*



Хід роботи. У пробірку поміщають декілька кристаликів резорцину, додають 2 краплі концентрованої гідрогенхлоридної кислоти, 2 краплі 5%-го розчину фруктози та нагрівають до кипіння. Рідина набуває *вишнево-червоного забарвлення*.

Дослід 4. Реакція сахарози з реактивом Фелінга.

Принцип реакції. У молекулі сахарози зв'язок між залишками α,D-глюкози і β,D-фруктози утворюється за рахунок двох глікозидних гідроксилів. Сахароза не володіє відновлювальними властивостями. Спостерігається негативна реакція.

Хід роботи. У пробірку до 1 мл 5%-го розчину сахарози доливають рівний об'єм реактиву Фелінга (1 мл реактиву Фелінга I та 1 мл реактиву Фелінга II). Суміш нагрівають до кипіння. Вона залишається інтенсивного *синього кольору*.

Дослід 5. Реакція сахарози з амонійним розчином арґентум гідроксиду.

Принцип реакції. У молекулі сахарози зв'язок між залишками α,D-глюкози і β,D-фруктози утворюється за рахунок двох глікозидних гідроксилів. Сахароза не відновлює амонійній розчин арґентум нітрату. Спостерігається негативна реакція.

Хід роботи. У пробірку до 4 крапель 5%-го розчину сахарози додають 4 краплі амонійного розчину аргентум гідроксиду та нагрівають. Суміш залишається прозорою.

Дослід 6. Гідроліз сахарози.

Принцип реакції. Під час гідролізу сахарози (кип'ятіння у присутності концентрованої сульфатної кислоти) утворюються моносахариди, які можна виявити за допомогою реакцій Фелінга та Селіванова.

Хід роботи. У пробірку додають 1 мл 5%-го розчину сахарози, 2 краплі концентрованої гідрогенхлоридної кислоти та нагрівають на киплячій водяній бані протягом 15 хвилин. Потім суміш розподіляють на 2 частини: з однією проводять реакцію Фелінга, а з іншою – реакцію Селіванова.

Дослід 7. Якісна реакція на крохмаль.

Принцип реакції. При взаємодії розчину крохмалю з реактивом Люголя утворюється комплексна сполука, забарвлена в реакції з крохмалем у синій колір. При нагріванні забарвлення зникає, але з'являється знову при охолодженні, що свідчить про утворення нестійкого комплексу з крохмалем.

Хід роботи. У пробірку до 1 мл 1%-го розчину крохмалю додають 1-2 краплі реактиву Люголя. Розчин крохмалю набуває *синього забарвлення.*

Дослід 8. Реакція крохмалю з реактивом Фелінга.

Принцип реакції. Полісахариди не містять вільних редуційованих груп. Спостерігається негативна реакція.

Хід роботи. У пробірку вносять 1 мл крохмального клейстеру та доливають рівний об'єм реактиву Фелінга (по 1 мл реактивів Фелінга I та Фелінга II). Суміш нагрівають до кипіння. Вона залишається інтенсивного *синього кольору*.

Дослід 9. Кислотний гідроліз крохмалю.

Принцип реакції. При нагріванні розчину крохмалю з мінеральними кислотами відбувається гідроліз крохмалю з утворенням глюкози.

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл 1%-го розчину крохмалю та додають 2-3 краплі концентрованої гідрогенхлоридної кислоти. Кип'ятять на водяній бані протягом 15-45 хвилин.

Щоб визначити, чи відбувся гідроліз крохмалю, відбирають 3-5 крапель розчину й додають краплю реактиву Люголя. *Якщо розчин не набуває синього забарвлення, то гідроліз завершений.* Потім відбирають у пробірку 1-2 мл гідролізату та проводять з ним реакцію Фелінга.

Результати дослідів 1-9 внесіть у таблицю 8 за аналогією:

Таблиця 8 − Реакції з моносахаридами, дисахаридами та полісахаридами

№ з/п	Назва досліду	Реактиви, які використовуються	Зміни, що відбуваються під час реакції	Висновок
1	2	3	4	5
1	Відновлення купрум (II) гідроксиду глюкозою – реакція Фелінга	1) 1 мл 5%-го розчину глюкози; 2) реактив Фелінга. Суміш нагрівають до кипіння.	Червоний осад	Якісна реакція на глюкозу. Глюкоза володіє відновлювальними властивостями

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

ТЕМА 7. ПЕРЕТРАВЛЕННЯ ВУГЛЕВОДІВ ТА ЇХ ОБМІН

Обмін вуглеводів − це взаємопов'язані процеси надходження в організм вуглеводів, ферментативного розщеплення, взаємоперетворення, катаболічних або анаболічних реакцій внутрішньоклітинного метаболізму.

Процес перетворення вуглеводів починається з їх перетравлення.

Перетравлення вуглеводів відбувається в такій послідовності:

− у ротовій порожнині при pH = 6,8-7,0 амілаза активна (відбувається гідроліз крохмалю до декстринів і мальтози);

− у шлунку при pH = 1,5-2,5 амілаза неактивна (жодних руйнувань зв'язків у структурах вуглеводів не відбувається);

− у тонкому кишечнику при pH = 7,0-8,7 панкреатична амілаза, мальтоза, лактаза, сахараза активні (відбувається гідроліз декстринів, дисахаридів до моносахаридів: глюкози, галактози, фруктози).

У травному каналі людини немає ферментів, що розщеплюють β-гликозидні зв'язки клітковини, тому вона належить до компонентів їжі, які не перетравлюються.

Вуглеводи всмоктуються через кишкову стінку й надходять у кров. Всмоктування моносахаридів відбувається шляхом активного симпорту чи спряженого транспорту при одночасному перенесенні в тому ж напрямку іонів Na^+. Різні моносахариди відрізняються швидкістю всмоктування.

Таким чином, у кров надходить лише глюкоза, яка з потоком крові потрапляє передусім у печінку, а потім – до решти органів і тканин.

Шляхи використання глюкози в організмі: підтримання постійного рівня глюкози в крові; окиснення глюкози (дихотомічний і апотомічний шляхи); синтез глікогену; синтез жиру.

Підтримання постійного рівня глюкози в крові відбувається за участю центральної нервової системи і деяких ендокринних залоз. У людини в нормі вміст цукру в капілярній крові коливається в межах 3,33-5,55 ммоль/л.

При мінімальному значенні глюкози в крові рефлекторно збуджуються метаболічні центри гіпоталамуса, і сигнал через гіпофіз надходить до підшлункової залози та надниркових залоз. Ці залози виробляють, відповідно, гормони **глюкагон** і **адреналін**, що сприяють розщепленню глікогену до глюкози, яка надходить у кров; рівень цукру підвищується.

Глікоген розщеплюється з кінця, що не редукує, під дією фосфорилази. Оскільки глікоген є сильно розгалуженим полісахаридом, то і глюкози виділяється велика кількість.

При максимальному значенні глюкози в крові за такою ж схемою (через метаболічні центри гіпоталамуса) підшлункова залоза секретує **інсулін**. Клітини всіх органів і тканин мають чутливі до інсуліну рецептори.

Синтез і **розпад глікогену** − процеси, що регулюють як вміст глюкози в крові, так і резерв вуглеводів у клітинах.

Гліколіз (лат. *glycolysis,* грец. *glykys* − солодкий + *lysis* − розпад, розкладання) − складний багатоступеневий процес, під час якого молекула глюкози в послідовних ферментативних реакціях розщеплюється до двох молекул піровиноградної кислоти.

Значна частина енергії, що вивільняється з молекули глюкози, витрачається на утворення 4-х молекул АТФ; дві молекули АТФ використовуються для компенсації витрат на активацію гексоз.

Якщо гліколітичному розщепленню підлягає глікоген, тоді цей процес називається **глікогенолізом.**

Реакції гліколізу відбуваються в усіх тканинах організму. У скелетних м'язах процеси гліколізу та глікогенолізу виражені однаковою мірою, а в головному мозку та серцевому м'язі переважає гліколіз.

Гліколіз та глікогеноліз починаються з утворення глюкозо-6-фосфату. При гліколізі глюкозо-6-фосфат утворюється внаслідок фосфорилювання глюкози (витрачається одна молекула АТФ). При глікогенолізі відбувається фосфороліз глікогену за участю фосфату неорганічного з утворенням глюкозо-1-фосфату, який далі ізомеризується в глюкозо-6-фосфат.

Подальші перетворення глюкозо-6-фосфату відбуваються однаково як при гліколізі, так і при глікогенолізі.

Гліколіз − центральний шлях катаболізму глюкози у різних організмів та у клітинах різного типу. Продукт гліколізу − піровиноградна кислота.

В аеробних умовах гліколіз являє собою першу стадію повного розщеплення глюкози до CO_2 та води. В анаеробних умовах піровиноградна кислота відновлюється до молочної кислоти.

Основне **значення гліколізу** − забезпечення організму енергією в умовах недостатнього постачання кисню. За рахунок гліколізу забезпечується близько 90% енергетичних потреб еритроцитів. Проміжний метаболіт гліколізу − 1,3-дифосфогліцерат. Печінка, нирки й серцевий м'яз у нормі утилізують молочну кислоту, але в умовах гіпоксії здатні її утворювати.

Цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса) є аеробним процесом, що відбувається в мітохондріях за участю молекули кисню. Субстратом є ацетил-КоА, що утворюється при декарбоксилюванні піровиноградної кислоти.

Пентозофосфатний шлях – послідовність ферментативних реакцій окиснення глюкозо-6-фосфату до CO_2 і H_2O, що відбувається у цитоплазмі живих клітин і супроводжується утворенням відновленого коферменту – НАДФ·Н.

Загальне рівняння пентозофосфатного шляху:

$$6 \text{ глюкозо-6-фосфат} + 12 \text{ НАДФ} =$$
$$6 \text{ CO}_2 + 12 \text{ НАДФ·Н} + 12 \text{ H}^+ + 5 \text{ глюкозо-6-фосфат} + \text{H}_3\text{PO}_4.$$

? Питання для самоконтролю

1. Як відбувається перетравлення вуглеводів у шлунково-кишковому тракті в присутності ферментів?

2. Розкрийте сутність гліколізу: реакції, ферменти. Які енергетичні ефекти супроводжують перебіг окиснення?

3. Охарактеризуйте цикл Кребса: реакції, ферменти. Назвіть енергетичні ефекти.

4. Що собою являє ланцюг перенесення електронів? Поясніть роль флавінових ферментів, убіхінонів, цитохромів і цитохромоксидази у передачі електронів.

5. Розкрийте сутність синтезу та розщеплення глікогену: реакції, ферменти.

6. Що являє собою глюконеогенез? Які реакції він в себе включає та за участю яких ферментів відбувається?

7. Поясніть біологічне значення пентозофосфатного шляху окиснення вуглеводів.

8. Охарактеризуйте нервову й ендокринну регуляцію вуглеводного обміну.

9. Наведіть порядок визначення молочної кислоти в біологічному матеріалі.

10. Поясніть практичне значення та наведіть порядок визначення концентрації глюкози в сироватці крові глюкозооксидазним методом.

11. Як проводиться розрахунок концентрації глюкози? Якою має бути концентрація глюкози в нормі? Що включає в себе контроль якості?

✍ Завдання для домашнього виконання

Складіть *схему метаболізму вуглеводів* на окремому аркуші, що включає: перетравлення вуглеводів у шлунково-кишковому тракті; реакції синтезу й розщеплення глікогену (глікогеноліз); реакції гліколізу; реакції циклу Кребса; дихальний ланцюг; гліконеогенез; пентозофосфатний цикл (тільки загальне значення, без реакцій).

Лабораторна робота № 8
ВИЗНАЧЕННЯ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ В БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ

Мета роботи: навчитися виявляти молочну кислоту в м’язовій тканині.

Практичне значення роботи: у ході лабораторного дослідження виявляють у м’язовій тканині молочну кислоту, що утворюється під час гліколізу.

Матеріали та реактиви: чашка Петрі, ножиці, фарфорова ступка, марля, електроплитка, фільтрувальний папір, штатив для пробірок, пробірки, піпетки; м’язова тканина; 1%-й розчин фенолу, 1%-й розчин ферум (III) хлориду, 0,5%-й розчин молочної кислоти, дистильована вода.

Хід роботи

Подрібнюють 2-3 г м’язової тканини у чашці Петрі ножицями та поміщають у фарфорову ступку, де розтирають з 5-6 мл дистильованої води.

Отриману м’язову кашицю фільтрують через два шари марлі. Фільтрат кип’ятять протягом 1 хв і знову фільтрують.

У три пробірки, які містять по 5 мл 1%-го розчину фенолу, по краплях додають 1%-й розчин Ферум (III) хлориду до появи *інтенсивного фіолетового забарвлення*.

До вмісту *першої* пробірки приливають 1 мл 5%-го розчину молочної кислоти, *другої* пробірки – 1 мл витяжки з м'язової тканини, *третьої* пробірки – 1 мл води. Вміст усіх 3-х пробірок добре перемішують.

Результати досліду внесіть у таблицю 9 за аналогією:

Таблиця 9 − Визначення молочної кислоти в біологічному матеріалі

Вміст пробірки	Кількість, мл		
	1-а пробірка	2-а пробірка	3-я пробірка
Розчин фенолу	5 мл	5 мл	5 мл
Розчин $FeCl_3$	5 крапель	5 крапель	5 крапель
Забарвлення (1)			
Розчин молочної кислоти	1 мл	–	–
Витяжка з м'язової тканини	–	1 мл	–
Дистильована вода	–	–	1 мл
Забарвлення (2)			

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

Лабораторна робота № 9
ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГЛЮКОЗИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНИМ МЕТОДОМ

Мета роботи: навчитися визначати концентрацію глюкози в біологічних рідинах глюкозооксидазним методом.

Практичне значення роботи: найчастіше показником вуглеводного обміну з діагностичною метою є вміст глюкози в крові та сечі. Підвищення рівня глюкози досить часто відзначається при цукровому діабеті, пухлинах кори надниркових залоз, гіперфункції щитовидної залози, захворюваннях печінки, ураженнях ЦНС.

Матеріали та реактиви: сироватка (концентрація глюкози стабільна протягом 24 год при температурі від +2 ^{0}C до +8 ^{0}C за умови, що сироватку або плазму приготовлено не пізніше ніж через 30 хв після забору крові; якщо вміст глюкози в сироватці крові або плазмі перевищує 27,7 ммоль/л, її необхідно розбавити фізіологічним розчином у співвідношенні 1:5 та повторити дослід); штатив для пробірок, біохімічні пробірки; ензими (розчин): пероксидаза, β,D-глюкооксидаза, 4-амінофеназон, стабілізатори, активатори, буферний розчин (фосфатний буфер – pH = 7,2-7,4), фенол, калібрувальний розчин глюкози (10±0,5 ммоль/л), фізіологічний розчин (0,9%-й розчин натрій хлориду).

Приготування робочих розчинів.

Для варіанта аналізу з використанням біреагенту всі розчини готові до роботи та стабільні до закінчення гарантійного терміну придатності (при дотриманні умов зберігання – температура від +2 ^{0}C до +16 ^{0}C).

Калібрувальний розчин глюкози розбавляють у 10 разів (0,1 мл калібрувального розчину глюкози − 10 ммоль/л − змішують із 0,9 мл фізіологічного розчину).

Хід роботи

Аналіз проводиться згідно зі схемою, поданою в таблиці 10.

Таблиця 10 − Робоча схема проведення досліду із визначення концентрації глюкози в біологічних рідинах глюкозооксидазним методом

Буферний розчин (мл)	Ензими (мл)	Фізіологічний розчин (мл)	Розбавлений калібрувальний розчин глюкози (мл)	Матеріал, що аналізується (мл)	Показники оптичної щільності	
					Е калібрувальної проби	Е дослідної проби
Холоста проба (контрольна проба)						
2,00	2,00	0,04	–	–	–	–
Калібрувальна проба						
2,00	2,00	–	0,4	–		–
Дослідна проба (1, 2, 3, … 10)*						
2,00	2,00	–	–	0,04	–	

Примітка. * − кількість дослідних проб має коливатися від трьох до десяти відповідно до достовірності результатів; мінімум 1, 2, 3.

Принцип методу: глюкоза в присутності глюкозооксидази окиснюється киснем повітря до глюконової кислоти й гідроген пероксиду, який у присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хініноміну *червоно-фіолетового кольору*, що визначається фотометрично при довжині хвилі 540 нм.

Окремо пробірки холостої (контрольної), калібрувальної та дослідної проб змішати, витримати протягом 20 хв при кімнатній температурі від +18 ^{0}C до +25 ^{0}C або протягом 12 хв при температурі +37 ^{0}C.

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

Розрахунок концентрації глюкози (С, ммоль/л) проводять за формулою:

$$C = 10{,}0 \cdot E \text{ дослідної проби} / E \text{ калібрувальної проби},$$

де 10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині (ммоль/л);

Е дослідної проби – оптична щільність дослідної проби;

Е калібрувальної проби – оптична щільність калібрувальної проби.

Контроль якості.

Достовірність отриманих результатів контролюють за допомогою атестованих контрольних сироваток «Ліонорм» (Чехія).

У нормі вміст глюкози в сироватці венозної крові становить 4,1-6,11 ммоль/л.

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

ТЕМА 8. БУДОВА, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗНАЧЕННЯ ЛІПІДІВ

Ліпіди – органічні речовини, які нерозчинні у воді, але розчинні в органічних розчинниках: спиртах, етерах, естерах, ацетоні, хлороформі.

Ліпіди за особливостями будови розподіляються на 3 класи:

1) **Прості ліпіди** – складні ефіри вищих жирних кислот із трьохатомним або вищим одноатомним спиртом – ацилгліцероли (триацилгліцероли, діацилгліцеоли, моноацилгліцероли) (нейтральні жири); воски (рис. 35 а, б).

Воски – складні ефіри вищої жирної кислоти з вищим одноатомним спиртом (наприклад, бджолиний віск, віск на поверхні овочів і фруктів, спермацет, ланолін).

Вища жирна кислота − кислота, яка має більше 4-х атомів Карбону в молекулі (R-COOH).

У триацигліцеролів, восків переважають вищі жирні кислоти, що містять 16 атомів Карбону та більше.

До вищих жирних кислот належать:

− пальмітинова кислота − $C_{15}H_{31}COOH$ (C16:0);

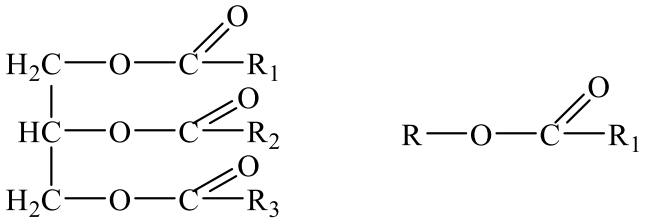
− стеаринова кислота − $C_{17}H_{35}COOH$ (C18:0);

− олеїнова кислота − $C_{17}H_{33}COOH$ (C18:1, C_{9-10});

− лінолева кислота − $C_{17}H_{31}COOH$ (C18:2, C_{9-10}, C_{12-13});

− ліноленова кислота − $C_{17}H_{29}COOH$ (C18:3, C_{9-10}, C_{12-13}, C_{15-16});

− арахідонова кислота − $C_{19}H_{31}COOH$ (C20:4, C_{5-6}, C_{8-9}, C_{12-13}, C_{15-16}).



а б

Рисунок 35 − Особливості будови триацилгліцеролу (а) та воску (б);
де R_1, R_2, R_3 – залишки вищих жирних кислот, R − залишок вищого одноатомного спирту

Для вищих жирних кислот характерний числовий код. Наприклад: для пальмітинової кислоти характерний такий числовий код, як C16:0, де 16 означає загальну кількість атомів Карбону, 0 − відсутність подвійних

зв’язків у структурі вищої жирної кислоти; для олеїнової кислоти характерний такий числовий код, як С18:1, $C_{9\text{-}10}$, де 18 означає загальну кількість атомів Карбону, 1 – кількість подвійних зв’язків, $C_{9\text{-}10}$ − місце розташування подвійного зв’язку.

За особливостями будови вищі жирні кислоти розподіляються на:

− **насичені** (немає подвійних зв’язків − пальмітинова, стеаринова);

− **ненасичені** (є подвійні зв’язки – олеїнова, лінолева, ліноленова, арахідонова).

Подвійні зв’язки в ненасичених вищих жирних кислотах мають цис-конфігурацію.

Якщо до складу триацилгліцеролу входять залишки насичених вищих жирних кислот, триацигліцероли будуть **твердими** (наприклад, тваринні жири − тверді речовини; виняток – риб’ячий жир, який є рідким).

Якщо до складу триацигліцеролу входить залишки ненасичених вищих жирних кислот, триацигліцероли будуть рідкими (наприклад, рослинні жири (олії) – це рідини (соняшникова, оливка, облепіхова); виняток – кокосова олія, яка є твердою).

Нейтральні жири під впливом кислот, лугів, ферментів (ліпаз) підлягають гідролізу з утворенням трьохатомного спирту − гліцеролу та вищих жирних кислот.

Продуктами лужного гідролізу жирів є солі вищих жирних кислот – мила (**процес омилення**). Солі лужних металів розчинні у воді. Солі лужноземельних і важких металів – нерозчинні у воді.

2) **Складні ліпіди** – складні ефіри вищих жирних кислот із трьохатомним спиртом, які додатково мають й інші групи:

а) фосфоліпіди – мають трьохатомний спирт, вищі жирні кислоти, залишок фосфатної кислоти, азотисті основи. До них належать холінфосфатиди (лецитини), етаноламінфосфатиди (кефаліни) і серинфосфатиди.

Фосфатиди містяться переважно у біологічних мембранах; їх багато в серці, печінці та в нервовій тканині людини та тварин, у насінні рослин, яйцях птахів.

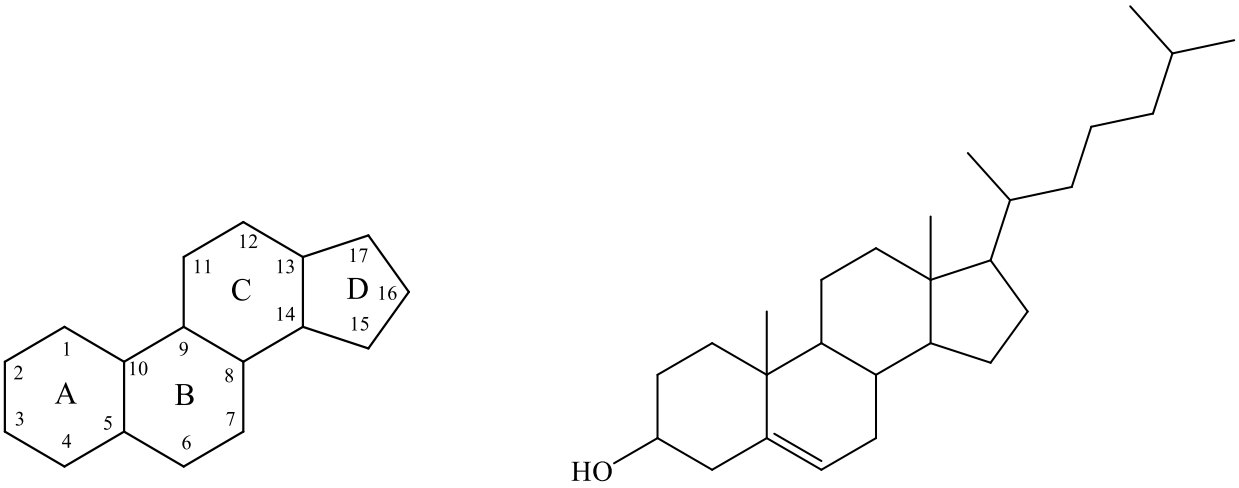
б) гліколіпіди – мають спиртсфінгозин, вищі жирні кислоти, вуглеводний компонент (цереброзиди, гангліозиди). До складу цереброзидів входить галактоза, а до складу гангліозидів – складний олігосахарид.

На гліколіпіди особливо багатий мозок та інші нервові тканини. Гліколіпіди є важливими компонентами плазматичних мембран, головним чином мієлінових оболонок нервових клітин і клітин крові.

3) **Ліпоїди:**

а) стероли (стерини) та стероїди.

Стероли − сполуки, що мають у своїй структурі ядро − циклопентанпергідрофенантрен (рис. 36 а), бічний ланцюг із 8-10 атомів Карбону і одну гідроксильну групу в 3-му положенні.



а б

Рисунок 36 − Структура циклопентанпергідрофенантрену (а), структура холестеролу (б)

Головним представником стеролів в організмі тварин і людини є холестерол (рис. 36 б). Він має ОН-групу в 3-му положенні, один подвійний зв'язок ($C_{5\text{-}6}$), тобто є циклічним одноатомним ненасиченим спиртом.

В організмі людини міститься близько 140 г холестеролу, у вільному вигляді та у вигляді ефірів холестеролу із жирними кислотами (холестеридів).

Холестерол входить до складу плазматичних мембран, а також мембран мітохондрій, до складу ендоплазматичної сітки, але в значно меншій кількості. Холестерол міститься в крові, жовчі. У рослинах виявлені інші стероли – фітостероли, стероїдні глікозиди (сапоніни).

Стериди − сполуки, що мають в своїй структурі ядро − циклопентанпергідрофенантрен та містять бічний ланцюг із 8-10 атомів Карбону та в 3-му положенні − залишок вищої жирної кислоти (рис. 37). Із вищих жирних кислот до складу стероїдів входять переважно пальмітинова, стеаринова, олеїнова кислоти.

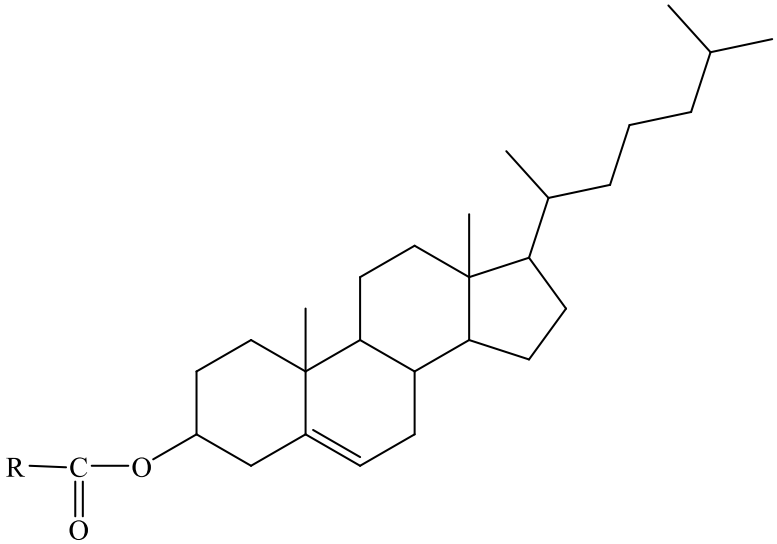


Рисунок 37 − Структура стероїду (де R − залишок вищої жирної кислоти)

До стероїдів належать такі біологічно активні речовини, як гормони наднирників (наприклад, кортизол, кортикостерон, альдостерон), статеві гормони (андрогени, естрогени), жовчні кислоти, вітамін D.

б) каротиноїди; терпеноїди. Містять у своєму складі карбоновий скелет ізопрену (наприклад, вітамін А, каротиноїди, сквален, ланостерин (обидві сполуки є попередниками при біосинтезі холестеролу), жиророзчинні вітаміни Е та К (ізопреноїди), гормони тваринних тканин – простагландини. Терпени входять до складу хлоропластів рослин.

Ліпіди є головними формами акумуляції енергії. Фосфоліпіди, стероли входять до складу біологічних мембран; інші ліпіди виконують роль кофакторів ферментів, переносників електронів, гормонів, емульгувальних агентів. Триацилгліцероли забезпечують запас енергії в організмах, вони також є ізолюючим матеріалом, що захищає організм від переохолодження. Більшість продуктів харчування містять триацилгліцероли. Воски є джерелом енергії, що запасається, та водонепроникним покриттям.

? Питання для самоконтролю

1. Охарактеризуйте класифікацію ліпідів.
2. Поясніть особливості будови складових компонентів ліпідів: спирти; насичені, ненасичені вищі жирні кислоти.
3. Поясніть особливості будови простих (триацигліцеролів, восків) та складних (фосфоліпідів) ліпідів, стеролів, стеридів.
4. Розкрийте основні функції ліпідів.

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Розпишіть формули насичених (пальмітинової, стеаринової) та ненасичених (олеїнової, лінолевої, ліноленової, арахідонової) вищих жирних кислот. Укажіть числовий код цих кислот.
2. Напишіть формулу триацигліцеролу, що містить у своєму складі залишки двох пальмітинових та однієї стеаринової кислоти; триацилгліцеролу, що містить у своєму складі залишки різних ненасичених вищих жирних кислот. Надайте їм назви (наприклад, якщо триацигліцерол містить три залишки стеаринової кислоти, його назва − тристеарат).

Лабораторна робота № 10
РЕАКЦІЇ НА ЖИРИ ТА ЖИРОПОДІБНІ РЕЧОВИНИ

Мета роботи: засвоїти у ході виконання дослідів властивості простих ліпідів, стеролів, складових компонентів ліпідів і жироподібних речовин.

Практичне значення роботи: за допомогою якісних реакцій у біологічних рідинах визначають продукти розщеплення ліпідів.

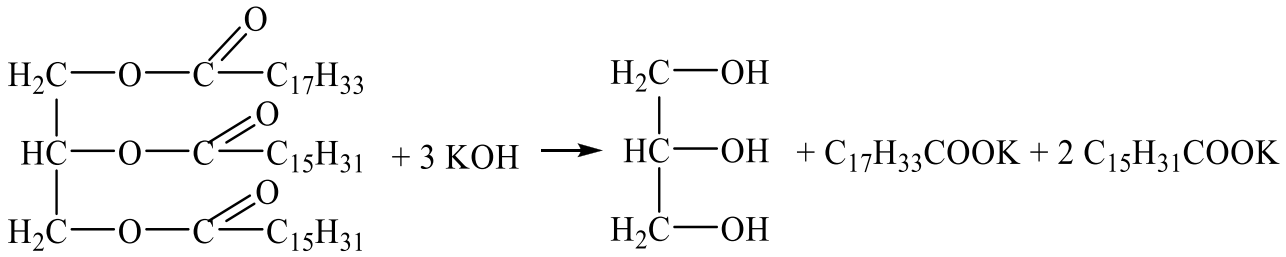
Матеріали та реактиви: пробірки, колба об’ємом 50 мл, піпетки, сірники, водяна баня, спиртівка; дистильована вода, рослинна олія, 50%-й спиртовий розчин калій гідроксиду, концентрована хлоридна кислота, 5%-й розчин барій хлориду, 5%-й розчин плюмбум ацетату, кристалики калій

гідросульфату, гліцерол, хлороформний розчин холестеролу, концентрована сульфатна кислота.

Хід роботи

Дослід 1. Омилення жиру (проводиться попередньо)!!!

Принцип реакції. Жири під впливом лугів гідролізуються з утворенням гліцеролу та калієвого мила.



олеїнодипальмітат гліцерол калієве мило

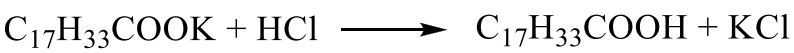
Хід роботи. У колбу об'ємом 50 мл до 1 мл рослинної олії додають 20 мл 50% спиртового розчину калій гідроксиду, суміш перемішують і кип'ятять.

Для того щоб перевірити, чи відбувся гідроліз, відбирають у пробірку декілька крапель розчину та додають 1 мл дистильованої води. При наявності жирових крапель гідроліз продовжують.

Після омилення розчин доводять до об'єму 20 мл дистильованою водою; одержують розчин калієвого мила.

Дослід 2. Одержання вільних жирних кислот.

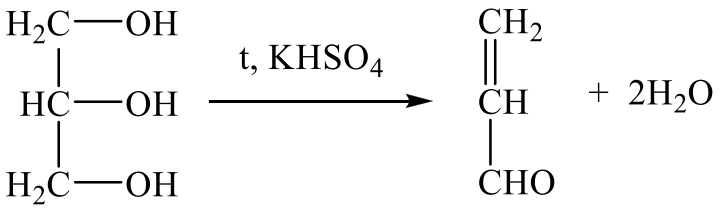
Принцип реакції. При додаванні до калієвого мила концентрованої хлоридної кислоти утворюються вільні вищі жирні кислоти.



Хід роботи: У пробірку до 1 мл розчину калієвого мила додають 0,5 мл концентрованої хлоридної кислоти. Вища жирна кислота збирається на поверхні.

Дослід 3. Якісна реакція на гліцерол (акролеїнова реакція).

Принцип реакції. При нагріванні гліцеролу з калій гідросульфатом відбувається дегідратація, у результаті якої гліцерол перетворюється на акролеїн – ненасичений альдегід етилового ряду зі специфічним запахом.



гліцерол акролеїн

Хід роботи. На дно 2-х пробірок поміщають декілька кристаликів калій гідросульфату, потім в 1-у пробірку вносять 5 крапель розчину калієвого мила, отриманого в 1-му досліді, а в 2-у пробірку – 5 крапель гліцеролу.

Нагрівають дві пробірки в полум'ї пальника. Утворення акролеїну визначають за характерним запахом альдегіду в 2-ій пробірці – *запах горілого сала*.

Дослід 4. Одержання нерозчинних мил.

Принцип реакції. При додаванні до розчину калієвого мила розчину солей барію та плюмбуму утворюються нерозчинні солі вищих жирних кислот (нерозчинні мила).

$$2\ C_{17}H_{33}COOK + BaCl_2 \longrightarrow (C_{17}H_{33}COO)_2Ba\downarrow + 2\ KCl$$

калієве мило — барієве мило

$$2\ C_{17}H_{33}COOK + (CH_3COO)_2Pb \longrightarrow (C_{17}H_{33}COO)_2Pb\downarrow + 2\ CH_3COOH$$

калієве мило — свинцеве мило

Хід роботи. У дві пробірки додають 1 мл розчину калієвого мила та вносять відповідно по 1 мл 5 %-го розчину барій хлориду та 5%-го розчину плюмбум ацетату. Спостерігають утворення нерозчинних мил у вигляді осаду.

Дослід 5. Якісна реакція на холестерол (реакція Сальковського).

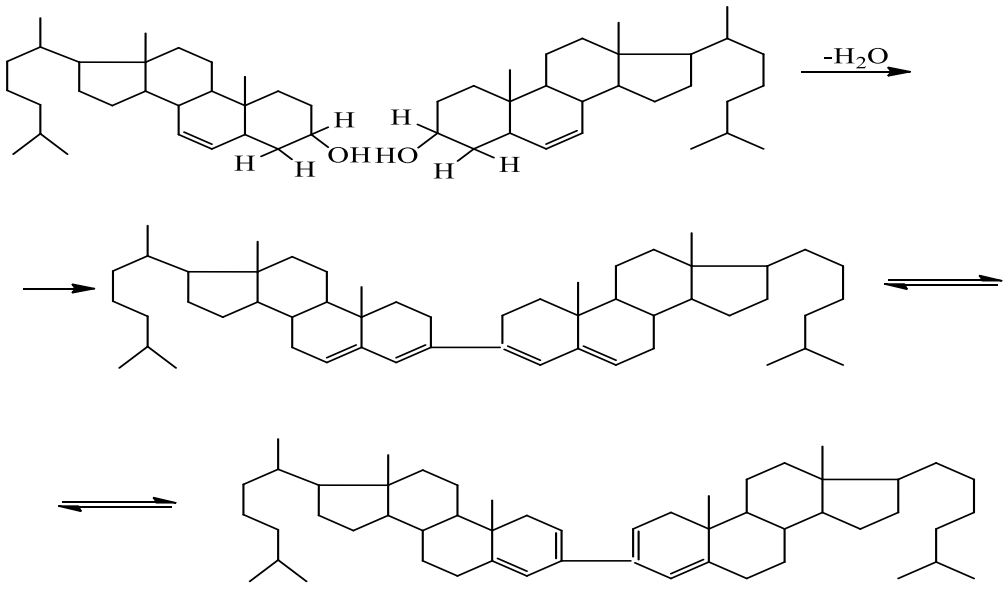
Принцип реакції. Реакції якісного виявлення холестеролу ґрунтуються на його здатності перетворюватися із вторинного спирту на ненасичений вуглеводень.

Розчин холестеролу у хлороформі дає з оцтовим ангідридом і концентрованою сульфатною кислотою червоне забарвлення, яке переходить потім у синє та зелене. У присутності сульфатної кислоти відбувається дегідратація та окиснення холестеролу. В результаті дві молекули холестеролу, які втрачають дві молекули води, з'єднуються між собою біля третього атома Карбону. Ненасичені вуглеводні, які утворилися, зі спряженими подвійними зв'язками дають різні похідні із сульфатною кислотою та оцтовим ангідридом.

Хід роботи. У пробірку вносять 0,5 мл розчину холестеролу у хлороформі, додають 0,5 мл концентрованої сульфатної кислоти й обережно струшують.

Після розшарування фаз спостерігають зміну забарвлення: верхній шар, який містить холестерол у хлороформі, забарвлюється в *пурпурово-червоний колір,* а нижній (шар сульфатної кислоти) – у *темно-червоний колір* із зеленою флуоресценцією.

Забарвлення згодом переходить у *фіолетове*, потім – у *зелене* і, зрештою, – у *жовте*.



дихолестадієн

Результати дослідів 1-5 внесіть у таблицю 12 за аналогією:

Таблиця 12 − Реакції на жири та жироподібні речовини

№ з/п	Назва досліду	Реактиви, які використо-вуються	Зміни, що відбуваються під час реакції	Висновок
1	2	3	4	5
1	Омилення жиру (проводиться попередньо)	1) 1 мл рослинної олії; 2) 20 мл 50%-го спиртового розчину калій гідроксиду. Суміш перемішують і кип’ятять.	Прозорий розчин	Утворення калієвого розчину (лужний гідроліз)

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

ТЕМА 9. ПЕРЕТРАВЛЕННЯ ЛІПІДІВ ТА ЇХ ОБМІН

Ліпіди – гідрофобні сполуки, а ліполітичні ферменти – гідрофільні. Тому для перетравлення ліпідів вони передусім мають перейти в розчинну у воді форму – емульсію.

Емульгування відбувається за участю поверхнево-активних речовин, роль яких виконують жовчні кислоти та солі таурину і гліцину.

У результаті одна крапля жиру розкладається на 10-12 маленьких крапель. При цьому поверхня розподілу зростає в 10000 разів. Пропорційно пришвидшується гідроліз ліпідів.

До **ліполітичних ферментів** належать:

1) ліпаза (панкреатична й кишкова);

2) холестеролестераза (панкреатична);

3) фосфатази A_1, A_2, C та D (панкреатичні).

Ферменти продукуються в неактивній формі, а активуються в основному жовчними кислотами. Під дією цих ферментів при гідролізі ліпідів утворюється суміш різних продуктів: 2-моногліцерид, гліцерол та вищі жирні кислоти. У дорослих людей цей процес відбувається в тонкому кишечнику.

Шляхи всмоктування продуктів гідролізу ліпідів у тонкому кишечнику:

1) **пряма дифузія** (гліцерол, нижчі жирні кислоти до C_{12}, H_3PO_4, нітрогенвмісні сполуки);

2) **у комплексі із жовчними кислотами** (моноацилгліцероли, діацилгліцероли, холестерол, вищі жирні кислоти, фосфоліпіди).

Перетравлення ліпідів відбувається в такій послідовності:

− у ротовій порожнині в дітей віком до 1 року язична ліпаза активна, молочний жир емульгований, початок гідролізу ліпідів; у дорослих немає ліпаз, жир неемульгований, відбувається тільки механічна обробка ліпідів;

− у шлунку дітей віком до 1 року при pH = 5 ліпаза активна, молочний жир емульгований, відбувається гідроліз молочного жиру до гліцеролу та жирних кислот; у дорослих при pH = 1,5-2,5 ліпаза неактивна, жир неемульгований (окрім молочного), ліпіди проходять крізь шлунок практично без змін;

− у тонкому кишечнику при pH = 7,0-8,7 ліпаза активується жовчними кислотами, кишковою коліпазою та іонами Ca^{2+}, також відбувається емульгування жирів жовчними кислотами; гідроліз триацилгліцеролів: 50-70% − до моногліцеролів, 40% − до гліцеролу та вищих жирних кислот, 3-10% не гідролізується.

В епітеліальних клітинах кишечника із комплексів продуктів, що підлягають всмоктуванню, вивільняються жовчні кислоти й потрапляють у кров. Із кров'ю вони транспортуються до печінки, потім − до жовчного міхура і знову потрапляють у кишечник. Тобто виникає печінково-кишковий цикл, в якому 3-5 г жовчних кислот за добу проходять 5-10 обертів, сприяючи перетравленню 80-100 г жирів. Близько 0,5 г жовчних кислот за добу руйнується, їх поновлення відбувається кожні 10 діб. Із комплексів моноацилгліцеролів і вищих жирних кислот, що залишилися в епітеліальних клітинах кишечника, вони знову синтезуються в ліпіди (1-й ресинтез жиру, в результаті якого відбувається синтез специфічних для організму людини ліпідів).

Ресинтезовані жири транспортуються кров'ю тільки в розчинній у воді формі (у вигляді ліпопротеїдів: хіломікрони (ХМ), ліпопротеїди дуже низької щільності (ЛПДНЩ), ліпопротеїди низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїди високої щільності (ЛПВЩ)).

Продукти гідролізу ліпідів, що всмоктуються, можуть використовуватися по-різному.

Клітини жирової тканини позначаються терміном *«адипоцити»*. Гідроліз жирів у них називають *ліполізом,* або *мобілізацією жирів*.

Активність ліпази регулюється шляхом фосфорилювання-дефосфорилювання під впливом гормонів – соматропіну, тироксину, інсуліну, адреналіну, кортикостероїдів.

Під дією ліпази жирової тканин із триацигліцеролів утворюються гліцерол і вищі жирні кислоти, що піддаються подальшому окисненню.

Під час повного окиснення гліцеролу (у формі α-гліцерофосфату або 3-фосфогліцеролу) утворюється CO_2 та H_2O. Реакція протікає по шляху вуглеводів на другому етапі гліколізу.

Вільні жирні кислоти метаболічно інертні та можуть перетворюватися тільки після активації. Цей процес протікає в цитоплазмі клітин з утворенням проміжного продукту – ациладенілату (реакція активування вищої жирної кислоти за рахунок АТФ); потім утворюється активна жирна кислота.

Активація вищих жирних кислот протікає в цитоплазмі, а окиснення – в мітохондріях. Транспорт вищих жирних кислот із цитоплазми в мітохондрію відбувається під впливом ферменту карнітинацилтрансферази, що вбудований у внутрішню мембрану мітохондрії. Якщо вища жирна кислота потрапляє в мітохондрію, то вона обов'язково піддається β-окисненню (циклічний процес, цикл Кноопа-Лінена).

До кожного циклу входять чотири реакції:

1) дегідрування (фермент ацил-КоА-дегідрогеназа ФАД-залежна);

2) гідратація (фермент β-еноїл-КоА-гідратаза);

3) дегідрування (фермент β-оксіацил-КоА-дегідрогеназа НАД-залежна);

4) тіолазна реакція (фермент ацилтрансфераза).

Наприклад, при окисненні вищої жирної кислоти з парною кількістю атомів Карбону (пальмітинової кислоти) утворюється вісім молекул ацетил-КоА за 7 циклів, карбоновий ланцюг вищої жирної кислоти скорочується на два атоми Карбону під час одного циклу. Виділяється енергія у вигляді АТФ.

Можливі два шляхи біосинтезу ліпідів: моногліцеридний (локалізований у слизовій кишечника); α-гліцерофосфатний (локалізований у цитозолі клітин різних тканин, окрім клітин мозку).

Процес біосинтезу фосфоліпідів пов'язаний з поновленням клітинних мембран. Перші стадії синтезу фосфоліпідів співпадають із синтезом триацигліцеролів до фосфатидної кислоти, а із неї – дигліцериду.

За своїм походженням в організмі холестерол може бути **екзогенним** (потрапляє з продуктами) та **ендогенним** (синтезується в організмі). Біосинтез холестеролу в організмі – природній процес, оскільки холестерол є попередником багатьох біологічно активних речовин. Холестерол синтезується в печінці з ацетил-КоА.

Умовно процес синтезу холестеролу можна розподілити на три етапи:

1) перший етап – перетворення ацетил-КоА в мевалонову кислоту;

2) другий етап – утворення сквалену із мевалонової кислоти, тобто спочатку синтезуються ізопренові залишки, що конденсуються у сквален, який містить шість залишків ізопрену;

3) третій етап – циклізація сквалену в холестерол.

Синтез холестеролу регулюється гормональним шляхом. Підсилюють процес інсулін і тиреоїдні гормони; глюкагон, глюкокортикоїди, навпаки, пригнічують синтез холестеролу.

? Питання для самоконтролю

1. Як відбувається перетравлення ліпідів у шлунково-кишковому тракті? Яку роль відіграє жовч у перетравленні жирів? Поясніть механізми всмоктування та транспортування ліпідів.

2. Охарактеризуйте гідроліз триацилгліцеролів (загальна схема гідролізу, схема гідролізу пальміностеаринолеїнату).

3. Назвіть та охарактеризуйте реакції β-окиснення жирних кислот. Які ферменти беруть у них участь?

4. Який енергетичний ефект окиснення пальмітинової кислоти?

5. Охарактеризуйте окиснення гліцеролу: реакції, ферменти.

6. У чому полягає взаємозв'язок між обміном білків, вуглеводів і ліпідів? Наведіть приклади реакцій.

7. Поясніть практичне значення вивчення дії фосфоліпази підшлункової залози на гліцерофосфоліпіди яєчного жовтка.

✍ Завдання для домашнього виконання

Складіть *схему метаболізму ліпідів* на окремому аркуші, включивши до неї: перетравлення ліпідів у шлунково-кишковому тракті; β-окиснення вищих жирних кислот; окиснення гліцеролу; синтез холестеролу.

Лабораторна робота № 11
ДІЯ ФОСФОЛІПАЗ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ НА ГЛІЦЕРОФОСФОЛІПІДИ ЯЄЧНОГО ЖОВТКА

Мета роботи: дослідити дію фосфоліпази підшлункової залози на гліцерофосфоліпіди яєчного жовтка на моделі *in vitro*.

Практичне значення роботи: у ході лабораторного дослідження виявляється дія фосфоліпази підшлункової залози на гліцерофосфоліпіди яєчного жовтка.

Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, водяна баня або термостат, суспензія яєчного жовтка, панкреатин, дистильована вода, молібденовий реактив.

Хід роботи

У дві пробірки додають по 5 крапель суспензії яєчного жовтка.

У *першу* пробірку (дослідну) додають 2 краплі панкреатину, а в *другу* пробірку (контрольну) − 2 краплі води.

Обидві пробірки поміщають у термостат при температурі 38^0C

на 30 хвилин.

Після інкубації в обидві пробірки наливають по 5 крапель молібденового реактиву, нагрівають їх на полум'ї пальника та охолоджують водою під краном.

Спостерігають появу *жовтого забарвлення*, що свідчить про наявність залишку фосфорної кислоти у структурі фосфоліпідів.

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

ТЕМА 10. БУДОВА, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗНАЧЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ. ТРАНСКРИПЦІЯ. ТРАНСЛЯЦІЯ

Нуклеїнові кислоти – біополімери (полінуклеотиди), мономерами яких є мононуклеотиди.

Нуклеїнові кислоти забезпечують зберігання та передачу генетичної інформації в живій клітині. Нуклеїнові кислоти наявні в організмі у складі полінуклеопротеїдів.

Існують два різних типи нуклеїнових кислот − дезоксирибонуклеїнова кислота (далі − ДНК) і рибонуклеїнова кислота (далі − РНК) (рис. 37).

ДНК РНК

Рисунок 37 – Типи нуклеїнових кислот ДНК і РНК відповідно

ДНК – це генетичний матеріал більшості організмів. У прокаріотичних клітинах, окрім основної хромосомної ДНК, часто зустрічаються позахромосомні ДНК – плазміди (рис. 38).

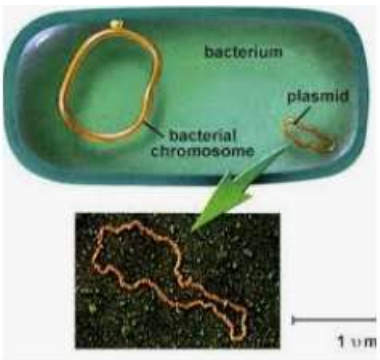


Рисунок 38 – Плазміди

В еукаріотичних клітинах основна маса ДНК зосереджена в клітинному ядрі, де вона зв'язана з білками в хромосомах. Еукаріотичні клітини містять ДНК також у різних органелах (мітохондріях, хлоропластах) (рис. 39).

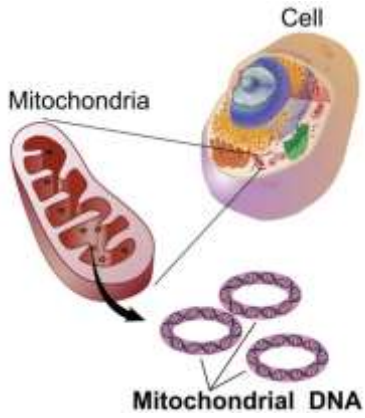


Рисунок 39 –ДНК у мітохондріях

ДНК у клітині зазвичай присутня у вигляді комплексу з гістонами – білками, багатими на залишки лізину й аргініну. Цей комплекс ДНК із гістонами називається **хроматином**, окрім гістонів, містить також кислі білки, фосфопротеїди, ферменти й невеликі за розміром ядерні РНК (рис. 40).

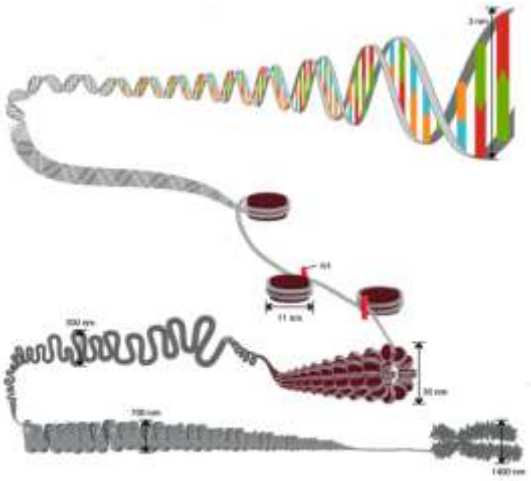
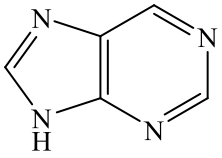
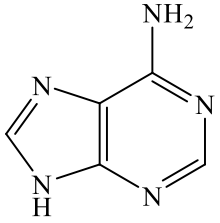


Рисунок 40 – ДНК у клітині у вигляді комплексу з гістонами

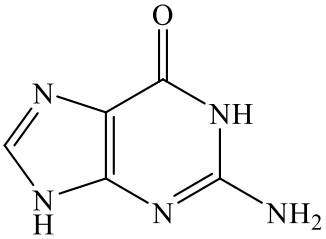
При гідролізі нуклеїнових кислот утворюються азотисті основи − пуринові (рис. 41 а, б, в) та піримідинові основи (рис. 38 г, д, е, є), пентози − дезоксирибоза, рибоза (див. рис. 31 а, б) та фосфорна кислота.



а



б



в

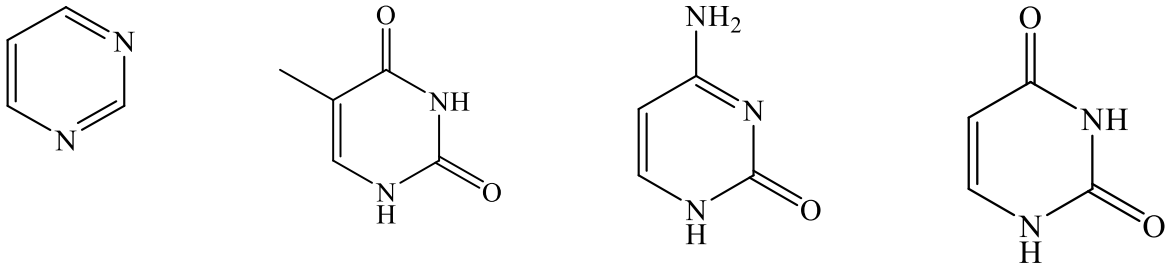


Рисунок 41 − Пуринові та піримідинові основи: пурин (а), аденін − A (б), гуанін − G (в), піримідин (г), тимін − T (д), цитозин − C (е), урацил − U (є)

Мононуклеозид – це хімічна структура, що складається з вуглеводу та пуринових або піримідинових основ (гетероциклічних основ) (рис. 42 а, б, в).

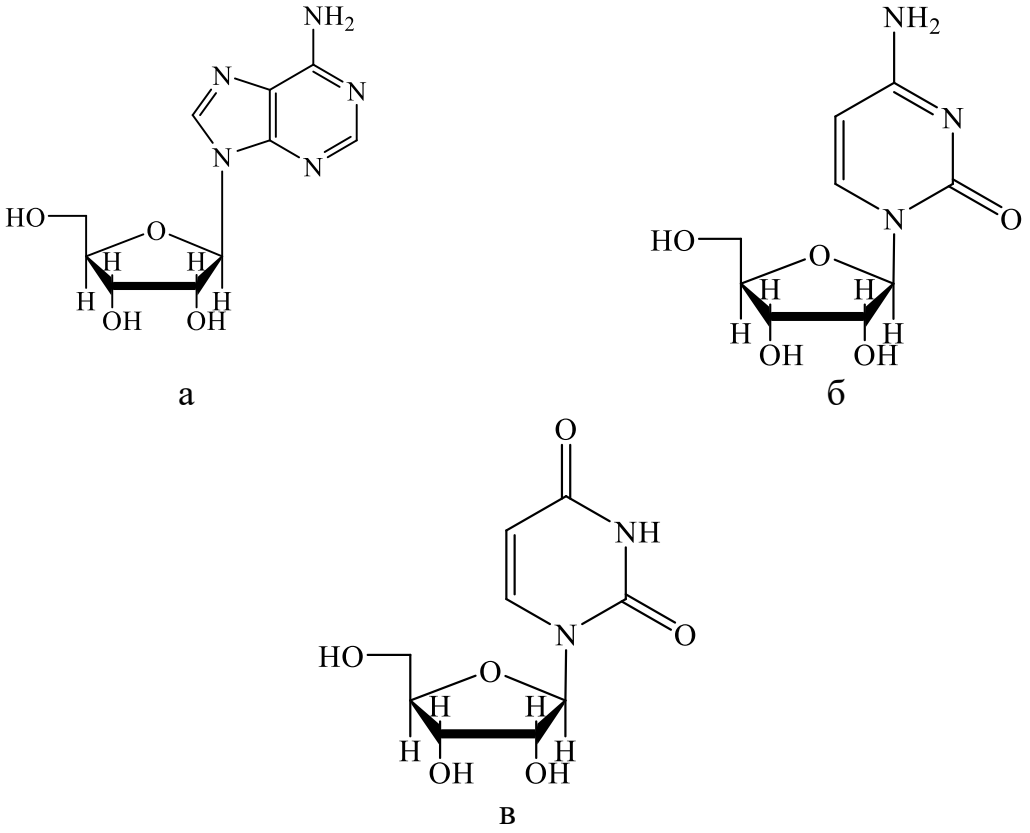


Рисунок 42 − Будова мононуклеозидів: аденозину (а), цитидину (б), уридину (в)

Назви мононуклеозидів утворюють аналогічно назвам глікозидів. Так, нуклеозид, який складається з рибози та урацилу, називають b-урацилрибофуранозидом, нуклеозид із дезоксирибози та аденіну – b-аденіндезоксирибофуранозидом і т.д.

Частіше використовують назви, які для рибонуклеозидів утворюють із тривіальних назв відповідних гетероциклічних основ із закінченням *-идин* (*-ідин*) у піримідинових і *-озин* у пуринових нуклеозидів.

У назвах дезоксирибонуклеозидів додатково вводиться префікс *дезокси-*: дезоксиаденозин, дезоксицитидин. Виняток: назва нуклеозиду, що складається з дезоксирибози та тиміну, − тимідин (замість дезокситимідину).

Мононуклеотид – це структурна одиниця нуклеїнових кислот, що складається із залишків мононуклеозиду та фосфатної кислоти (рис. 43).

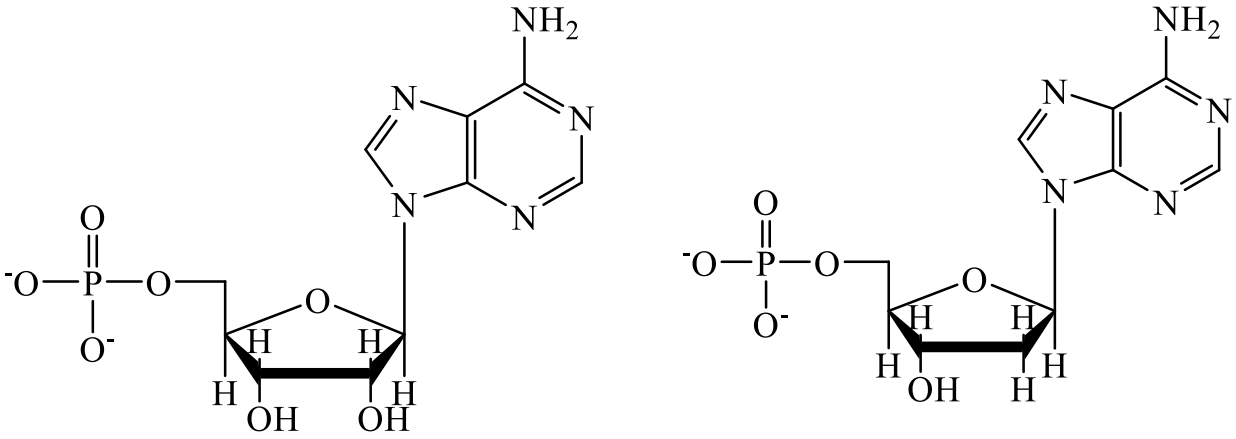


Рисунок 43 − Будова мононуклеотидів: рибонуклеотиду (а), дезоксирибонуклеотиду (б)

Мононуклеотиди входять до складу коферментів $НАД^+$, $НАДФ^+$, $ФАД^+$, ФМН.

Таким чином, ДНК складається з нуклеотидів і має такі особливості будови (рис. 44):

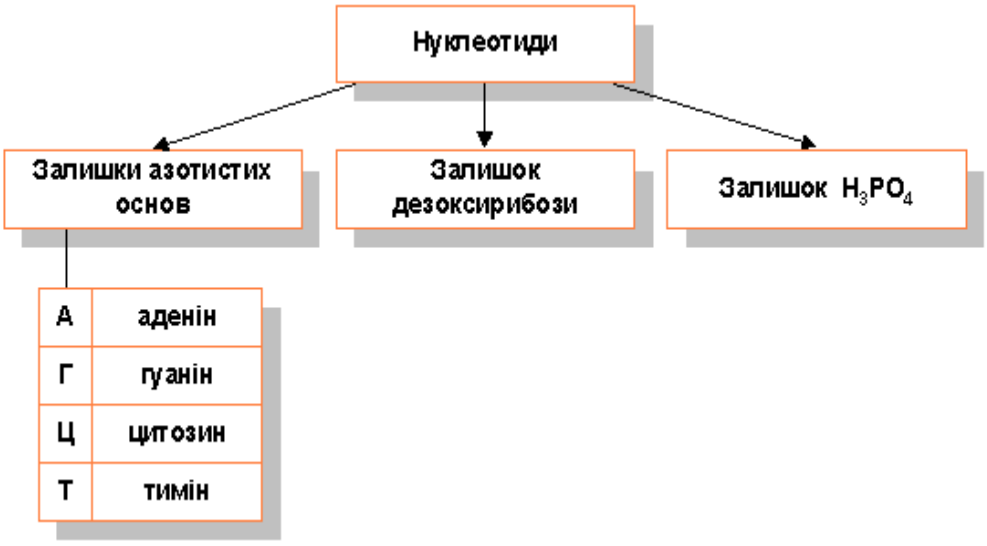


Рисунок 44 – Складові ДНК

Первинна структура нуклеїнових кислот – це певна послідовність розташування мононуклеотидних ланок у полінуклеотидному ланцюзі (рис. 45).

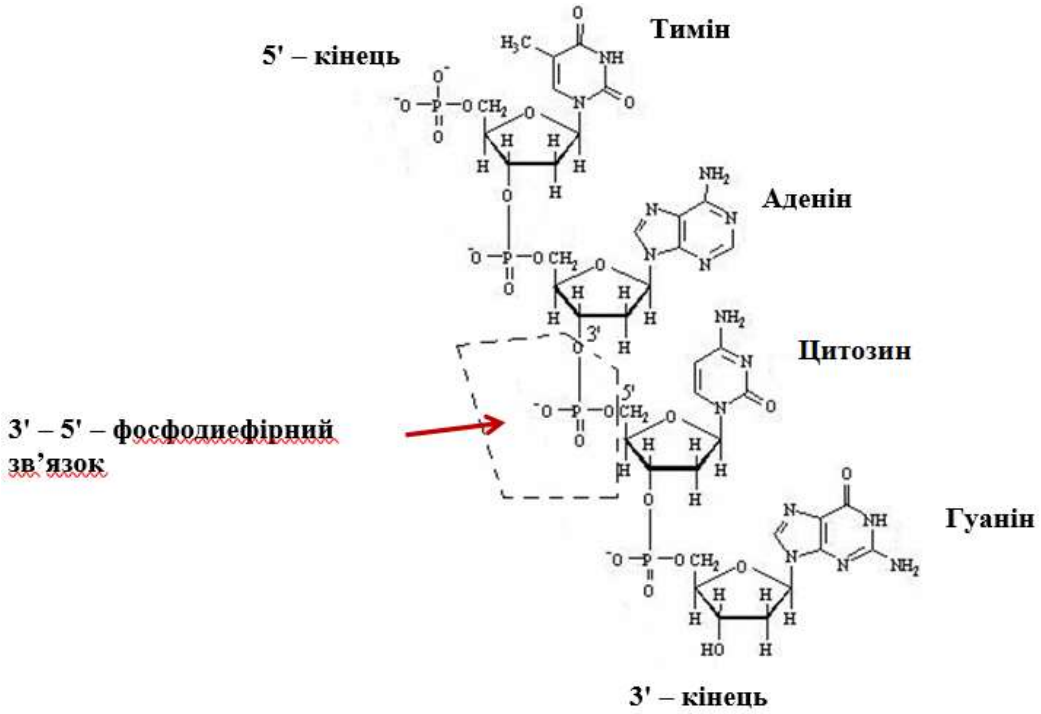


Рисунок 45 − Фрагмент первинної структури ДНК

Єдиним типом зв'язків між мононуклеотидами є 3,5-фосфодиефірний зв'язок, який з'єднує 3-гідроксильну групу пентози одного мононуклеотиду з 5-гідроксильною групою пентози іншого мононуклеотиду.

Завдяки іонізації фосфатних груп нуклеїнові кислоти несуть великий негативний заряд та можуть утворювати комплекси з основними (позитивно зарядженими) білками.

Вторинна структура ДНК – структура, що складається із двох антипаралельних полінуклеотидних ланцюгів, які утворюють подвійну спіраль (модель Уотсона та Кріка, 1953 р.) (рис. 46).

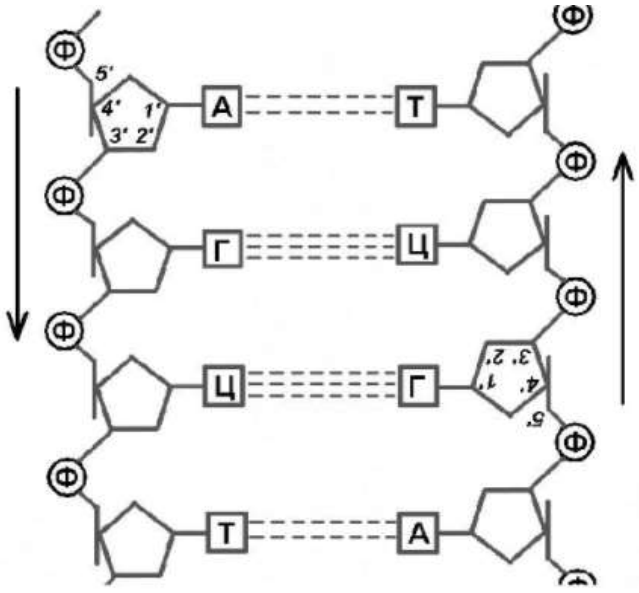
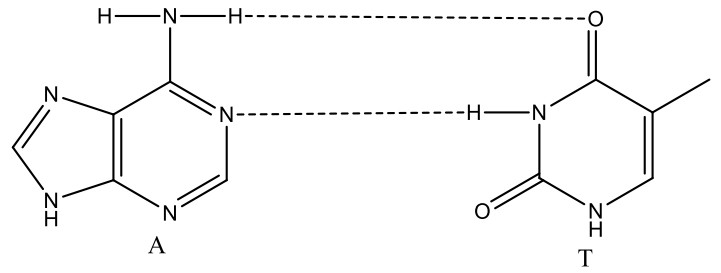


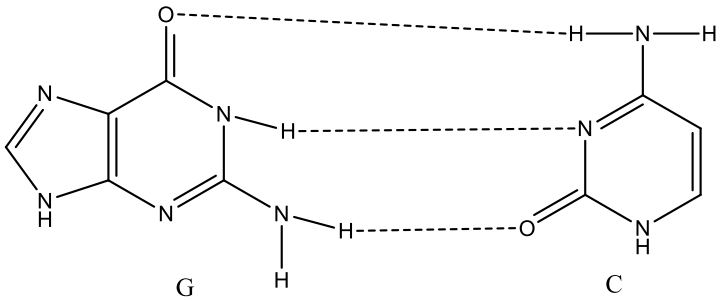
Рисунок 46 – Фрагмент вторинної структури ДНК

Конфігурація подвійної спіралі утримується водневими зв’язками, які виникають між пуриновими та піримідиновими основами двох полінуклеотидних ланцюгів ДНК.

Водневі зв’язки виникають між пуриновою та піримідиновою основою. Ці основи складають **комплементарні пари.** Між аденіном і тиміном утворюється два водневих зв’язки (рис. 47 а); між гуаніном і цитозином – три водневих зв’язки (рис. 47 б).



а



б

Рисунок 47 − Комплементарні пари: між аденіном і тиміном (а), між гуаніном і цитозином (б)

Правило Чаргаффа

1. Вміст аденіну дорівнює вмісту тиміну, а вміст гуаніну − кількості цитозину:

$$A = T,\ G = C$$

2. Кількість пуринових основ дорівнює кількості піримідинових основ:

$$A + G = T + C$$

3. Кількість основ із 6-и аміногруп дорівнює кількості основ із 6-и кетогруп:

$$A + C = G + T$$

Для кожного типу ДНК сумарний вміст гуаніну та цитозину не дорівнює сумарному вмісту аденіну та тиміну, тобто (G + C) / (A + T), як правило, відрізняється від 1 (може бути як > 1, так і < 1). За цією ознакою розрізняють два основні типи ДНК: АТ-тип із переважним вмістом аденіну та тиміну і GC-тип із переважним вмістом гуаніну та цитозину.

Коефіцієнт специфічності − величина відношення вмісту суми гуаніну та цитозину до суми вмісту аденіну та тиміну, що характеризує нуклеотидний склад даного виду ДНК. Кожна ДНК має характерний коефіцієнт специфічності, який може змінюватися в межах від 0,3 до 2,8.

Третинна структура ДНК – це суперспіраль або кільце (бактерії, віруси).

Фізико-хімічні властивості ДНК.

1) розчини ДНК виділяють із великою обережністю при pH = 7 та t = 20-25 ^{0}C; вони мають високу в'язкість;

2) висока температура, екстремальні значення pH викликають денатурацію або розплітання вторинної структури ДНК. При цьому порушуються водневі зв'язки. При денатурації ковалентні зв'язки в основі молекули не розриваються. За певних умов два розділені комплементарні ланцюги ДНК можуть відновити подвійну спіраль. Це явище називається **ренатурацією, реасоціацією**, або **відпалом**, і відбувається при зменшенні температури або pH (рис. 48);

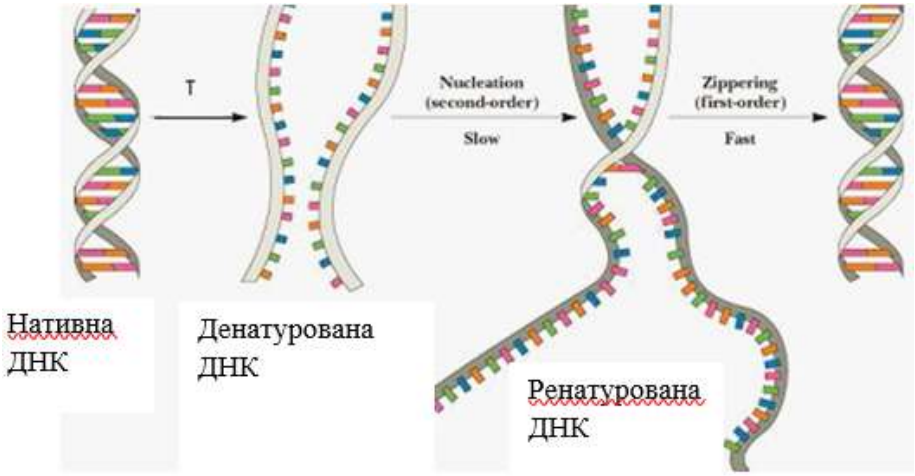


Рисунок 48 – Схема, що показує утворення ренатурованої ДНК

3) для кожного виду ДНК характерна певна температура денатурації – точка плавлення. Чим більше в ДНК пар (G ≡ C) із потрійними зв'язками, тим вища точка плавлення цієї ДНК;

4) препарати ДНК, у яких є пари G ≡ C, мають більшу густину, ніж препарати ДНК з A = T;

5) велика молекулярна маса ДНК і крихкість молекули;

6) нуклеїнові кислоти повертають площину поляризованого світла (оптична активність ДНК). Питома оптична активність визначається за формулою:

$$[\alpha]\beta = (100 \cdot \alpha) / (l \cdot c),$$

де α – величина повороту, отриманого в досліді;

l – довжина поляриметричної трубки;

c – концентрація.

Аденозинтрифосфат (АТФ) – універсальний акумулятор енергії в живих організмах і субстрат для біосинтезу нуклеїнових кислот (рис. 49).

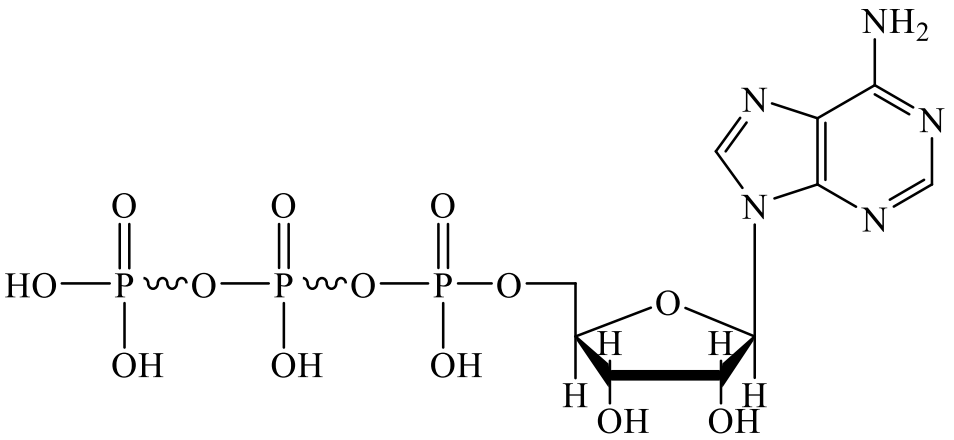


Рисунок 49 − Структура аденозинтрифосфату (АТФ)

У клітинах енергія, накопичена у вигляді АТФ, використовується в багатьох процесах: різні форми руху, внутрішньоклітинний транспорт іонів та інших речовин, біосинтез білків, нуклеїнових кислот, жирних кислот, ліпідів, вуглеводів та ін.

Циклічний аденозинмонофосфат (ц-АМФ) – посередник у здійсненні функцій різних гормонів та інших біологічно активних сполук (рис. 50); ц-АМФ утворюється із внутрішньоклітинного АТФ.

У клітинах є матричні (інформаційні) РНК (мРНК або іРНК), рибосомні РНК (рРНК), транспортні РНК (тРНК). Молекули РНК складаються з одного полінуклеотидного ланцюга, що в деяких ділянках може мати спіралізовані петлі («шпильки»), стабілізовані водневими зв’язками.

мРНК знаходиться в ядрі, цитоплазмі. Для мРНК характерна первинна та вторинна структури, які ґрунтується на внутрішньомолекулярних взаємодіях (водневі зв’язки виникають між різними ділянками однієї й тієї ж самої молекули, при цьому утворюється лінійна молекула).

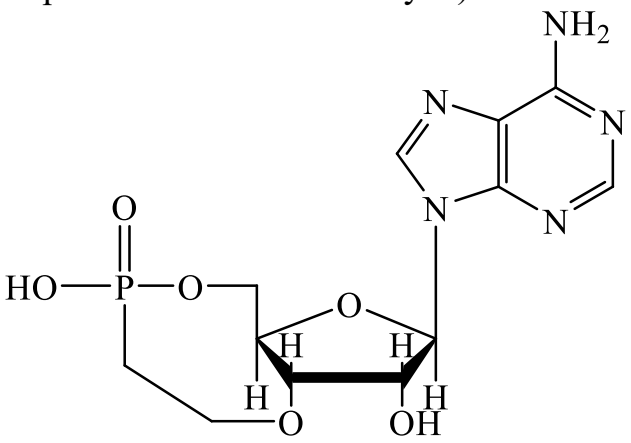


Рисунок 50 − Структура циклічного аденозинмонофосфату (ц-АМФ)

мРНК використовується в ході трансляції як матриця для синтезу білків; відіграє важливу роль у експресії генів.

тРНК знаходиться в цитоплазмі. тРНК складається з одного ланцюга, має конформацію «листка конюшини» (рис. 51). Забезпечує транспортування амінокислот до місця синтезу білків.

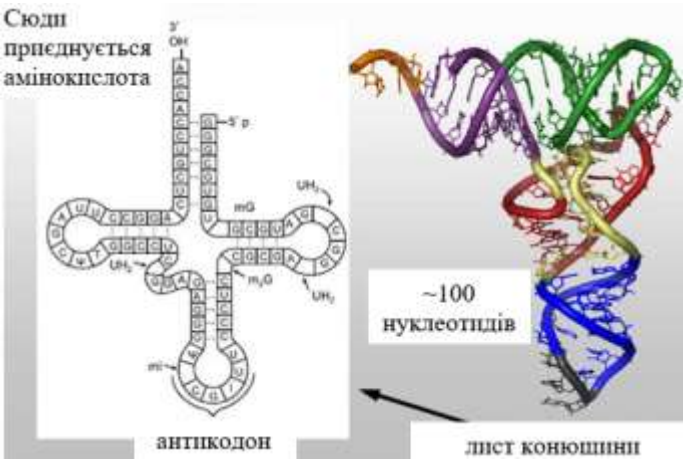


Рисунок 51 – Особливості будови т-РНК

рРНК знаходиться в рибосомах. рРНК являє собою велику субчастину рибосоми, має форму глобулоподібно закрученого одинарного ланцюга однієї молекули РНК (рис. 52). Забезпечує зчитування інформації з мРНК за допомогою адапторних молекул тРНК, каталіз утворення пептидних зв'язків між приєднаними до тРНК амінокислотами.

Кількість видів мРНК – до сотень або декількох тисяч, тРНК – понад 60, рРНК – 4.

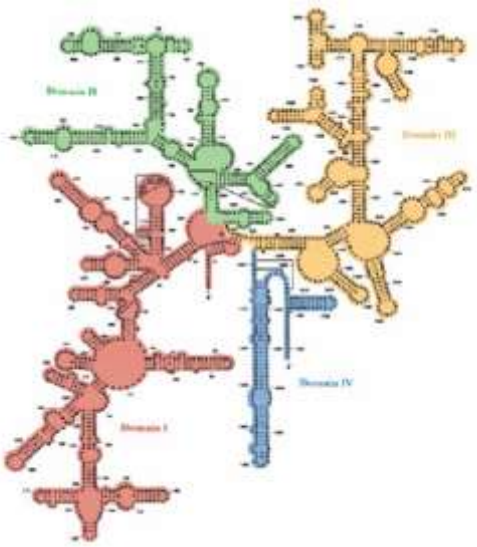


Рисунок 52 – Особливості будови рРНК

? Питання для самоконтролю

1. Що таке нуклеопротеїди? Поясніть біологічну роль нуклеопротеїдів та їх простетичної групи – нуклеїнових кислот.

2. Наведіть формули азотистих основ, вуглеводів, які входять до складу ДНК і РНК відповідно.

3. Порівняте особливості будови мононуклеозиду, мононуклеотиду.

4. Що собою являють первинна, вторинна, третинна структури нуклеїнових кислот?

5. Розкрийте сутність правила Чаргаффа. Назвіть фізико-хімічні властивості ДНК.

6. Наведіть формули АТФ, ц-АМФ та поясніть їх значення.

7. Охарактеризуйте різновиди РНК. Поясніть значення кожної з них.

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Опишіть схематично методи виділення нуклеїнових кислот.

2. Охарактеризуйте особливості будови вторинної структури нуклеїнових кислот. Напишіть, як утворюються антипаралельні ланцюги в молекулі ДНК.

3. Опишіть типи РНК, їх будову, перерахуйте біологічні функції та вкажіть локалізацію в клітині (мРНК, тРНК, рРНК). Подайте дані у вигляді таблиці.

Лабораторна робота № 12
РЕАКЦІЇ НА СКЛАДОВІ КОМПОНЕНТИ НУКЛЕОПРОТЕЇДІВ ДРІЖДЖІВ

Мета роботи: виявити у ході лабораторних дослідів особливості складових компонентів нуклеопротеїдів.

Практичне значення роботи: у біохімічних дослідженнях кольорові реакції на складові компоненти нуклеопротеїдів проводяться для їх ідентифікації та кількісного визначення.

Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, термостат, піщана баня, водяна баня; дріжджі, 5%-й розчин сульфатної кислоти, 20%-й розчин натрій гідроксиду, 1%-й розчин купрум (II) сульфату, концентрований розчин амоній гідроксиду, 2%-й амонійний розчин аргентум нітрату, молібденовий реактив, 1%-й розчин дифеніламіну.

Хід роботи

Дослід 1. Гідроліз нуклеопротеїдів дріжджів (проводиться попередньо!).

Хід роботи. У пробірку із пробкою та вставленою довгою скляною трубкою, що являє собою зворотний холодильник, вносять близько 1 г дріжджів і додають 10-15 мл 5%-го розчину сульфатної кислоти. Нагрівають на піщаній бані протягом 45 хв. Після охолодження гідролізат фільтрують. Отримують гідролізат дріжджів.

Дослід 2. Виявлення в гідролізаті дріжджів білка за допомогою біуретової реакції.

Хід роботи. У пробірку до 5 крапель гідролізату дріжджів доливають 10 крапель 20%-го розчину натрій гідроксиду, додають 2 краплі 1%-го розчину купрум (II) сульфату. Спостерігають появу *рожевого* або *рожево-фіолетового забарвлення*.

Дослід 3. Виявлення в гідролізаті дріжджів пуринових основ.

Хід роботи. У пробірку до 10 крапель гідролізату дріжджів додають 10 крапель концентрованого розчину амоній гідроксиду, потім – 10 крапель

2%-го амонійного розчину аргентум нітрату. Через 3-5 хв утворюється *пухкий осад солей пуринових основ.*

Дослід 4. Виявлення в гідролізаті дріжджів фосфорної кислоти.

Принцип реакції. Метод ґрунтується на взаємодії фосфорної кислоти з молібденовим реактивом. У результаті утворюється забарвлена сполука – фосфорна сіль амоній молібдату.

$$12\ (NH_4)_2MoO_4 + H_3PO_4 + 21\ HNO_3 \rightarrow$$

$$\rightarrow 21\ NH_4NO_3 + (NH_4)_3PO_4 \cdot 12\ MoO_3 \cdot 6\ H_2O + 6\ H_2O$$

Хід роботи. У пробірку до 3-5 крапель гідролізату дріжджів додають 20 крапель молібденового реактиву та кип’ятять на водяній бані протягом декількох хвилин. Розчин набуває жовтуватого забарвлення. При охолодженні утворюється *осад жовтого кольору*.

Дослід 5. Виявлення в гідролізаті дріжджів рибози та дезоксирибози.

Хід роботи. У пробірку до 5 крапель гідролізату дріжджів додають 20 крапель 1%-го розчину дифеніламіну та кип’ятять на водяній бані протягом 15 хвилин. Спостерігають появу *синьо-зеленого забарвлення*.

Результати дослідів 1-5 внесіть у таблицю 14 за аналогією:

Таблиця 14 − Реакції на складові компоненти нуклеопротеїдів дріжджів

№ з/п	Назва досліду	Реактиви, які використовуються	Зміни, що відбуваються під час реакції	Висновок
1	2	3	4	5
1	Гідроліз нуклеопротеїдів дріжджів (проводиться попередньо)	1) 1 г дріжджів; 2) 10-15 мл 5%-го розчину сульфатної кислоти. Нагрівають на піщаній бані протягом 45 хв	Прозорий розчин жовтуватого забарвлення	Утворення гідролізату дріжджів

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

ТЕМА 11. ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Елементарною функціональною одиницею спадковості, що визначає можливість розвитку окремої ознаки клітини або організму, є ген.

Ген – це функціональна одиниця ДНК, що містить інформацію для синтезу поліпептиду або РНК. Середня довжина гена – близько 1000 пар основ. Послідовність основ у кожному гені унікальна.

Основні положення сучасної теорії гена:

1) ген займає певний локус у хромосомі; 2) ген (цистрон) – частина молекули ДНК; кількість нуклеотидів у гені неоднакова; 3) всередині гена може відбуватися рекомбінація та мутація; 4) існують структурні та функціональні гени; 5) структурні гени контролюють синтез поліпептидів (амінокислотних, т-РНК, р-РНК) і білків; 6) функціональні гени контролюють діяльність структурних генів; 7) розташування триплетів у структурних генах колінеарне послідовності амінокислот у поліпептиді.

Між генами знаходяться **спейсери** – неінформативні відрізки ДНК різної довжини (іноді понад 20 000 пар основ), які мають значення для регулювання транскрипції сусіднього гена. Навіть усередині самого гена є (тільки в еукаріотів та їх вірусів) неінформативні послідовності (інтрони). При процесингу всі копії інтронів і більшість копій спейсерів вирізаються за допомогою ферментів (рис. 53).

Гени функціонують у клітині не самі по собі, а входять до складу більш складної генної регуляторної системи. Ділянка ДНК, на якій проходить зчитування інформації, називається одиницею транскрипції (ген, що транскрибується). Вона обмежена промотором (зона початку транскрипції) і термінатором (зона зупинки транскрипції).

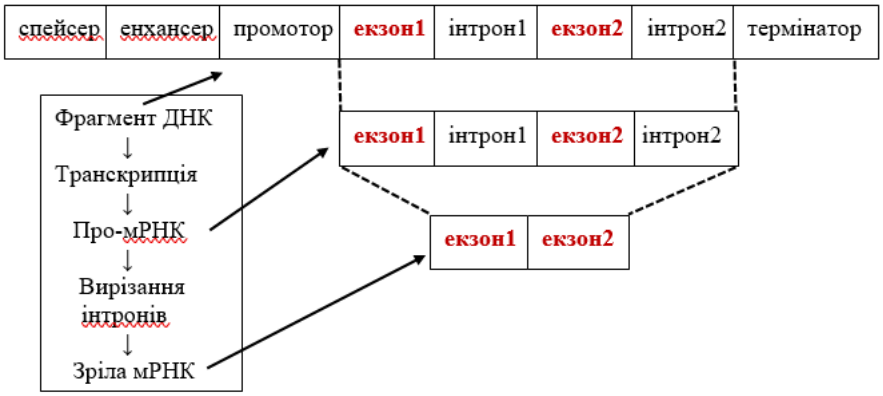


Рисунок 53 – Некодуючі ділянки ДНК та утворення мРНК

Промотор (Р) – це суворо визначена регуляторна нуклеотидна послідовність, яка розпізнається ферментом транскрипції – РНК-полімеразою (рис. 54).

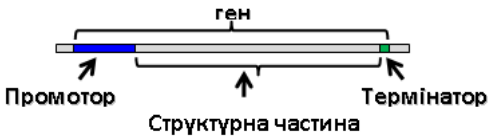


Рисунок 54 – Промотор

Промотори або:

– впритул прилягають до початку структурної частини гена;

– відокремлені від нього будь-якими функціональними локусами (ділянками).

Промотор виконує такі функції:

а) це місце приєднання РНК-полімерази до молекули ДНК;

б) послідовність основ у промоторі визначає, який із ланцюгів ДНК буде «смисловий», тобто з якого ланцюга ДНК відбуватиметься зчитування інформації.

У про- та еукаріотів послідовності промоторів різні. Це враховується в генній інженерії при вбудовуванні в геном бактерії генів людини.

Оператор (О) – це ділянка (послідовність нуклеотидів), з якою зв'язуються білки-регулятори – активатори чи репресори. Він розташовується в безпосередній близькості до промотора або перекривається з ним (рис. 55).

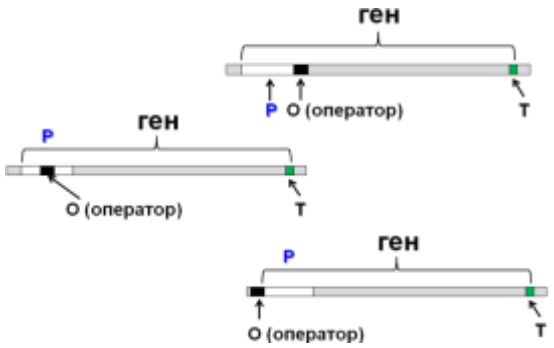


Рисунок 55 – Розташування оператора відносно промотора

Зв'язування білка-репресора з оператором або створює стеричні (просторові) труднощі для зв'язування РНК-полімерази з промотором, або перешкоджає просуванню її на смисловому ланцюзі ДНК і визначає точку початку транскрипції. Ні промотор, ні оператор в РНК не транскрибуються, і зони промотора та оператора можуть перекриватися. Зв'язування білка-активатора (апоіндуктора) з оператором обумовлює приєднання РНК-полімерази до промотора і початок транскрипції (рис. 56).

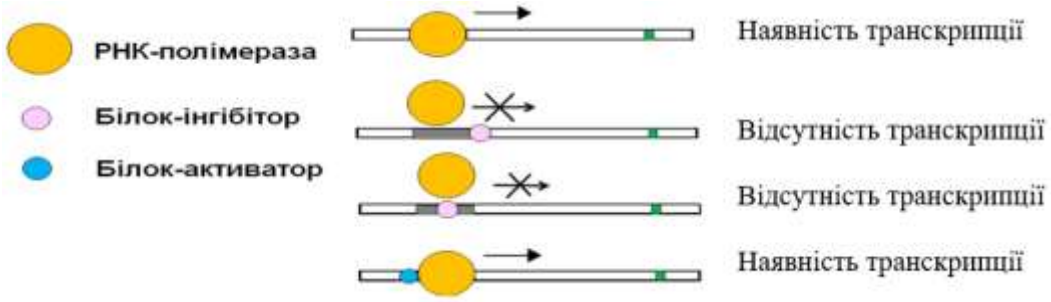


Рисунок 56 – Регуляція білками-регуляторами транскрипції гена

Термінатори та атенюатори – короткі локуси, які є сигналами про закінчення (термінацію) транскрипції ДНК.

У еукаріотів є тільки термінатори. У бактерій – атенюатори та термінатори.

Атенюатор – ділянка ДНК, яка містить сигнал дострокової термінації транскрипції та регулює довжину транскрипту після ініціації транскрипції. Атенюатори знаходяться перед групою спільно регульованих генів.

Термінатори знаходяться після генів. В одних умовах транскрипція припиняється на атенюаторі (гени не зчитуються), в інших умовах – на термінаторі (гени зчитуються).

Організація геному прокаріот

У 1961 р. французькі вчені Ф. Жакоб і Ж. Моно запропонували модель оперона як систему регуляції експресії генів бактерій. Методами молекулярної біології у 70-і роки була підтверджена оперонна гіпотеза Ф. Жакоба і Ж. Моно (Нобелівська премія, 1965 р.) і визначена будова оперона.

Ф. Жакоб

Ж. Моно

Згідно з моделлю оперона структурні гени розподіляються на дві групи:

1. **Конститутивні гени** – гени, що забезпечують синтез білків загального призначення (білки рибосом, ферменти гліколізу тощо), тРНК і рРНК. Транскрибування цих генів відбувається шляхом приєднання РНК-полімерази до промотора. Транскрипція таких генів відбувається постійно й не потребує регуляції.

2. **Індуцибельні гени (гени, що регулюються іншими генами)** – функціонування, а також швидкість і тривалість їх транскрипції залежить від різних регулюючих чинників, що стимулюють або перешкоджають приєднанню РНК-полімерази до промотора гена:

– генетичні чинники – спеціальні білки-регулятори (**активатори** та **репресори**);

– негенетичні чинники – невеликі молекули (**ефектори – індуктори** та **корепресори**).

Індуктори запускають транскрипцію. Вони можуть **інактивувати білки-репресори**, які припиняють з'єднуватися з операторами, або **підвищувати здатність білків-активаторів (апоіндукторів) до зв'язування з ними**, що полегшує з'єднання РНК-полімерази з промотором. ***У результаті гени активно транскрибуються.***

Корепресори перешкоджають транскрипції. Вони можуть **інактивувати білки-активатори**, які втрачають при цьому здатність з'єднуватися з операторами, або **активувати репресори**, що перебувають у неактивному стані. У результаті РНК-полімераза не може з'єднуватися з промотором і транскрипція не відбувається.

Концепція оперона Жакоба і **Моно:**

- Оперон – це одиниця координованої транскрипції генів прокаріотів.

• Оперон включає групу структурних генів, транскрипція яких відбувається із загального промотора та регулюється поодиноким оператором.

Генетичний контроль активності оперона:

• регуляція активності кожного оперона знаходиться під контролем гена-регулятора, який кодує синтез регуляторного білка;

• ген-регулятор не входить до складу оперона і є конститутивним, тобто його експресія відбувається постійно (немає оператора).

До складу оперона входять:

• група зчеплених структурних генів, які кодують синтез ферментів для єдиного метаболічного процесу;

• регуляторні ділянки: промотор, оператор, термінатор.

Приклад будови лактозного оперона (*lac*-оперона) (рис. 57).

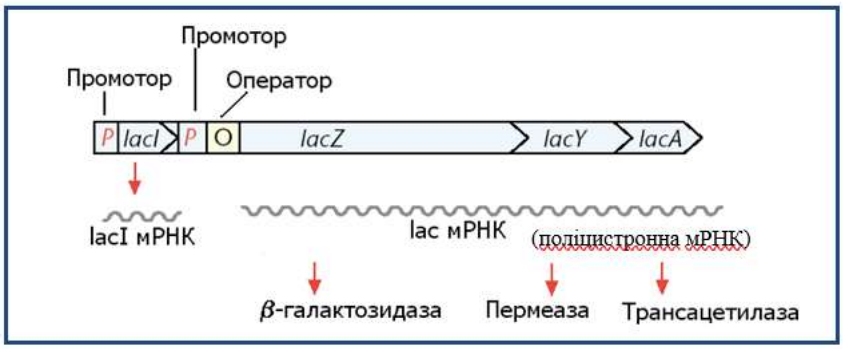


Рисунок 57 – Будова лактозного оперона

Ділянка оперона, яка транскрибується, включає не тільки оператор і структурні гени. Між оператором і першим структурним геном (координати від +28 до +36) знаходиться ділянка, що кодує так званий сайт розпізнавання рибосом (або послідовність **Шайна-Далгарно**). До її складу входить ділянка 5'**AGGA**3'. У мРНК, яка транскрибується до цієї послідовності, приєднується рибосома. Сайти рибосом розташовані перед кожним структурним геном оперона.

Промотор, оператор і ділянка, що термінує, є загальними для всіх генів оперона. Тому мРНК, яка синтезується, є поліцистронною, тобто містить безперервну послідовність нуклеотидів РНК, що транскрибована з усіх структурних генів даного оперона – від оператора до термінатора включно.

В еукаріотів важливу роль у процесах регуляції транскрипції відіграють послідовності, які не кодують, – **енхансери, сайленсери, інсулятори.**

Енхансери (Е) розташовуються достатньо далеко від регульованого гена: до декількох тисяч пар нуклеотидів і впливають на транскрипцію, знаходячись на відстані. Вони діють незалежно від положення відносно напрямку транскрипції. Існує кілька моделей функціонування енхансерів. Більшість із них полягає в тому, що білки, пов'язані з енхансерами, безпосередньо взаємодіють з білками, зібраними на промоторі, а ДНК між ними утворює петлю. Енхансери практично не володіють специфічністю дії, тому в геномі є інші регулятори, які визначають активність і специфічність енхансерів (рис. 58).

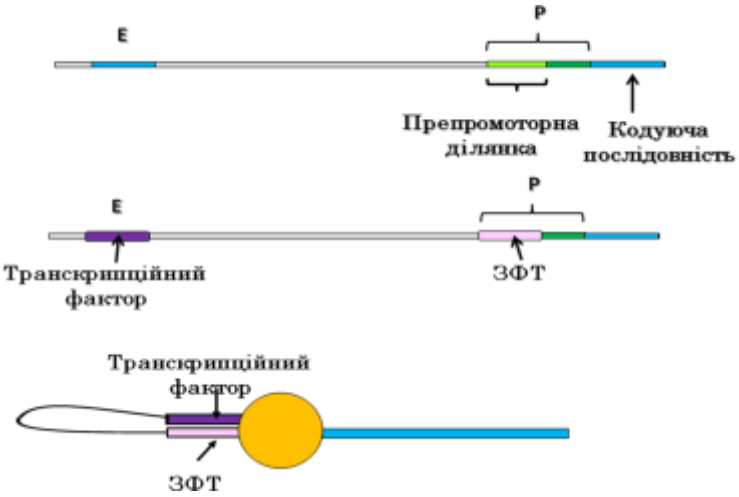


Рисунок 58 – Вплив енхансера на активність гена

У цьому прикладі енхансер розташований перед кодуючою послідовністю, але петля може утворитися і якщо енхансер розташований позаду послідовності, яку кодує.

Транскрипцію потрібно не тільки активувати, але й пригнічувати. Для цього існують **сайленсери.**

Сайленсер – послідовність ДНК, з якою пов'язуються білки-репресори (фактори транскрипції). Пов'язування білків-репресорів із сайленсерами призводить до зниження чи до повного пригнічення синтезу РНК ферментом ДНК-залежною РНК-полімеразою. Сайленсери діють незалежно від їх положення відносно напрямку транскрипції та не володіють специфічністю дії.

Припускається, що специфічність дії енхансерів і сайленсерів визначається **інсуляторами,** які блокують активність енхансера / сайленсера, але це відбувається тоді, коли інсулятор знаходиться між промотором і енхансером / сайленсером. При цьому інсулятори не впливають безпосередньо на активність енхансера / сайленсера і промотора – енхансер / сайленсер може впливати на незаблокований інсулятором промотор, а промотор може бути активованим / репресованим іншим енхансером / сайленсером. Нині запропоновано багато моделей, але деталі функціонування невідомі.

Головна кількісна особливість генетичного матеріалу **еукаріотів** – наявність надлишкової ДНК. Наприкінці 60-х років науковими зусиллями американських учених Р. Бріттена, Е. Девідсона та інших було відкрито фундаментальну особливість молекулярної структури геному еукаріот – нуклеотидні послідовності різного ступеня повторюваності. Це відкриття було зроблене за допомогою молекулярно-біологічного методу вивчення кінетики ренатурації денатурованої ДНК.

Розрізняють такі фракції в геномі еукаріотів.

1. Унікальні – послідовності, які представлені в одному варіанті або небагатьма копіями. Вміст **унікальних** послідовностей в геномі евкаріотів варіює у різних організмів, і їх частка становить 15-98% від усієї ДНК. Їх

більша частина є **некодуючою** (наприклад, **інтрони**). Геном прокаріотів містить тільки унікальні послідовності ДНК.

2. Низькочастотні повтори – послідовності, які повторюються десятки разів.

3. Проміжні, або середньочастотні, повтори – послідовності, які повторюються сотні та тисячі разів. До них належать гени рРНК (у людини їх 200 на гаплоїдний набір, у миші – 100, у кішки – 1000, у риб і квіткових рослин – тисячі), тРНК, гени рибосомних білків і білків-гістонів.

4. Високочастотні повтори, кількість яких досягає 10 мільйонів (на геном). ДНК високо повторюваного хроматину називають **сателітними ДНК**. Довжина послідовності високо повторюваних сателітів становить від 100 тисяч до понад 1 мільйона нуклеотидів. Повторювана послідовність, як правило, становить понад 100 п.о. Її вміст може досягати 5-50 % від сумарної кількості ДНК. Не бере участь у синтезі основних типів РНК в клітині, не пов'язана з процесом синтезу білка. Концентрується в біляцентромерному гетерохроматині.

Повторювана ДНК складається з нуклеотидних послідовностей різної довжини і структури, які зустрічаються в геномі кілька разів або в тандемно-повторюваному або в диспергованому вигляді. Розмір частини геному, зайнятої повторюваними послідовностями, широко варіює між таксонами. У дріжджів він досягає 20 %, у ссавців повторюється до 60 % усієї ДНК. У рослин може перевищувати 80 %.

Тандемні (часто повторювані) повтори – послідовності повторюваних фрагментів ДНК, які розташовані один за одним, із змінюваним числом копій. Представлені моно-, ди-, три- та тетрануклеотидами у повторах. Число перевищує 10^5 на гаплоїдний геном. До тандемних повторів належать теломерні та сателітні. Теломерний повтор дуже консервативний. Практично у всього живого царства він організований однаково.

Залежно від розміру теломерні ДНК розподіляються на три класи: сателіти, мінісателіти й мікросателіти.

Диспергувані (або помірно) повторювані послідовності ДНК не організовані у великі блоки, а розсіяні по геному; представлені 10-10^4 копіями.

? Питання для самоконтролю

1. Охарактеризуйте ділянки ДНК.
2. Яка будова оперона? Укажіть назви всіх його функціональних ділянок.
3. Поясніть роль унікальної та повторюваної ДНК.

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Ген ДНК включає 450 пар нуклеотидів. Яка довжина, молекулярна маса гена і скільки амінокислот закодовано в ньому?
2. Скільки нуклеотидів містить ген ДНК, якщо в ньому закодовано 135 амінокислот. Яка молекулярна маса даного гена і його довжина?

3. Яка молекулярна маса гена і його довжина, якщо в ньому закодований білок із молекулярною масою 1500 г/моль?

4. Молекулярна маса гена ДНК становить 103500 г/моль. Визначте число нуклеотидів в і-РНК, що транскрибується з даного гена.

Примітки:

– відстань між нуклеотидами в ланцюгу молекули ДНК (довжина одного нуклеотиду) – 0, 34 нм;

– молекулярна маса одного нуклеотиду – 345 г/моль;

– середня молекулярна маса одного амінокислотного залишку приймається за 120.

ТЕМА 12. МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ТРАНСКРИПЦІЇ

Синтез РНК на матриці ДНК за участю ферменту РНК-полімерази називається **транскрипцією**. Субстратом для ферменту є рибонуклеозидтрифосфати. Синтез РНК-транскрипту відбувається в напрямку від 5’- до 3’-кінця.

При транскрипції РНК-полімераза пов’язується з ДНК та відокремлює ДНК ланцюги. РНК-полімераза потім використовує один із ланцюгів ДНК як матрицю для збору нуклеотидів РНК. Послідовність рибонуклеотидів у молекулі РНК комплементарна послідовності дезоксирибонуклеотидів одного з ланцюгів ДНК.

У еукаріотів різні види РНК синтезуються різними РНК-полімеразами: РНК-полімераза 1 – для синтезу пре-рРНК, РНК-полімераза 2 – для синтезу пре-мРНК, РНК-полімераза 3 – для синтезу пре-тРНК та 5S-рРНК. У прокаріотів – однією.

Фактори, необхідні для транскрипції:

1. Матриця, якою є неспарений ланцюг ДНК.

2. Субстрати. Для синтезу РНК необхідні чотири типи рибонуклеозидтрифосфатів: АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ. Розрив макроергічного зв'язку між α і β-залишками фосфорної кислоти забезпечує процес синтезу енергії.

3. Транскрипція відбувається за участю ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази, яка складається з 5 субодиниць (холоферменту): двох ідентичних α-субодиниць, близьких за розміром, але не ідентичних β та β'-субодиниць і σ-субодиниці. Встановлено, що β-субодиниця бере участь у зв'язуванні рибонуклеозидтрифосфатів, β'-субодиниця – у зв'язуванні ферменту із ДНК-матрицею, α-субодиниця бере участь в ініціації транскрипції. Структура ферменту без σ-фактора називається *кор*-ферментом. Цей фактор знаходить суворо визначені послідовності нуклеотидів у промоторі, сприяє більш міцному зв'язуванню полімерази зі специфічною промоторною послідовністю ДНК і бере участь у розкритті подвійної спіралі ДНК, так щоб один із ланцюгів міг слугувати матрицею.

Аби розпочалася транскрипція, РНК-полімераза пов’язується з ділянкою гена ДНК, яка називається **промотором** (рис. 59).

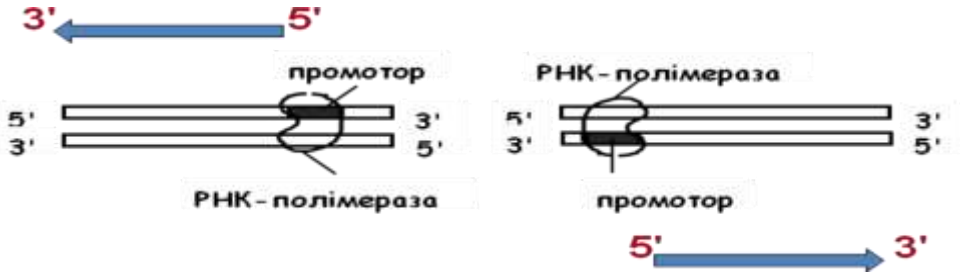


Рисунок 59 – Вибір РНК-полімеразою ланцюга ДНК

Розпізнавання РНК-полімеразою промотора показано на рис. 60.

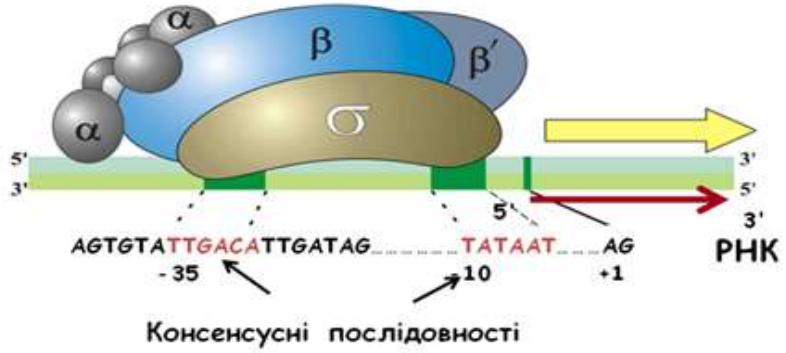


Рисунок 60 – Розпізнавання РНК-полімеразою промотора

РНК-полімераза розпізнає передусім на промоторі дві суворо визначені 6-нуклеотидні послідовності, що розташовані вище від старт-сигналу та відокремлені одна від іншої ≈17 нуклеотидами. Вони називаються *консенсусними послідовностями*, до яких відноситься бокс-Прибнова (ТАТА-бокс).

Асиметрична будова РНК-полімерази зумовлює дві можливі способи, якими фермент може бути орієнтованим відносно ДНК: кожній із цих орієнтацій будуть відповідати два протилежні напрямки руху при транскрипції. Відповідно, один із двох ланцюгів ДНК буде обиратися як **матричний** – той, з якого зчитується інформація у напрямку 3'-5' (рис. 61).

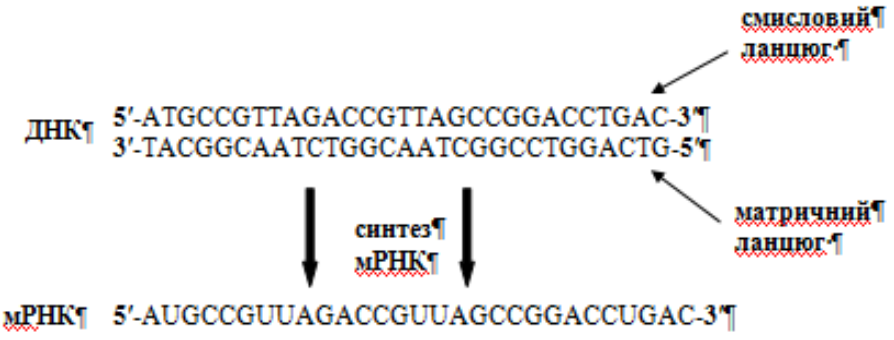


Рисунок 61 – Матричний ланцюг

Послідовність ланцюга ДНК, який комплементарний матричному, збігається з послідовністю РНК, що синтезується. Тому саме цей нематричний ланцюг називається **кодуючим,** або **змістовним.** Йогоо послідовність прийнято наводити як послідовність даного гена (відповідно, матричний ланцюг називається **антикодуючим).**

Синтез РНК включає 3 стадії: ініціацію, елонгацію та термінацію.

1. **Ініціація транскрипції** (рис. 62).

Рисунок 62 – Ініціація транскрипції

За допомогою σ-субодиниці РНК-полімераза через серію випадкових актів асоціації-дисоціації знаходить промотор і відбувається приєднання всієї молекули РНК-полімерази. Після синтезу ланцюга РНК приблизно з 8 рибонуклеотидів σ-субодиниця відділяється від холоферменту і приєднується до іншої молекули РНК-полімерази. Синтезовані ланцюги РНК мають на 5'-кінці зазвичай залишок ГТФ або АТФ (pppA, або pppГ).

2. **Елонгація транскрипції.**

На стадії **елонгації** РНК-полімераза синтезує ланцюг РНК у напрямку 5'→3' антипаралельно матричному ланцюгу ДНК. У ході транскрипції новосинтезований ланцюг РНК тимчасово утворює короткі відрізки гібридної спіралі ДНК-РНК. У міру того, як розплітається чергова ділянка ДНК, транскрибована ділянка відновлює свою двоспіральну конформацію. Максимальна швидкість елонгації становить приблизно 50 нуклеотидів за секунду.

На відміну від ДНК-полімерази РНК-полімераза не перевіряє правильність новоствореного полінуклеотидного ланцюга. Через це надійність транскрипції значно нижча, ніж надійність реплікації. Набагато більш низьку надійність синтезу РНК клітина обходить тим, що з одного гена синтезується багато копій РНК-транскриптів (рис. 63).

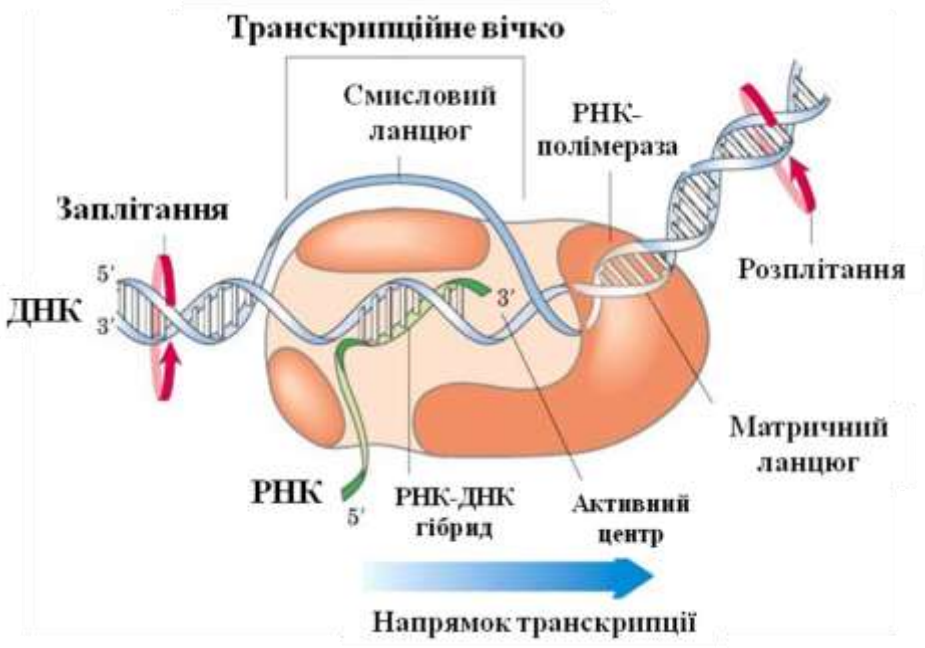


Рисунок 63 – Елонгація транскрипції

3. Термінація транскрипції.

Пройшовши структурні гени та синтезувавши поліцистронну молекулу мРНК, РНК-полімераза вступає в ділянку, яка називається **термінатором**. У термінаторній послідовності містяться ділянки, що складаються з повторюваних GC-пар, розташованих у протилежній орієнтації відносно один одного і взаємно комплементарних. У одноланцюговій мРНК, яка транскрибується, ці ділянки комплементарно з'єднуються за допомогою водневих зв'язків, утворюючи так звані «**шпильки**». За термінатором на відстані близько 20 нуклеотидів від осі шпильки розташована ділянка ДНК, що складається із залишків аденіну (ААА...) (у мРНК, відповідно, будуються UUU...). На РНК-транскрипті утворюється поліуридиновий «хвіст». Оскільки полі-U послідовність з'єднана з комплементарною їй послідовністю полі-А (у ДНК) меншою кількістю водневих зв'язків, ніж ділянки, що складаються з G-C пар, то це зумовлює від'єднання РНК-транскрипту від ДНК-матриці.

Таким чином, сигналом для початку термінації слугують GC-багаті ділянки в кінці генів:

- сила взаємодії пар Г-Ц велика (три водневі зв'язки);
- розкручування таких ділянок у ДНК відбувається важче;
- це сповільнює рух РНК-полімерази;
- синтез йде до одного з кодонів термінації;
- полімераза відокремлюється від ДНК і РНК.

У бактерій є **два механізми вивільнення РНК:**

1) ро-залежний механізм, при якому білок Rho (ро) дестабілізує водневі зв'язки між матрицею ДНК і мРНК, вивільняючи молекулу РНК (рис. 64).

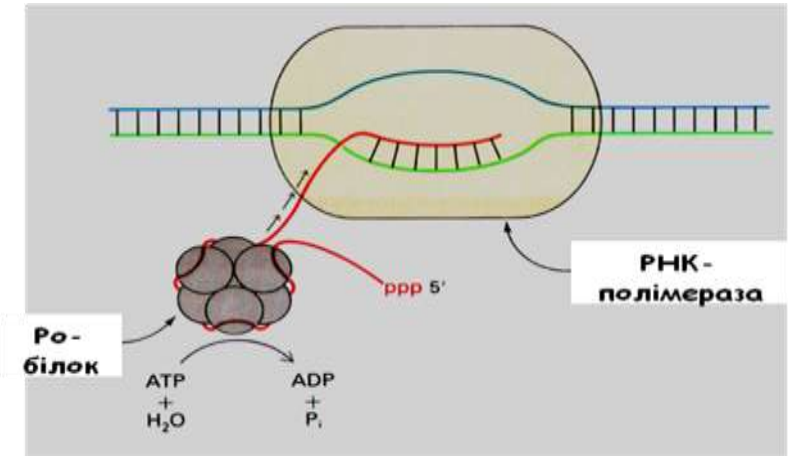


Рисунок 64 – ро-Залежний механізм вивільнення РНК

2) ро-незалежний механізм, при якому транскрипція зупиняється, коли тільки що синтезована молекула РНК формує стебло-петлю, за якою розташовані декілька урацилів (...УУУУ), що зумовлює відокремлення молекули РНК від матриці ДНК (рис. 65).

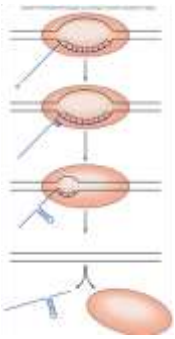


Рисунок 65 – ро-Незалежний механізм, при якому транскрипція зупиняється

Після термінації синтезу даного ланцюга РНК *кор*-фермент відділяється від ДНК-матриці і, зв'язавшись з новою молекулою σ-фактора, може розпізнавати відповідні промоторні ділянки і приступати до синтезу нової молекули РНК. Один і той самий кодуючий ланцюг можуть одночасно зчитувати кілька молекул РНК-полімерази, але процес відрегульований таким чином, що в кожен даний момент кожна молекула транскрибує різні ділянки ДНК.

Термінація транскрипції в еукаріотів менш досліджена. Вона завершується відокремленням РНК, після чого до її 3’-кінця фермент poly(A)-полімераза додає 100-200 залишків аденілової кислоти (...АААА), від кількості яких залежить стабільність даного транскрипту. Синтезовані в ядрі транскрипти називаються **гетерогенною ядерною РНК (гяРНК)**.

Після транскрипції гяРНК **редагується**, для того щоб бути функціональною мРНК. Процес дозрівання мРНК називається **процесингом**.

Редагування мРНК:

• Додавання КЕПу до 5’-кінця гяРНК (7-метилгуанозинтрифосфат) (відбувається в ядрі в процесі елонгації, коли довжина ланцюга РНК досягає близько 30 нуклеотидів);

• Додавання до 3’-кінця полі-А-послідовності (полі-А-хвіст) із 100-200 залишків аденілової кислоти;

• Видалення зайвих послідовностей **(сплайсинг).**

Сплайсинг – вирізання інтронів (нефункціональні ділянки в ДНК) і зшивання екзонів (кодуючі ділянки ДНК) (рис. 66).

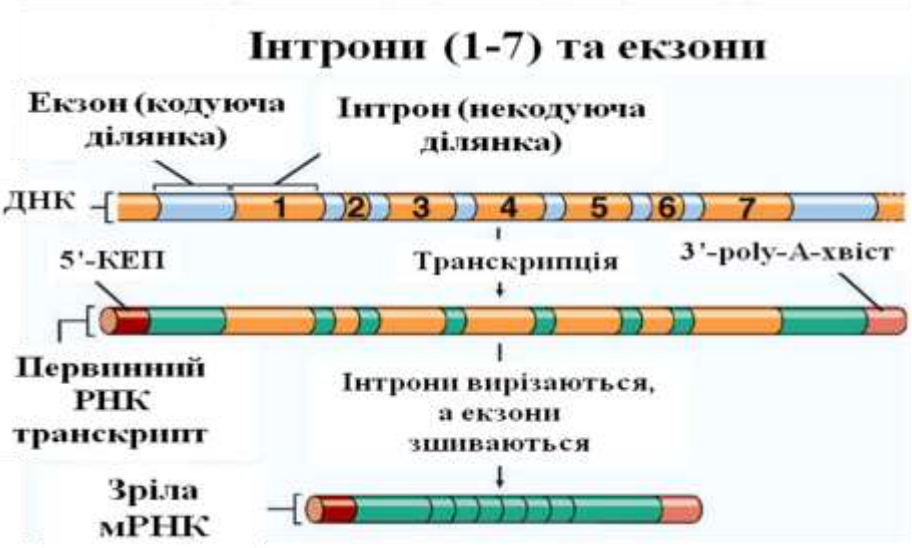


Рисунок 66 – Результат транскрипції в еукаріотів

Зріла мРНК виходить з ядра через пори і спрямовується до рибосом.

? Питання для самоконтролю

1. Поясніть особливості будови мРНК.
2. Назвіть та охарактеризуйте етапи транскрипції.
3. Обґрунтуйте різницю транскрипції в клітинах прокаріотів та еукаріотів.
4. Розкрийте сутність процесингу мРНК.

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Фрагмент ланцюга ДНК має таку послідовніст: ТГААЦТГАГГТЦГАЦ. Визначте послідовність нуклеотидів і-РНК, що транскрибується із вказаного фрагмента.

2. Правий ланцюг ДНК має таку структуру АТГГТЦАТЦ. Визначте структуру і-РНК, транскрипція якої відбулася з лівого ланцюга ДНК.

3. Фрагмент кодуючого ланцюга ДНК з довжиною 6000 нуклеотидів містить 40 % інтронів. Визначте кількість нуклеотидів у зрілій молекулі і-РНК.

4. **Задача**.

Первинний транскрипт гена овальбуміну містить 7700 нуклеотидів, але зріла мРНК, яка транслюється в рибосомі, містить 1872 нуклеотиди. Поясніть різницю в розмірах первинного транскрипту та зрілої мРНК. Складіть схему процесингу гяРНК, враховуючи те, що ген овальбуміну курчати містить 8 екзонів і 7 інтронів.

ТЕМА 13. МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ТРАНСЛЯЦІЇ

Трансляція – це синтез білка на рибосомах відповідно до інформації мРНК.

Фактори трансляції:

1. 20 амінокислот.
2. Набір тРНК (не менше 20, а всього їх існує до 50).
3. Наявність мРНК (іРНК), які кодують послідовність амінокислот у білку.
4. Рибосоми – органели, в яких відбувається синтез білків.
5. Ферменти, що каталізують різні етапи синтезу білка:

а) аміноацил-тРНК-синтази або кодази. Фермент містить три центри: для зв'язування АТФ, амінокислот і тРНК. Він визначає точність і швидкість трансляції та є регуляторним;

б) пептидилтрансфераза каталізує транспорт поліпептиду з пептидильного в аміноацильний центр;

в) пептидилтранслоказа пересуває рибосому на один триплет.

6. Білкові фактори:

– фактори ініціації: IF1, IF2, IF3 у прокаріотів; eIF1, eIF2 до 10 в еукаріотів;

– фактори елонгації: EF1, EF2, EF3 у прокаріотів; EF-T4; EF-TS; EF-G – в еукаріотів;

– фактори термінації: RF1, RF2 у прокаріотів, eRF1, eRF3 в еукаріотів.

7. ГТФ, АТФ – джерела енергії та іони Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}.

У **прокаріотів**, оскільки в них немає відділеного мембраною від цитоплазми ядра, процеси транскрипції та трансляції у часі не відокремлені. Рибосома може приєднуватися до 5'-кінця мРНК, яка ще синтезується, і таким чином розпочинати синтез білка (рис. 67).

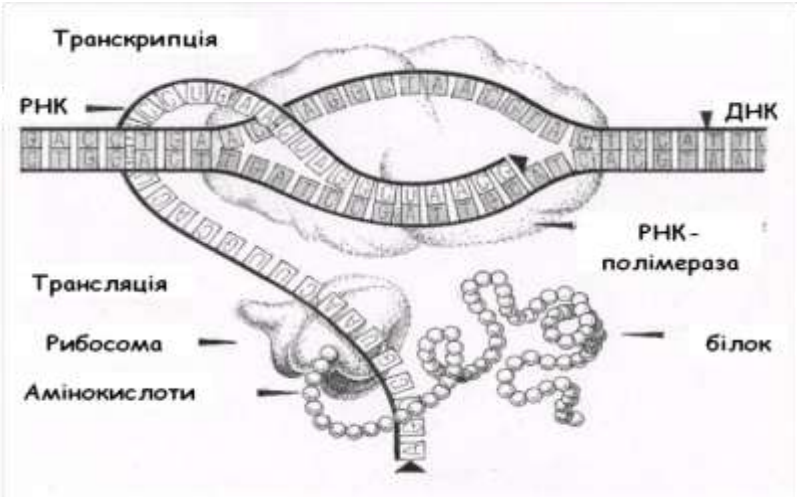


Рисунок 67 – Схематичне зображення особливостей транскрипції та трансляції у прокаріотів

В **еукаріотів** процеси транскрипції та трансляції у часі відокремлені. Синтез білка не розпочнеться доти, доки до цитоплазми з ядра не надійде мРНК (рис. 68).

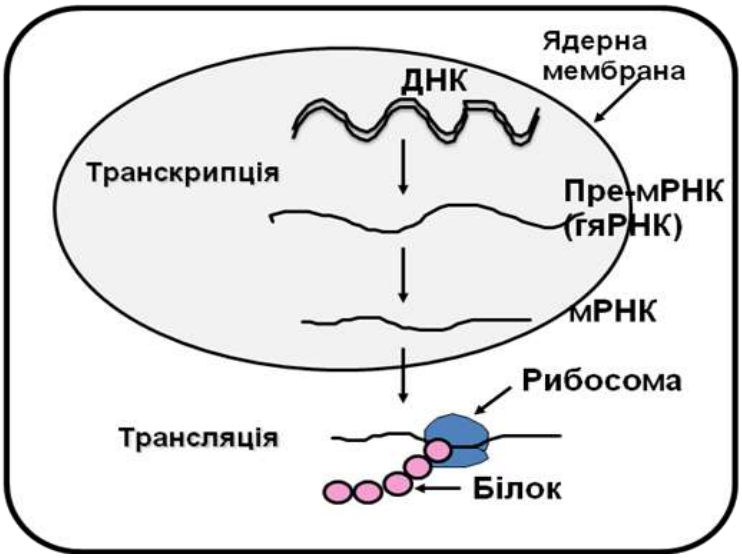


Рисунок 68 – Схематичне зображення особливостей транскрипції та трансляції в еукаріотів

Генетична інформація, що зберігається в ДНК, передається на РНК.

Молекулярні механізми білкового синтезу в основному є спільними для всіх живих організмів. Зчитування інформації, записаної в послідовності нуклеотидів мРНК, та її переклад в амінокислотний текст розпочинається зі стартового кодона, де при ініціації трансляції відбувається остаточне збирання головного пристрою трансляції – рибосоми – комплексу рибосомної РНК і білків. Вона сканує нуклеотидну послідовність мРНК, рухаючись уздовж неї кроками по три нуклеотиди від 5'- до 3'-кінця під час елонгації трансляції до стоп-кодона, де відбувається термінаця процесу. Під час сканування рибосома працює як декодуючий пристрій, забезпечуючи розпізнання кодонів комплементарними щодо них триплетами (антикодонами) у складі тРНК (транспортні РНК), і як каталізатор процесу синтезу пептидного зв'язку між амінокислотами. Певний антикодон відповідає амінокислоті певного типу, яку несе на собі тРНК.

Внутрішньоклітинний компонент, в якому сходяться і взаємодіють всі елементи механізму трансляції білка, називається **рибосомою**, яка:

- складається з великої та малої субодиниць;
- включає рРНК (40%) та білки (60%);
- у малій субодиниці є дві ділянки для приєднання тРНК – Р і А та ділянка для приєднання мРНК (рис. 69).

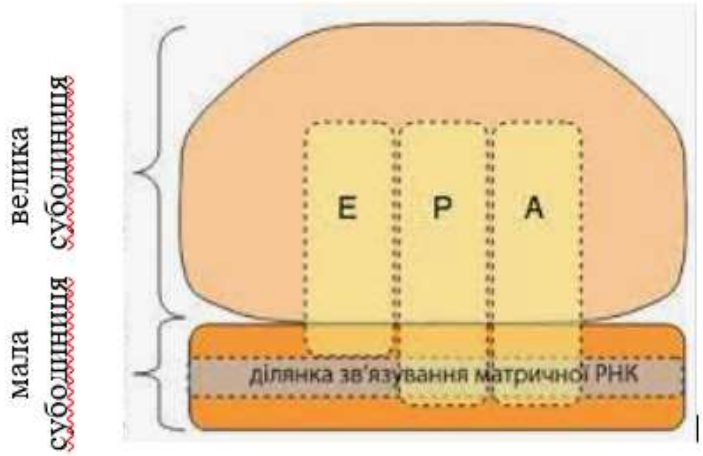


Рисунок 69 – Схематичне зображення особливостей будови рибосоми:
А – аміноацил-тРНК-ділянка зв'язування,
Р – пептидил-тРНК-ділянка зв'язування,
Е – ділянка відокремлення тРНК від рибосоми

Безліч рибосом можуть одночасно транслювати один і той самий ланцюг мРНК, утворюючи **полісоми** (полірибосоми).

Особливості будови мРНК та генетичний код.

Матрична РНК (мРНК):

- має довгі прямі ланцюги;
- є копією гена ДНК;
- це програма (матриця), за якою будується певний білок;
- складається від 500 до1000 нуклеотидів;
- послідовність із 3-х нуклеотидів – кодон;
- AUG – старт кодон, який кодує амінокислоту метіонін;
- UAA, UAG та UGA – стоп кодони.

Ділянки мРНК В еукаріотів показані на рис. 70.

Інформація про послідовність амінокислот у поліпептидному ланцюзі записана на мРНК як трилітерний нуклеотидний код (триплетний код). Триплети, або кодони – це послідовність 3-х мононуклеотидів, яка несе інформацію про включення в білок однієї з 20 амінокислот. У ДНК містяться 4 типи нуклеотидів, а кількість можливих триплетів становить 64, цього з надлишком вистачає для кодування 20 амінокислот. Диплетний код може забезпечити кодування тільки 16 амінокислот.

Рисунок 70 – Ділянки мРНК В еукаріотів:
1 – КЕП; 2 – 5′-нетранслююча ділянка; 3 – ініціюючий кодон (АУГ);
4 – частина, яка кодується; 5 – кодон, який термінує (УАГ, УГА, УАА);
6 – 3′-нетранслююча ділянка; 7 – полі-(А) фрагмент

Властивості генетичного коду:

– **триплетність** – кожна амінокислота кодується 3 нуклеотидами (кодоном);

– **виродженість** (надмірність) – кожна амінокислота кодується декількома триплетами (на аргінін, лейцин і серин припадає по 6 кодонів і тільки на метіонін і триптофан – по одному триплету). Послідовність перших двох нуклеотидів визначає в основному *специфічність* кожного кодона, третій нуклеотид має менше значення (ця властивість підвищує стійкість генетичної інформації до впливу несприятливих чинників зовнішнього і внутрішнього середовища). Виродженість генетичного коду зменшує негативний вплив мутацій. Підраховано, що 67% мутацій за третім нуклеотидом у триплеті не змінюють змісту кодона, оскільки кодони однієї амінокислоти відрізняються лише останнім (третім) нуклеотидом;

– **специфічність** – кожному кодону відповідає тільки 1 амінокислота;

– **дискретність** – нуклеотид, що входить до складу одного триплету, не може входити до складу сусіднього;

– **односпрямованість** – зчитування інформації відбувається в напрямку 5'→3';

– **колінеарність –** відповідність послідовності амінокислот у білку послідовності триплетів у гені (колінеарність гена в ДНК переривається інтронами);

– **універсальність** – відповідність амінокислот триплетному коду в усіх живих організмів;

– **безперервність** – між кодонами немає розділових знаків.

Серед 64 триплетів мРНК виокремлюють 3 типи: 1) **ініціюючі** – АУГ і ГУГ (кодують включення метіоніну в еукаріотів або N-формілметіоніну в прокаріотів, якщо знаходяться на початку мРНК; якщо знаходяться всередині – то є смисловими), визначають стадію початку (ініціації) синтезу білкової молекули; 2) **смислові кодони** (61) – кодують включення амінокислот у поліпептидний ланцюг, що синтезується; 3) **термінуючі кодони** (УАА, УГА, УАГ), які не кодують включення амінокислот; це нонсенс-кодони, які визначають завершення (термінацію) синтезу поліпетидного ланцюга.

Процес біосинтезу білка складається з 4-х основних етапів, кожен з яких потребує низки компонентів.

Активація амінокислот.

На цьому етапі, який протікає в цитозолі, а не в рибосомі, кожна з 20 амінокислот ковалентно приєднується до певної тРНК, використовуючи для цього енергію АТФ. Значення етапу: 1) активація СООН-групи амінокислот, яка може брати участь в утворенні пептидного зв'язку; 2) амінокислоти самі не можуть розпізнати кодони мРНК, а переносяться до рибосом специфічними тРНК, які й розпізнають кодони мРНК і виконують тим самим роль адапторних молекул.

Необхідні компоненти:

1) 20 амінокислот; 10 амінокислот є незамінними та мають надходити з їжею; якщо відсутня хоча б одна амінокислота, процес біосинтезу білка припиняється;

2) ферменти аміноацил-тРНК-синтетази;

3) тРНК;

4) АТФ;

5) Mg^{2+}.

Активація амінокислот та їх приєднання до тРНК здійснюється специфічними **аміноацил-тРНК-синтетазами**, які ще називаються активуючими ферментами. Загальний вигляд реакції може бути виражений рівнянням:

Амінокислота + тРНК + АТФ + Mg^{2+} → Аміноацил-тРНК + АМФ + PPi (рис. 71).

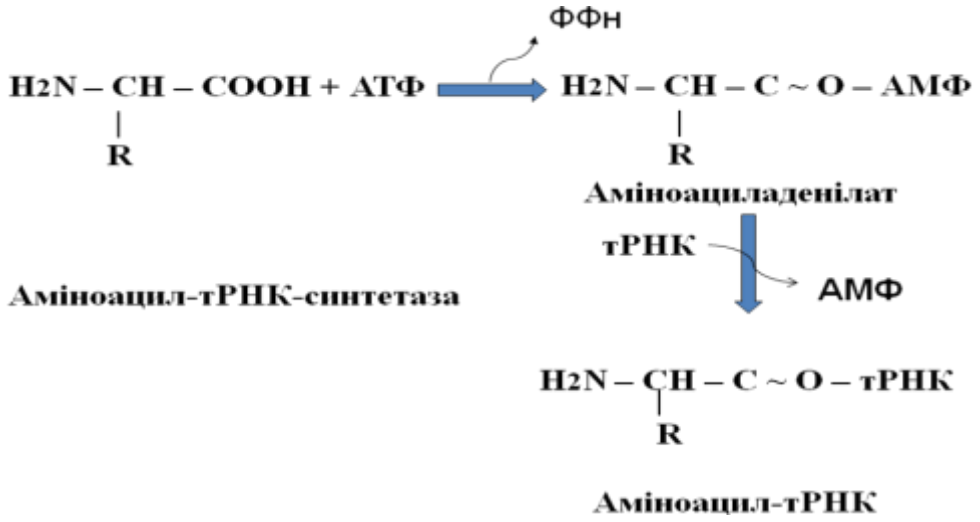


Рисунок 71 – Утворення аміноацил-тРНК

1. На першій стадії в активному центрі ферменту в результаті взаємодії АТФ і амінокислоти утворюється пов’язаний із ферментом аміноациладенілат.

2. На другій стадії аміноацильний залишок переноситься з аміноациладенілату, пов’язаного з ферментом, на 3'-гідроксильну групу кінцевого залишку аденіну в молекулі тРНК.

3. Утворений у процесі активації неорганічний пірофосфат гідролізується пірофосфатазою до 2-х молекул ортофосфату.

Таким чином, на активацію кожної амінокислоти витрачаються два високоенергетичні фосфатні зв'язки (один – на утворення ефірного зв’язку аміноацил-тРНК, інший – зрушує рівновагу реакції в напрямку утворення продукту), що робить сумарну реакцію активації амінокислот практично незворотною.

Фермент аміноацил-тРНК-синтетаза володіє специфічністю до амінокислоти і тРНК. Фермент має 4 центри зв'язування: 1) для тРНК; 2) для АТФ 3) для амінокислоти; 4) для води. Гідролітична активність ферменту забезпечує правильність приєднання амінокислоти до тРНК.

Власне **трансляція** відбувається на рибосомах і включає в себе такі стадії: *ініціацію*, *елонгацію* і *термінацію* (рис. 72):

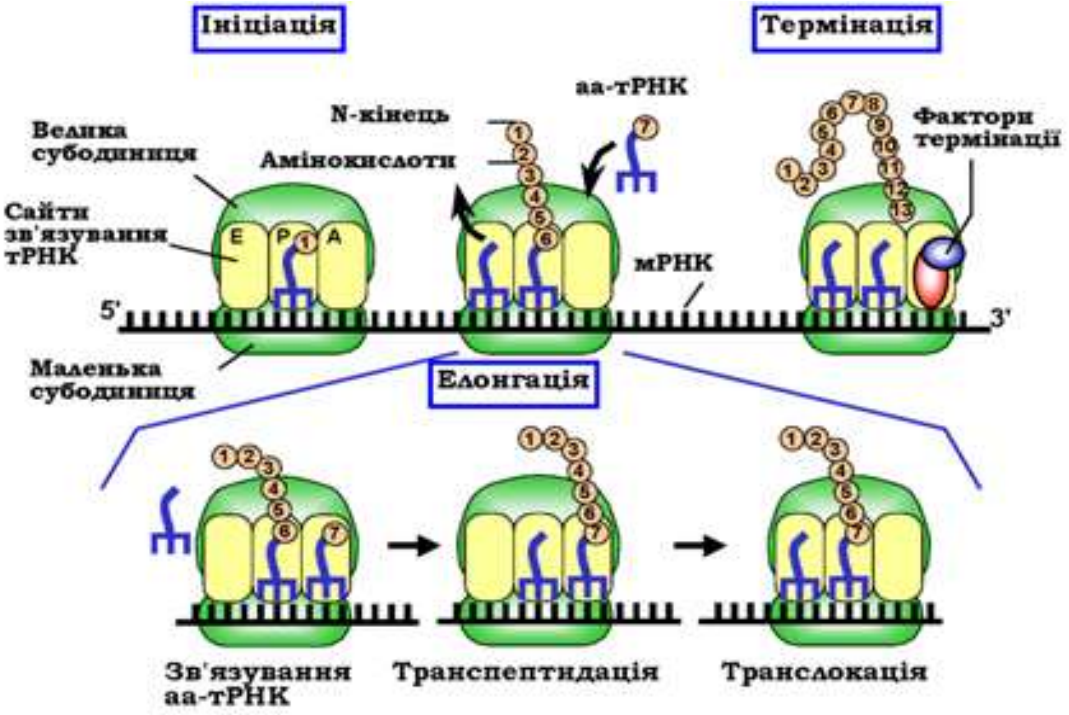


Рисунок 72 – Схема процесу трансляції

Особливості ініціації трансляції подано на рис. 73: приєднання до Р-ділянки ініціаторної-тРНК, що пов’язана з IF; мала субодиниця розпізнає КЕП і приєднується до 5’-кінця мРНК-транскрипту; переміщення її вздовж ланцюга мРНК і пошук першого старт-кодона AUG, відокремлення IF; приєднання великої субодиниці.

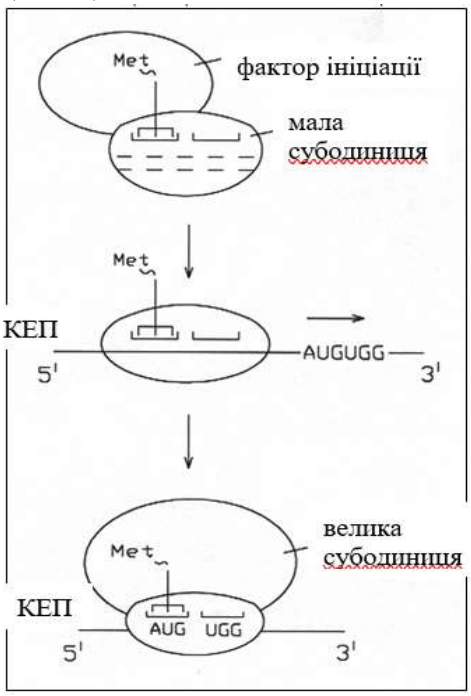


Рисунок 73 – Схема ініціації трансляції

Особливості елонгації трансляції подано на рис. 74: зв'язування нової аміноацил-тРНК в А-ділянці; карбоксильний кінець амінокислоти відокремлюється в Р-ділянці від молекули тРНК та утворює пептидний зв'язок з амінокислотою, приєднаною до молекули тРНК в А-ділянці (фермент пептидилтрансфераза); нова пептидил-тРНК переноситься в Р-ділянку; одночасно рибосома рухається вздовж мРНК на 3 нуклеотиди; вільна тРНК повертається у цитоплазму; амінокислоти утворюють пептидний зв'язок.

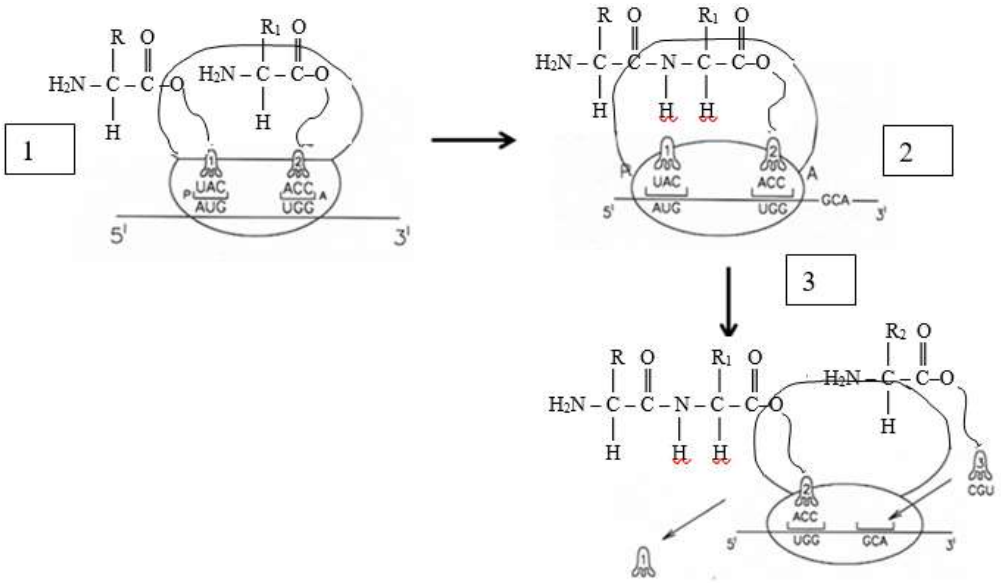


Рисунок 74 – Схема елонгації трансляції

Особливості термінації трансляції подано на рис. 75: рибосома доходить до одного із стоп-кодонів; цитоплазматичні білки (фактори вивільнення) пов'язуються із стоп-кодоном, який досяг А-ділянки, що обумовлює зміну активності пептидилтрансферази; пептидилтрансфераза приєднує воду до пептидил-тРНК; білок відокремлюється від тРНК і спрямовується в цитоплазму; рибосома розпадається.

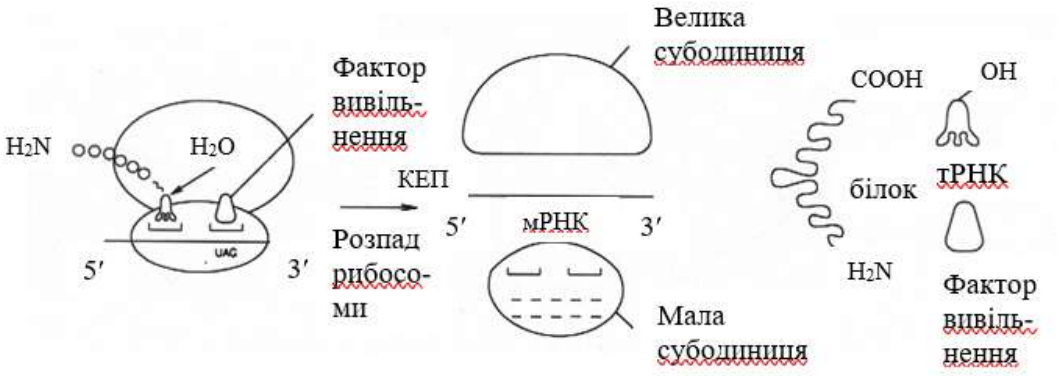


Рисунок 75 – Схема термінації трансляції

Кінцевий продукт трансляції – білок первинної структури (рис. 76).

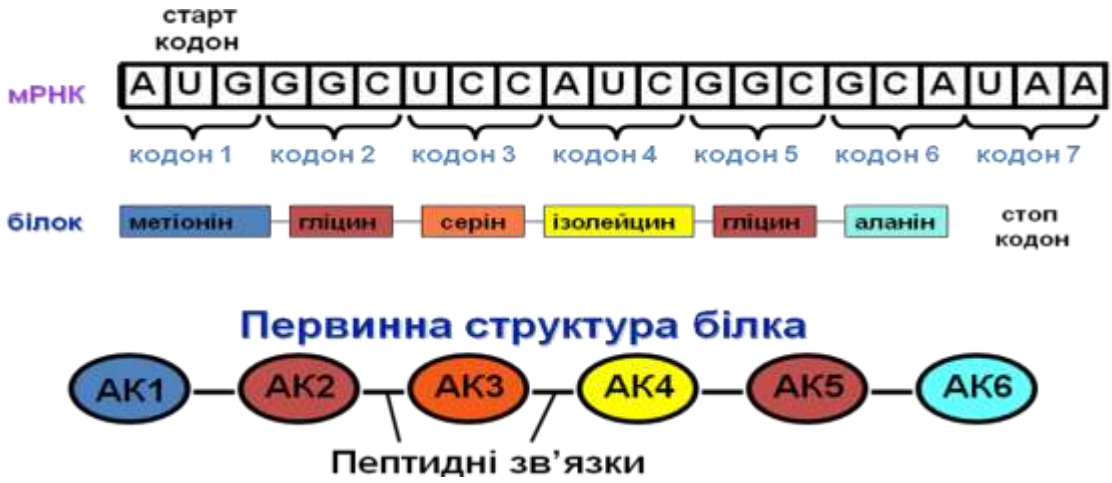


Рисунок 76 – Кінцевий продукт трансляції – білок первинної структури

У процесі синтезу білка триплети зчитуються з нуклеотидного тексту один за одним: сусідні триплети не перекриваються, між ними немає проміжків. Будь-яка послідовність нуклеотидів може бути прочитана трьома різними способами, тобто вона містить три рамки зчитування. Нуклеотидна заміна може зумовити зміну змісту кодона – амінокислотну заміну, а видалення хоча б одного нуклеотиду може привести до зміщення рамки зчитування, тобто заміни змісту всіх кодонів, розташованих нижче такого втраченого нуклеотиду (чи ділянки, довжина якої не є кратною трьом).

? Питання для самоконтролю

1. Поясніть, яким чином утворюється аміноацил-тРНК.
2. Охарактеризуйте етап ініціації трансляції.
3. Охарактеризуйте етап елонгації трансляції.
4. Охарактеризуйте етап термінації трансляції.

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Ділянка ланцюга ДНК має послідовність нуклеотидів АГЦГТТ АЦГТАГ. Визначте послідовність антикодонів т-РНК.
2. Фрагмент гена ДНК має таку послідовність нуклеотидів ТЦГГТЦАА ЦТТАГЦТ. Визначте послідовність нуклеотидів і-РНК та амінокислот у поліпептидному ланцюзі білка.
3. У синтезі білкової молекули взяли участь 145 молекул т-РНК. Визначте кількість нуклеотидів в і-РНК, гені ДНК і кількість амінокислот у синтезованій молекулі білка.
4. У синтезі білка взяли участь молекули т-РНК з антикодонами ЦАГ, УАА, ЦЦА, ГГГ, ЦУА. Визначте нуклеотидну послідовність у фрагменті гена ДНК і послідовність амінокислот у ділянці синтезованого білка.

ТЕМА 14. РЕПЛІКАЦІЯ ДНК

ДНК є макромолекулою, яка переносить генетичну інформацію від покоління до покоління.

Реплікація – процес передачі генетичної інформації від ДНК до ДНК. Протікає в S-фазу клітинного циклу. Реплікація відбувається напівконсервативним способом. Напівконсервативний спосіб означає, що ланцюги материнської молекули ДНК розходяться і кожний із них є матрицею для синтезу нової комплементарної послідовності. Дві двоспіральні молекули ДНК, що утворилися, кожна з яких складається з одного батьківського і одного знову синтезованого комплементарного ланцюга, розподіляються між двома дочірніми клітинами. Таким чином, кожна з дочірніх клітин отримує інформацію, ідентичну тій, якою володіла батьківська клітина.

Механізм реплікації. Механізм реплікації у прокаріотів вивчений краще, ніж в еукаріотів. Основні умови та компоненти реплікації ДНК однакові у прокаріотів, таких як *E. coli*, і еукаріотів, включаючи людину. Основне функціональне значення процесу реплікації ДНК полягає в постачанні нащадкам генетичної інформації. Для забезпечення генетичної стабільності організму та виду ДНК повинна реплікуватися повністю і з дуже високою точністю.

Умови, необхідні для реплікації:

1. **Матриця**, якою є неспарений ланцюг ДНК.

2. **Субстрати** синтезу, якими є дезоксинуклеозидтрифосфати (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ).

3. **Ферменти і білкові фактори**, що беруть участь у синтезі ДНК:

1) ДНК-полімерази I та III (у прокаріотів), які беруть участь в утворенні 3', 5'-фосфодиефірних зв'язків і володіють 3'→5' і 5'→3' екзонуклеазними активностями; ДНК-полімераза II є мінорною ДНК-полімеразою, яка може брати участь у процесі репарації. В еукаріотів знайдено п'ять типів ДНК-полімераз: α, ε, β, γ і δ;

2) **rep-білок** (хеліказа) – розплітає подвійну спіраль ДНК;

3) **ДНК-зв'язувальний білок** – стабілізує розплетені одноланцюгові ділянки ДНК і підвищує активність хелікази;

4) **ДНК-гіраза (топоізомераза II)** вводить негативні супервитки в ДНК, виконуючи функцію шарніра при просуванні реплікативних вилок;

5) **праймаза (ДНК-залежна РНК-полімераза)** синтезує РНК-затравки (праймер);

6) **dnaB-білок,** що надає можливість праймазі ініціювати синтез фрагмента РНК – *праймера*;

7) **ДНК-лігаза** – з'єднує кінці фрагментів ДНК.

Усі ферменти й білкові фактори, що беруть участь в реплікації, утворюють макромолекулярний комплекс, який називається **реплісомою.**

Розрізняють 3 стадії реплікації: ініціація, елонгація та термінація.

Стадія ініціації:

1. Реплікація ДНК розпочинається одночасно в багатьох точках (їх кількість може перевищувати тисячу) – **точках ініціації** (оріджин) (рис. 77).

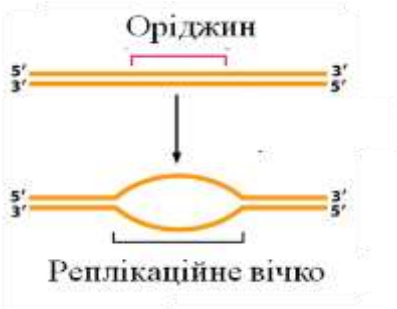


Рисунок 77 – Початок реплікації

2. До точок ініціації приєднуються ферменти *хелікази* (helix – спіраль), які розплітають короткі ділянки ДНК. На поділ кожної пари основ витрачається енергія гідролізу двох молекул АТФ (рис. 78).

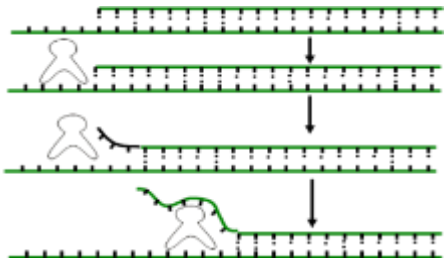


Рисунок 78 – Розрив водневих зв’язків ДНК-хеліказою у молекулі ДНК

3. Як тільки невелика ділянка ДНК розплітається, до кожного з розділених ланцюгів міцно приєднуються кілька молекул **ДНК-зв’язувального білка (SSB білок** – *single strand binding*), які перешкоджають утворенню комплементарних пар і зворотному відновленню ланцюгів **(шпильок)** (рис. 79).

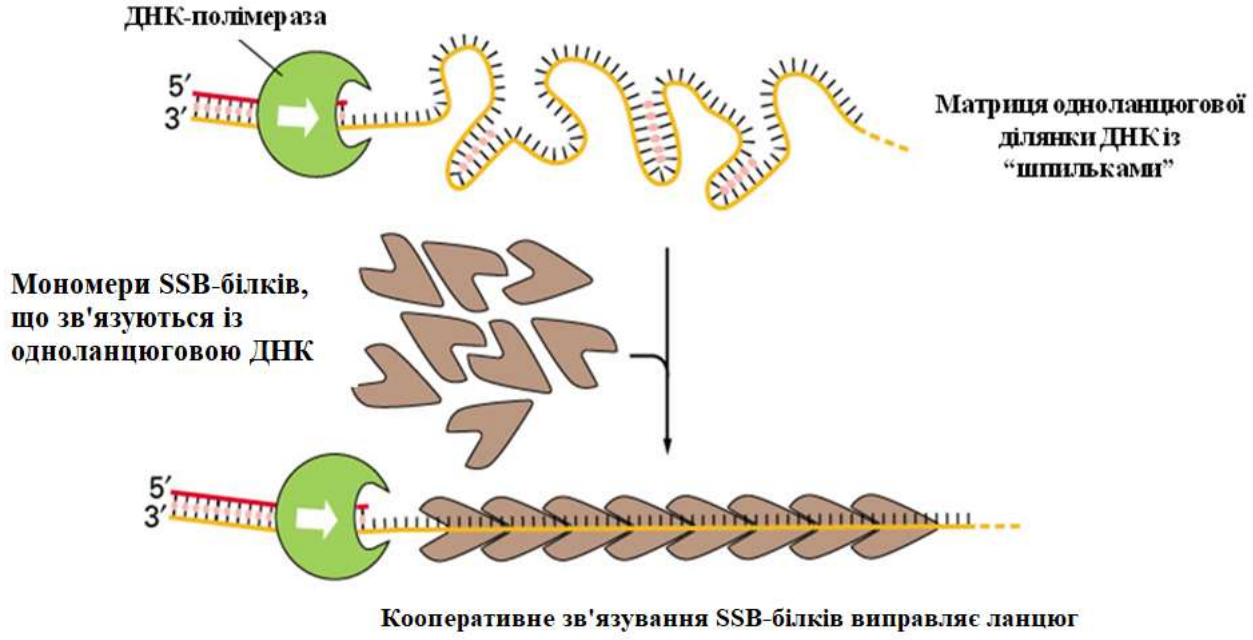


Рисунок 79 – Дестабілізуючі білки

4. У прокаріотів хеліказі допомагає фермент **ДНК-гіраза** (сімейство топоізомераз). Гіраза виконує функцію шарніра: він забезпечує короткочасний

розрив одного з ланцюгів ДНК, який швидко відновлюється з високою точністю після одного або декількох обертів навколо другого ланцюга. Цей фермент не тільки дозволяє ДНК обертатися, але й активно закручує її в напрямку, який сприяє розплітанню ланцюгів матриці.

У результаті розплітання молекули ДНК утворюються **реплікативні бульбашки,** кожна з яких складається з 2-х реплікативних вилок. Процес реплікації відбувається в обох реплікативних вилках, але має протилежний напрямок, що обумовлено антипаралельністю молекули ДНК.

5. У кожній реплікативній вилці виділяють 3'- і 5-'кінці. Синтез дочірніх ниток ДНК відбувається завжди в напрямку 5'→3'. Стадія ініціації завершується синтезом **праймера** – короткого фрагмента РНК, що складається з 10 рибонуклеотидів, комплементарних одному з ланцюгів матричної ДНК.

Синтез праймера здійснюється ферментом **ДНК-залежною-РНК-полімеразою,** або **праймазою.** Синтез праймера необхідний для ферменту ДНК-полімерази III, який не може почати синтез дочірньої нитки ДНК на «порожньому» місці. 3'-ОН група кінцевого рибонуклеотиду праймера слугує затравкою для синтезу ДНК під дією ДНК-полімерази III. ДНК-полімераза, виявляючи недобудований ланцюг, прикріплюється на нього і добудовує, усуваючи за напрямком руху SSB-протеїни зі свого шляху (рис. 80).

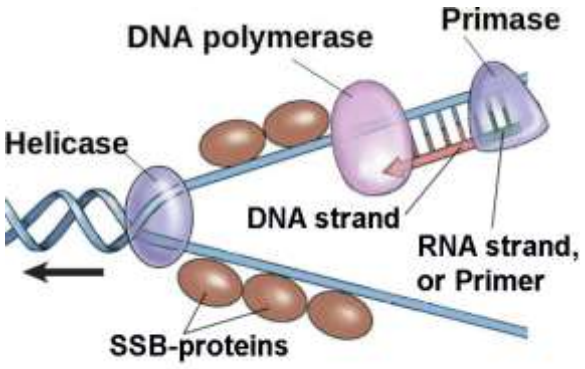


Рисунок 80 – Початок синтезу дочірнього ланцюга ДНК

Стадія елонгації:

1. До 3'-ОН групи праймера приєднується ДНК-полімераза III, яка за принципом комплементарності синтезує дочірній ланцюг ДНК у напрямку 5'→3'.

Точність синтезу визначається тим, що фермент ДНК-полімераза III каталізує утворення фосфодиефірного зв’язку тільки в тому випадку, якщо основа попереднього нуклеотиду комплементарна відповідній основі матриці. Якщо не відбулося утворення водневих зв’язків між приєднаним нуклеотидом і матрицею, фермент повертається, вирізає неправильний нуклеотид з 3'-кінця ланцюга за рахунок екзонуклеазної активності, після чого ДНК-полімераза продовжує приєднувати правильні нуклеотиди в напрямку 5'→3'. У результаті досягається висока точність матричного синтезу (не більше однієї помилки на

1-10 мільярдів нуклеотидних залишків). Якщо напрямок синтезу дочірнього ланцюга ДНК і напрямок руху реплікативної вилки збігаються, то ланцюг синтезується безперервно і називається *лідируючим* (рис. 81).

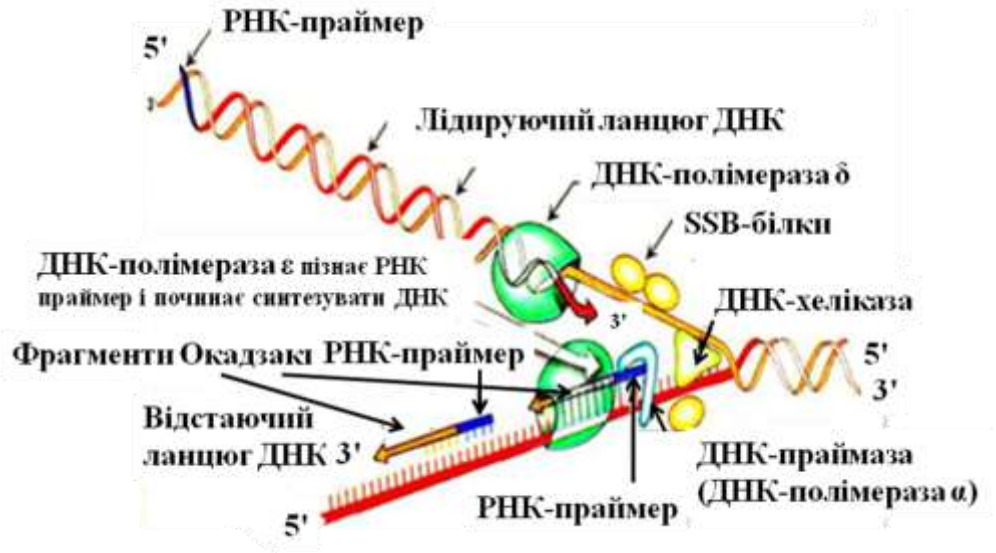


Рисунок 81 – Реплікативна вилка

2. Якщо напрямок синтезу ДНК і рух реплікативної вилки не збігаються – ланцюг синтезується фрагментами і називається *відстаючим.* Фрагменти, синтезовані у цьому ланцюзі, називаються **фрагментами Окадзакі** і складаються з 100-200 нуклеотидів у прокаріотів і 1000-2000 нуклеотидів в еукаріотів.

3. Після закінчення синтезу фрагментів Окадзакі РНК-затравка (праймер) видаляється за допомогою 5'→3' екзонуклеазної активності ДНК-полімерази I. У міру відщеплення рибонуклеотидних мономерів кожен з них заміщається на відповідний дезоксирибонуклеотид під час полімеразної реакції, що здійснюється ДНК- полімеразою I (при цьому як затравка використовується 3'-кінець попередніх фрагментів Окадзакі). Новий фрагмент Окадзакі приєднується до відстаючого ланцюга ДНК за допомогою фермента **ДНК-лігази.** Джерелом енергії для цієї реакції в еукаріотів є АТФ. ДНК-лігаза не може з'єднати дві молекули одноланцюгової ДНК. Ланцюги ДНК, що з'єднуються ДНК-лігазою, повинні бути частиною дволанцюгової молекули ДНК.

На кожному матричному ланцюзі ДНК знаходиться затиск, здатний ковзати уздовж цього ланцюга, до якого прикріплюється ДНК-полімераза. У складі реплісоми є два затиски – по одному для кожного ланцюга. Обидва затиски розкриває, накладає на ланцюг і закриває один клемп-Лоудер, прикріплений до хелікази, що розплітає нитки матричної ДНК. На лідируючий ланцюг затиск накладається тільки один раз, а от побудова відстаючого ланцюга потребує постійної участі клемп-Лоудер: він приєднує затиск на початку кожного фрагмента Окадзакі, знімає його тоді, коли фрагмент добудований, і переносить до початку наступного фрагмента (рис. 82).

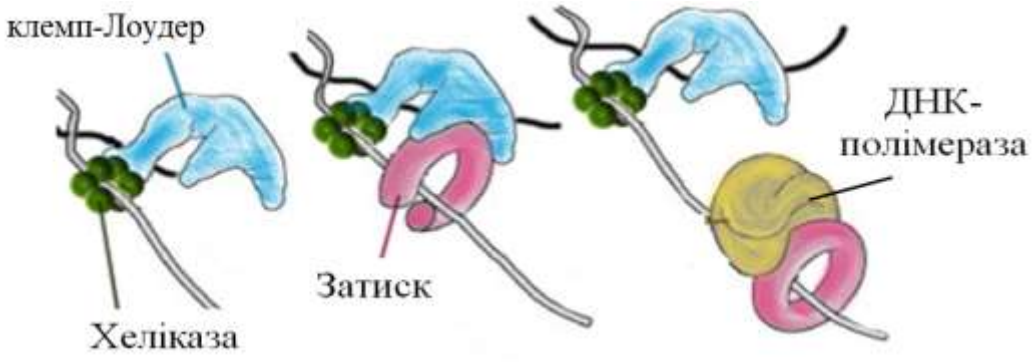


Рисунок 82 – Механізм роботи комплексу клемп-Лоудера

Загальні механізми реплікації в еукаріотів аналогічні таким у прокаріотів. Як і у прокаріотів, реплікація в еукаріотів відбувається одночасно на обох ланцюгах. Одиницею реплікації в еукаріотів є **реплікон,** розміри якого коливаються від 50 до 120 мкм. У клітинах ссавців міститься від 10000 до 100000 репліконів. Основним ферментом синтезу ДНК в еукаріотів є ДНК-полімераза δ. Функції ДНК-полімерази β подібні до ДНК-полімерази I прокаріотів. ДНК-полімераза γ каталізує процеси полімеризації нуклеотидів у мітохондріях. Для реплікації геному людини необхідно близько 8 годин. Швидкість реплікації у *E. coli* складає 1000 пар основ за секунду. Реплікація в еукаріотів відбувається в 10 разів повільніше, ніж у прокаріотів і становить 100 пар основ за секунду. Кожний реплікон синтезується приблизно 1 годину. Низька швидкість реплікації в еукаріотів обумовлена, ймовірно, формуванням нуклеосом і наявністю хромосомних білків. Гетерохроматин реплікується повільніше, ніж еухроматин. Окрім того, ДНК-полімерази еукаріотів менш активні, порівняно з прокаріотичними ферментами.

На кінцях хромосом еукаріотів знаходяться спеціальні повторювані послідовності ДНК – **теломери** (теломерна ДНК).

У різних видів живого **теломери** мають:

1) однакову будову;
2) завжди розташовані на 3'-кінці;
3) складаються з багатьох розташованих один за одним повторів (до тисячі) однієї короткої послідовності - **(5') ГГТТАГ (3')**, що не несуть генетичної інформації. Якщо відбувається втрата деякої частини даних повторів, це не позначається на функціонуванні геному;
4) для підтримання довжини ДНК використовується спеціальний фермент – **теломераза**, що відновлює теломери з 3'-кінця після закінчення синтезу відстаючого ланцюга при реплікації.

(5′) ЦТААЦЦ-…-ТААЦЦ----….----ГГТТАГ - … - ГГТТАГ (3′)
(3′) ГАТТГГ -… -ГАТТГГ----….----ЦЦААТЦ-…-ЦЦААТЦ (5′)

Функції теломер:

1. Механічна функція:

а) участь у фіксації хромосом до ядерного матриксу, що важливо для правильної орієнтації хромосом у ядрі;

б) теломери скріплюють собою кінці сестринських хроматид.

2. Стабілізаційна функція:

а) наявність теломер у разі відсутності теломерази захищає від недореплікації генетично значущі відділи ДНК;

б) при теломеразній активності є можливість стабілізації кінців розірваних хромосом.

3. Вплив на експресію генів. Активність генів, розташованих поряд із теломерами знижена. Такий ефект називається «транскрипційним мовчанням», або **сайленсінгом**. При значному укороченні теломер ефект положення зникає і прителомерні гени активуються.

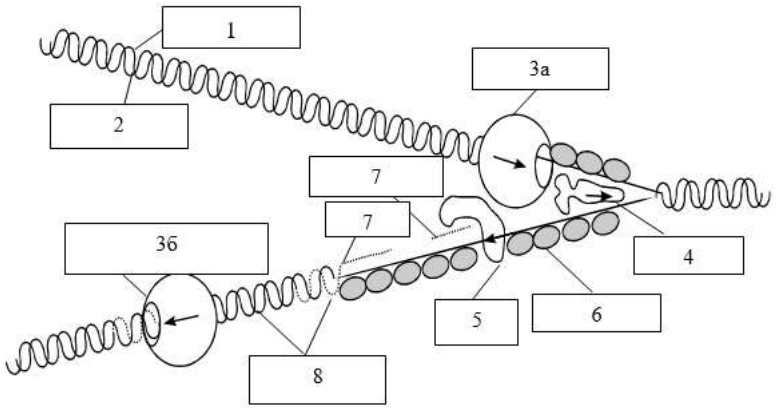
4. «Рахункова» функція. Теломерні відділи ДНК є своєрідним часовим пристроєм, який відраховує кількість ділень клітини після зникнення теломеразної активності. Кожний поділ призводить до укорочення теломери на 50-65 н.п. Досягаючи критично малої довжини, теломери втрачають можливість виконувати всі або більшість функцій. Порушується клітинний цикл, і в кінцевому підсумку клітина гине.

? Питання для самоконтролю

1. Назвіть функції ферментів реплікації.
2. Поясніть, як утворюється реплікативна вилка. Яка її будова?
3. Охарактеризуйте механізм синтезу ланцюга ДНК, що лідирує, та ланцюга ДНК, що відстає.
4. Розкрийте особливості реплікації у про- та еукаріотів.
5. Яку роль відіграють теломери?

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Назвіть ферменти та білки, які беруть участь у реплікації.
2. Укажіть назви цифрових позначень у схемі реплікації:



3. Правий ланцюг ДНК має таку послідовність нуклеотидів ЦТАТАГТААЦАА. Визначте структуру фрагмента білка, синтезованого за лівим ланцюгом ДНК.

4. Під час реплікації молекули ДНК на кодуючому ланцюзі ТТЦАГАЦТЦТААГАТ відбулося подвоєння четвертого триплета. Поясніть, як зміниться структура молекули білка.

ТЕМА 15. ВІТАМІНИ

Вітаміни – низькомолекулярні органічні речовини різної хімічної будови.

Вітаміни використовуються клітинами організму в невеликих кількостях; не синтезуються в організмі людини та повинні надходити ззовні з їжею або синтезуватися мікрофлорою кишечника.

Рослини володіють здатністю синтезувати всі необхідні їм вітаміни. Людина та тварини отримують їх з їжею в готовому вигляді або у вигляді провітамінів, з яких в організмі утворюються вітаміни.

Відсутність вітамінів призводить до розвитку різних захворювань, які називаються **авітамінозами** (наприклад, рахіт, цинга та ін.).

Нестача вітамінів обумовлює розвиток **гіповітамінозу.** Причиною гіповітамінозу може бути не тільки недостатній вміст вітамінів в їжі, але й порушення їх всмоктування в шлунково-кишковому тракті. Деякі захворювання, особливо інфекційні, супроводжуються порушенням обміну вітамінів і викликають їх підвищене розкладання та виділення з організму. У таких випадках потреба у вітамінах зростає.

Уведення деяких лікарських речовин, як-от антибіотиків, сульфаніламідних препаратів, може негативно вплинути на обмін окремих вітамінів. Потреба у вітамінах залежить також від умов праці. Надмірне введення в організм вітамінів спричиняє **гіпервітаміноз.**

Назви деяких вітамінів походять від тих захворювань, які розвиваються внаслідок їх відсутності. У таких випадках до назви захворювання додається префікс «анти» − антиксерофтальмічний, антирахітний і т.д. Вітаміни можуть позначатися буквами латинського алфавіту. В результаті дослідження хімічної природи вітамінів почали вводити хімічні назви.

На сьогодні використовуються всі три види номенклатури вітамінів.

Найпростіша класифікація вітамінів ґрунтується на їх фізико-хімічних властивостях. Розрізняють *водорозчинні* (розчинні у воді) та *жиророзчинні* (розчинні в жирах) вітаміни.

До **водорозчинних вітамінів** належать такі вітаміни (табл. 15):

− вітамін B_1 (антиневритний, тіамін);
− вітамін B_2 (рибофлавін);
− вітамін B_3 (антидерматитний, пантотенова кислота);
− вітамін РР або B_5 (антипеларгічний, нікотинова кислота, нікотинамід);
− вітамін B_6 (антидерматитний, піридоксин, піридоксаль, піридоксамін);
− вітамін B_9 (фолієва кислота, аміноптерин);
− вітамін B_{12} (антианемічний, ціанокобаламін, фактор кровотворення);
− вітамін B_{15} (пангамова кислота).
− вітамін С (антицинготний, антискорбутний, аскорбінова кислота);
− вітамін Р (рутин);
− вітамін Н (біотин) (табл. 15).

Більшість водорозчинних вітамінів мають регулярно надходити з їжею, оскільки вони швидко виводяться або руйнуються в організмі.

До **жиророзчинних вітамінів** належать такі вітаміни (табл. 15):

− вітамін А (антиксерофтальмічний, ретинол);

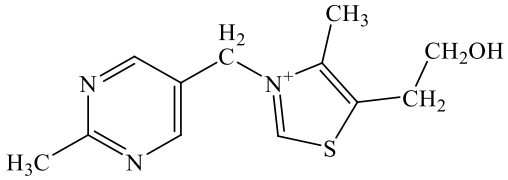
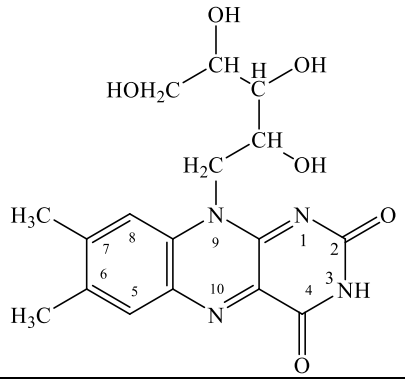
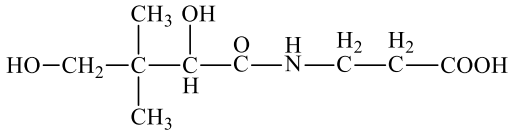
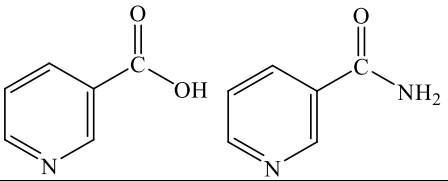
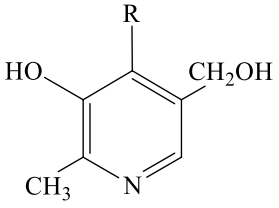
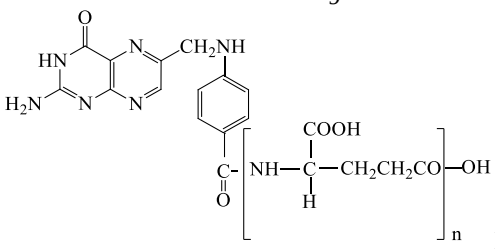
− вітамін D (антирахітний, кальциферол); D_2 (ергокальциферол); D_3 (холекальциферол);

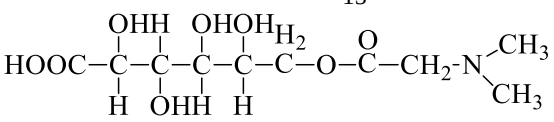
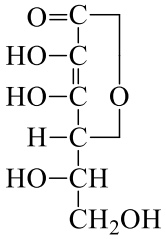
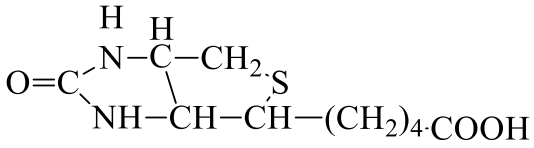
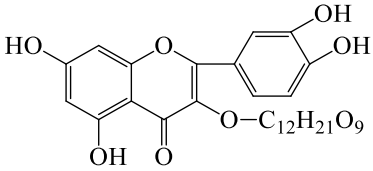
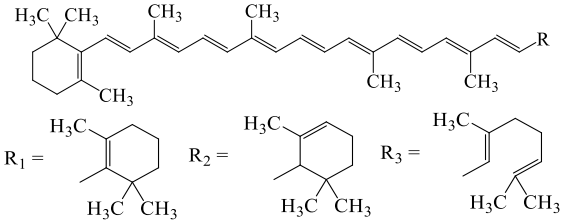
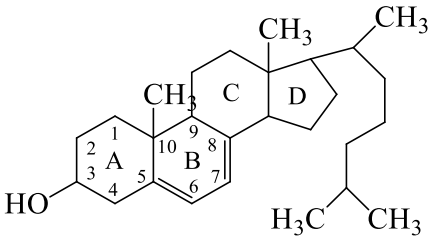
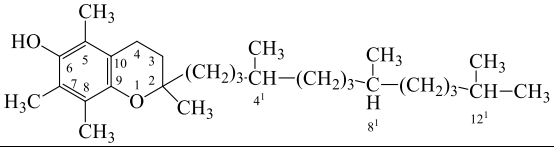
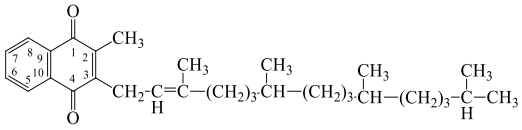
− вітамін Е (антистерильний, вітамін розмноження, токоферол);

− вітамін К (антигеморагічний, філохінон) (табл. 15).

Жиророзчинні вітаміни можуть депонуватися в організмі. Крім того, вони погано виводяться, тому іноді при їх надлишку спостерігаються гіпервітамінози – захворювання, пов'язані з інтоксикацією організму високими дозами жиророзчинних вітамінів. Такі захворювання описані для вітамінів А та D.

Таблиця 15 − Особливості структури водорозчинних і жиророзчинних вітамінів

№ з/п	Позначення та структура вітаміну	№ з/п	Позначення та структура вітаміну
1	2	3	4
Водорозчинні вітаміни			
1	Вітамін B_1 	2	Вітамін B_2 
3	Вітамін B_3 	4	Вітамін РР 
5	Вітамін B_6  R = CH_2OH; CHO; CH_2NH_2	6	Вітамін B_9  n = 1 – вітамін B_9 (фолієва кислота); n = 3-7 – його кон'югати

7	Вітамін B_{15} 	8	Вітамін С 
1	2	3	4
9	Вітамін Н 	10	Вітамін Р 
Жиророзчинні вітаміни			
1	Вітамін А  α-каротин β-каротин γ-каротин	2	Вітамін D 
3	Вітамін Е 	4	Вітамін К 

Характеристика водорозчинних вітамінів

Вітамін B_1 (антиневритний, тіамін).

Хімічна будова вітаміну B_1: є тіазольне та пиримідинове кільця, що містять Сульфур та Нітроген відповідно (табл. 15).

Роль вітаміну B_1: відіграє важливу роль у процесах перетворення вуглеводів, оскільки входить до складу ферменту піруватдекарбоксилази, що розщеплює піровиноградну кислоту на оцтовий альдегід та CO_2; входить до складу піруватдекарбоксилази у вигляді фосфорного ефіру – тіамінпірофосфату.

Авітаміноз вітаміну B_1: порушуються процеси декарбоксилювання кетокислот (щавлевооцтова, кетоглутарова та ін.).

Гіповітаміноз вітаміну B_1: нестача вітаміну B_1 у їжі людини призводить до накопичення в крові та тканинах піровиноградної кислоти, що є сильною отрутою для нервової системи; при нестачі вітаміну B_1 розвивається поліневрит (хвороба «бері-бері»), в основі якого лежать дегенеративні зміни нервів (втрачається шкірна чутливість, порушується нормальна моторика шлунково-кишкового тракту, з'являються серцеві болі, параліч).

Джерела та добова потреба у вітаміні B_1: пшеничні, рисові висівки, зародки злаків, внутрішні органи тварин (печінка, нирки, серце), дріжджі. Добова потреба у вітаміні B_1 для дорослої людини становить 2-3 мг.

Вітамін B_2 (рибофлавін).

Хімічна будова вітаміну B_2: належить до метильованих похідних ізоалоксазину, до якого в положенні 9 приєднаний спирт − рибітол (табл. 15).

Роль вітаміну B_2: у вигляді фосфорного ефіру (кінцевої гідроксильної групи рибітолу) або у вигляді більш складних речовин (зокрема, з нулеотидами) рибофлавін входить до складу окисно-відновних ферментів, які беруть участь у перенесенні Гідрогену.

Авітаміноз вітаміну B_2: припинення росту, випадіння волосся, ураження слизових оболонок (особливо в куточках рота), швидка втомлюваність зору, зниження працездатності, порушення нормального синтезу гемоглобіну, патологічні стани нервової системи.

Джерела та добова потреба у вітаміні B_2: дріжджі, печінка, нирки, серце, молоко, зелені овочі. Добова потреба дорослої людини у вітаміні B_2 становить 2-4 мг.

Вітамін РР (нікотинова кислота, ніацин).

Хімічна будова: хімічно являє собою дві речовини, що володіють однаковою вітамінною активністю; нікотинова (3-піридинкарбонова) кислота (ніацин) та нікотинамід (ніацинамід) (табл. 15).

Роль вітаміну РР: вітамін РР є коферментом нікотинамідаденіндинуклеотиду ($НАД^+$), нікотинаміддинуклеотидфосфату ($НАДФ^+$) у ферментах групи оксидоредуктаз (дегідрогеназ). У ході окисно-відновних реакцій $НАД^+$, $НАДФ^+$ реагують у складі ферментів із різними органічними субстратами, відділяючи від них гідрид-іон та утворюючи $НАДН_2$, $НАДФН_2$. Справжнім вітаміном вважають нікотинову кислоту.

Гіповітамноз вітаміну РР: при нестачі вітаміну РР розвивається пелагра, уражуються шлунково-кишковий тракт, шкіра, центральна нервова система.

Джерела та добова потреба у вітаміні РР: дріжджі, рисові висівки, м'ясо, молоко, яйця, кукурудзяна крупа. Добова потреба дорослої людини у вітаміні РР становить 6,6 ніацинового еквівалента / 1000 ккал.

Вітамін B_6 (антидерматитний, піридоксин).

Хімічна будова вітаміну B_6: належить до похідних піридину: піридоксин піридоксол, піридоксаль, піридоксамін розрізняються лише характером заміщення радикала в 4-ому положенні (табл. 15).

Роль вітаміну B_6: фосфопіридоксаль є складовою частиною ферментів, які каталізують реакції білкового обміну − реакції переамінування та декарбоксилювання амінокислот.

Авітаміноз вітаміну B_6: різке порушення обміну білків, порушення кровотворення, різного роду дерматити.

Гіповітаміноз вітаміну B_6: порушення ліпідного обміну, внаслідок чого розвивається атеросклероз.

Джерела та добова потреба у вітаміні B_6: рисові висівки, паростки пшениці, боби, дріжджі, зелені частини рослин, нирки, печінка. Добова потреба дорослої людини у вітаміні B_6 становить 2,0-2,5 мг.

Вітамін B_9, або B_C (фолієва кислота, фолацин, аміноптерин).

Хімічна будова вітаміну B_9: загальна назва цієї групи вітамінів − фолацин. Основними представниками цієї групи вітамінів є фолієва (птероїлглутамінова) кислота та її активна форма − тетрагідрофолієва кислота.

Фолієва кислота являє собою продукт взаємодії птеридину, n-амінобензенової та L-глутамінової кислот (табл. 15).

Роль вітаміну B_9: виконує найважливіші функції в обміні речовин; переносить однокарбонові фрагменти в процесах біосинтезу багатьох сполук, серед яких амінокислоти, пуринові основи та інші життєво важливі сполуки.

Гіповітаміноз вітаміну B_9: призводить до розвитку анемії з порушенням балансу еритроцитів і лейкоцитів у крові; уражаються органи травлення, розвиваються стоматит і гастрит. У вагітних відзначається порушення розвитку плода.

Джерела та добова потреба у вітаміні B_9: листя рослин; борошно грубого помелу, хлібобулочні вироби, гречана, вівсяна крупи, пшоно, соя, квасоля, зелена цибуля, гриби; печінка, молоко, сир, ікра. Добова потреба дорослої людини у вітаміні B_9 становить 200 мкг, вагітних − 400 мкг.

Вітамін B_{12} (ціанкобаламін).

Хімічна будова вітаміну B_{12}: основними представниками кобаламіну є оксокобаламін та ціанкобаламін.

Роль вітаміну B_{12}: відіграє найважливішу роль у процесах кровотворення. Для всмоктування вітаміну B_{12} необхідний особливий білковий фактор, що синтезується в слизовій оболонці шлунка та утворює з ним міцний комплекс.

Авітаміноз вітаміну B_{12}: порушення розвитку червоних кров'яних тілець, що призводить до анемії, ураження нервової системи й органів травлення. Відзначаються дратівливість, швидка стомлюваність, порушення функцій спинного мозку, параліч. З боку органів травлення: втрата апетиту, порушення моторики кишківника та ін.

Джерела та добова потреба у вітаміні B_{12}: печінка, м'ясо, деякі сорти риби, сир, молоко. Добова потреба дорослої людини у вітаміні B_{12} становить 2 мкг, вагітних − 3 мкг.

Вітамін С (антицинготний, аскорбінова кислота).

Хімічна будова вітаміну С: є лактоном L-дикетогулонової кислоти. Присутність у її молекулі подвійного зв'язку надає рухливості протонам

гідроксильних груп біля 2-ого та 3-ого атомів Карбону, що обумовлює кислий характер із різко вираженою відновлювальною здатністю (табл. 15). Аскорбінова кислота легко віддає та приймає два атоми Гідрогену, переходячи відповідно в дегідроаскорбінову кислоту та навпаки.

Роль вітаміну С: бере участь в окисно-відновних процесах.

Гіповітаміноз вітаміну С: при нестачі вітаміну С розвивається специфічне захворювання − цинга. Клінічні симптоми: швидка стомлюваність, анемія, запаморочення, зниження імунітету, кровоточивість ясен, крововиливи в підшкірну клітковину, ознаки порушення серцевої діяльності; порушення синтезу міжклітинного білка колагену, патологічні зміни судинних стінок та опорних тканин.

Джерела та добова потреба у вітаміні С: плоди шипшини, ягоди чорної смородини, капуста, картопля, горобина, перець, хвоя, лимони, мандарини, яблука. Добова потреба дорослої людини у вітаміні С становить 50-70 мг.

Вітамін Р (рутин).

Хімічна будова вітаміну Р: сполуки фенольної природи. В основі будови лежить ядро флавону (табл. 15). До них належать: рутин (глікозид флавонолу кверцетину та дисахариду − рутинози), еріодиктин, гесперидин, кверцетин та ін.

Роль вітаміну Р: зменшує проникність, підвищує міцність стінок кровоносних судин; пригнічує активність холінестерази, сукцинатдегідрогенази і деяких інших ферментів, затримує окиснення адреналіну.

Джерела та добова потреба у вітаміні Р: до групи речовин Р-вітамінної дії належать також антоціанідини (наприклад, ціанідин − аглікон ціаніну, пігменту, широко розповсюдженого в квітах, плодах деяких вищих рослин). Вітамін групи Р, виділений із лимонів у кристалічному вигляді, назвали цитрином. Добова потреба людини у вітаміні Р не встановлена; з лікувальною метою (зміцнення кровоносних судин) вводять 100-200 мг вітаміну Р на добу.

Характеристика жиророзчинних вітамінів

Вітамін А (антиксерофтальмічний, ретинол).

Хімічна будова вітаміну А: за хімічною природою вітамін A_1 являє собою циклічний ненасичений одноатомний спирт, містить кільце та бічний ланцюг (табл. 15). До складу бічного ланцюга входять два залишки ізопрену (метилбутадієну) та первинна спиртова група.

Жиророзчинний вітамін А має кілька вітамерів, із яких найбільш поширеним є A_1 (ретинол).

Роль вітаміну А: підтримує нормальний стан епітеліальних тканин за рахунок окисно-відновних процесів; підтримує гостроту зору: входить до складу зорового пурпуру − родопсину в паличках сітківки очей; підвищує опірність організму до інфекційних хвороб; суттєво впливає на стан клітинних мембран, тканинне дихання, функціонування ендокринних залоз.

Авітаміноз вітаміну А: зупинка росту, особливо кісток, зменшення ваги, загальне виснаження організму; сухість шкіри, слизових оболонок, дерматити;

бронхіти, переродження клітин наднирників, тканин центральної нервової та статевої систем, злущення клітин епітелію; «куряча» сліпота; сухість, запалення рогівки ока (ксерофтальмія).

Джерела вітаміну А: риб'ячий жир, печінка морських тварин і риб, яловича печінка, жовтки яєць, коров'яче масло; овочі та фрукти жовтого, оранжевого, червоного кольорів: морква, манго, абрикоси, папая, гарбуз, помідори; зелень: кріп, петрушка, шпинат.

Добова потреба у вітаміні А: добова потреба дорослої людини − 900 мкг (3000 МЕ), або 1,0- 2,5 мг; добова потреба для дітей − 400-1000 мкг (залежно від віку та статі).

Джерела провітаміну А: шпинат, листя салату, зелена цибуля, морква, томати.

Вітамін D (антирахітний, кальциферол); D_2 (ергокальциферол); D_3 (холекальциферол).

Хімічна будова вітаміну D: вітамін D_2 (ергокальциферол); вітамін D_3 (холекальциферол) (табл. 15). Окрім того, на сьогодні відомі ще чотири вітаміни групи D − D_4-D_7.

Роль вітаміну D: використовується у тваринництві, для деяких тварин і птахів вітамін D_2 малоактивний та непридатний як харчова добавка; разом із ферментами, гормонами, АТФ, Na^+ та іншими речовинами регулює всмоктування Ca^{2+} у кишечнику, вміст Ca^{2+} в крові, метаболізм Ca^{2+} та фосфатів, що сприяє побудові нормальної кісткової та м'язової тканин. Окиснені метаболіти вітаміну D: 25-гідроксикальциферол, 1α-гідроксихолекальциферол, 1α,25-дигідроксихолекальциферол проявляють всі властивості стероїдних гормонів.

Авітаміноз, гіповітаміноз вітаміну D: розвивається рахіт.

Джерела та добова потреба у вітаміні D: жир печінки риб, вершкове масло, молоко, яйця. З лікувальною метою можливе також використання вітаміну D_2, синтезованого з ергостерину, який отримують із дріжджів, або як побічний продукт виробництва антибіотиків. Добова потреба у вітаміні D: провітаміни D_3-D_7-дегідрохолестерини наявні у шкірних покривах людини, і для їх перетворення в холекальциферол достатньо сонячного опромінення, так що добова потреба дорослої людини (7-12 мкг) легко задовольняється. Для дітей добова доза у вітаміні D_3 становить 12-25 мкг.

Вітамін Е (антистерильний фактор, α-токоферол).

Хімічна будова вітаміну Е: α-токофероли з меншою кількістю метильних груп в ароматичному ядрі та їх аналогів − токотрієноли з ненасиченим бічним ланцюгом (табл. 15).

Роль вітаміну Е: володіє антиоксидантною дією, спрямованою на запобігання окисненню залишків ненасичених жирних кислот у ліпідах мембран; впливає на біосинтез ферментів, які беруть участь в побудові гему.

Авітаміноз вітаміну Е: порушення нормального розвитку плода у вагітних, сперматогенез у чоловіків.

Гіповітаміноз вітаміну Е: у тварин виникає безпліддя, уражується міокард та інші м'язові тканини, судинна й нервова системи; у людини гіповітаміноз вітаміну Е проявляється рідко.

Джерела та добова потреба у вітаміні Е: зерна пшениці та рису, соняшникова, кукурудзяна, бавовняна, соєва, рисова, конопляна, пальмова олія, листя салату, шпинату. Для вагітних і жінок, які годують груддю, добова потреба у вітаміні Е становить 10-25 мг, для дітей − 5 мг.

Вітамін К (антигеморагічний, філохінон).

Хімічна будова вітаміну К: група вітамінів $К_3$ (менахінон) (табл. 15); відрізняються величиною бічного ланцюга і позначаються або за кількістю ізопреноїдних ланок, що входять до нього (менахінон-4, -6, -7, -8, -9), або за кількістю С-атомів ланцюга (вітаміни $К_{2\ (20)}$, $К_{2\ (30)}$, $К_{2\ (35)}$, $К_{2\ (40)}$, $К_{2\ (45)}$).

Цей вітамін термостабільний.

Роль вітаміну К: вітаміни $К_1$, $К_2$ необхідні для нормалізації або прискорення процесу згортання крові; бере участь в побудові протромбіну та інших факторів єдиної складної системи; вітамін $К_3$ (менахінон) бере участь у біохімічних окисно-відновних реакціях у процесах фотосинтезу, окисного фосфорилювання; синтетичні аналоги $К_4$-$К_7$ мають більш високу біологічну активність; при деяких захворюваннях (інфаркт міокарда, тромбофлебіт), пов'язаних із підвищенням згортання крові та утворенням тромбів у судинах, виникає необхідність у застосуванні антивітамінів К (антикоагулянтів), а саме: феніліну, дикумаролу (дикумарину), його аналогів та похідних (саліцилова кислота).

Гіповітаміноз вітаміну К: відзначається тільки в немовлят зі зниженим вмістом в кишечнику ацидофільної палички. У дорослих гіповітаміноз вітаміну К може бути викликаний або пригніченням кишкової мікрофлори під час лікування сульфаніламідними препаратами та антибіотиками, або поганим всмоктуванням вітаміну при нестачі його емульгатора − жовчі, що може спричинити внутрішню кровотечу.

Джерела та добова потреба у вітаміні К: зелені частини рослин, овочі (білокачанна, цвітна капуста, шпинат, гарбуз, томати, буряк, картопля, морква), злакові (овес, пшениця), бобові (горох); вітамін К продукується в достатній кількості мікрофлорою кишечника. Добова потреба дорослої людини у вітаміні К становить 0,2-0,3 мг. Показником забезпеченості організму вітаміном К є тести, що відображають стан згортання крові.

? Питання для самоконтролю

1. Поясніть особливості класифікації вітамінів. Розкрийте сутність таких понять, як авітаміноз, гіповітаміноз і гіпервітаміноз.
2. Охарактеризуйте водорозчинні та жиророзчинні вітаміни.

✍ Завдання для домашнього виконання

Для закріплення теми «Вітаміни» створіть та заповніть таблицю 16 в електронному варіанті.

Таблиця 16 − Характеристика водорозчинних і жиророзчинних вітамінів

Назви вітаміну	Хімічна будова вітаміну	Добова потреба, джерела надходження	Біологічні функції	Авітаміноз, гіповітаміноз	Гіпервітаміноз
1	2	3	4	5	6

Лабораторна робота № 13
ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВОДОРОЗЧИННІ ТА ЖИРОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ

Мета роботи: навчитися виявляти вітаміни в різноманітних речовинах або біологічних рідинах, застосовуючи якісні реакції.

Практичне значення роботи: за допомогою якісних реакцій вітаміни можна виявляти в лікарських рослинах, препаратах і харчових продуктах.

Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, піпетки, сірники, водяна баня, спиртівка; 1%-й розчин сульфанілової кислоти та 5%-й розчин натрій нітриту − діазореактив, 10%-й розчин натрій карбонату, 5%-й розчин тіаміну (B_1), розчин вітаміну B_2, концентрована хлоридна кислота, металевий цинк (Zn); 3%-й розчин вітаміну РР, 5%-й розчин купрум ацетату; 1%-й розчин вітаміну B_6, 1%-й розчин ферум (III) хлориду; 0,1%-й розчин аскорбінової кислоти, 0,01%-й розчин метиленового синього; риб'ячий жир у хлороформі, концентрована сульфатна кислота, розчин брому у хлороформі (1:60).

Хід роботи

Якісні реакції на водорозчинні вітаміни

Дослід 1. Діазореакція на вітамін B_1.

Принцип реакції. У лужному середовищі тіамін із діазореактивом утворює складну комплексну сполуку *оранжевого* або *червоного кольору*.

Хід роботи: До діазореактиву, що складається з 5 крапель розчину сульфанілової кислоти та 5 крапель 5%-го розчину натрій нітриту, додають 1-2 краплі розчину тіаміну (вітаміну B_1), потім по стінці, нахиливши пробірку, обережно вносять 5-7 крапель 10%-го розчину натрій карбонату. На межі двох рідин утворюється *кільце оранжевого кольору*.

Дослід 2. Реакція на вітамін B_2.

Принцип реакції. Гідроген, що утворився при додаванні металевого цинку до концентрованої хлоридної кислоти, відновлює жовтий рибофлавін спочатку в проміжну сполуку *рожевого кольору*, а потім – у *безбарвний* лейкофлавін.

Хід роботи. У пробірку наливають 10 крапель розчину вітаміну B_2, додають 5 крапель концентрованої хлоридної кислоти й опускають зернятко металевого цинку (Zn). Спостерігають *виділення бульбашок водню*. Рідина поступово набуває *рожевого кольору*, а потім *знебарвлюється*.

Дослід 3. Реакція на вітамін РР.

Принцип реакції. Вітамін РР при нагріванні з розчином купрум ацетату утворює *синій осад* мідної солі нікотинової кислоти.

Хід роботи. Перед визначенням 3%-й розчин вітаміну РР обов'язково збовтують. Потім набирають у пробірку 20 крапель вітаміну РР і нагрівають до кипіння. При цьому каламутний розчин стає *прозорим*. Збовтавши 5%-й розчин купрум ацетату, доливають 20 крапель до попередньо нагрітого розчину вітаміну РР. Потім вміст пробірки доводять до кипіння та відразу ж охолоджують під струменем холодної води. Спостерігають випадіння на дні пробірки *синього осаду мідної солі нікотинової кислоти.*

Дослід 4. Реакція на вітамін B_6.

Принцип реакції. Вітамін B_6 при взаємодії з розчином ферум хлориду утворює комплексну сіль ферум фенолату *червоного кольору.*

Хід роботи. До 5 крапель 1%-го розчину вітаміну B_6 доливають рівну кількість 1%-го розчину ферум (III) хлориду та перемішують. Спостерігають появу *червоного забарвлення*.

Дослід 5. Реакція на вітамін С.

Принцип реакції. Аскорбінова кислота легко вступає в окисно-відновні реакції та відновлює метиленовий синій. При цьому метиленовий синій відновлюється в безбарвну сполуку.

Хід роботи. У дві пробірки вносять по 1 краплі 0,01%-ого розчину метиленового синього і додають по 1 краплі 10 %-го розчину натрій карбонату. У 1-у пробірку додають 5 крапель розчину аскорбінової кислоти, у 2-у пробірку – 5 крапель води. Обидві пробірки ставлять у термостат при t = 37-40 ^{0}С. Через деякий час у пробірці з розчином аскорбінової кислоти спостерігають *знебарвлення рідини.*

Якісні реакції на жиророзчинні вітаміни

Дослід 1. Реакція на вітамін А.

Принцип реакції. При взаємодії вітаміну А, що міститься в риб'ячому жирі, із концентрованою сульфатною кислотою з'являється *червоне забарвлення.*

Хід роботи. У суху пробірку наливають 3 краплі ретинолу та додають 1 краплю концентрованої сульфатної кислоти. Спостерігають появу *фіолетового забарвлення*, яке переходить у *червоно-буре*.

Дослід 2. Реакція на вітамін D.

Принцип реакції. Вітамін D, що міститься в риб'ячому жирі, при взаємодії з розчином брому у хлороформі набуває *зеленувато-блакитного забарвлення.*

Хід роботи. У суху пробірку вносять 2-3 краплі риб'ячого жиру та 2-4 краплі розчину брому у хлороформі (1:60). Про наявність вітаміну D свідчить поява *зеленувато-блакитного забарвлення*.

Результати досліду 1-5 (водорозчинні вітаміни) та досліду 1-2 (жиророзчинні вітаміни) внесіть у таблицю 17 за аналогією:

Таблиця 17 − Якісні реакції на водорозчинні та жиророзчинні вітаміни

№ з/п	Назва реакції	Реактиви, які використовуються	Зміни, що відбуваються під час реакції	Що виявляє реакція?
1	2	3	4	5
1	Діазо-реакція на вітамін B_1	1) діазореактив; 2) 1-2 краплі розчину тіаміну (розчину вітаміну B_1); 3) 5-7 крапель 10%-го розчину натрій карбонату	Кільце оранжевого кольору	Вітамін B_1

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

ТЕМА 16. БІОХІМІЯ ГОРМОНІВ

Завдяки системі внутрішніх зв'язків, які забезпечують передачу інформації від однієї клітини до іншої та до тканини, або між різними тканинами, організм людини функціонує як єдине ціле. Без цієї системи неможливо підтримувати гомеостаз.

У передачі інформації між клітинами в багатоклітинних живих організмах беруть участь три системи, а саме: центральна нервова система (ЦНС), ендокринна система (залози внутрішньої секреції) та імунна система.

Способи передачі інформації у цих системах – хімічні. Посередниками при передачі інформації можуть бути **сигнальні молекули**, до яких належать чотири групи речовин:

1) **ендогенні біологічно активні речовини** (медіатори імунної відповіді, фактори росту);

2) **нейромедіатори**;

3) **антитіла** (імуноглобуліни);

4) **гормони.**

Гормони – органічні речовини різної хімічної природи, які виділяються в малих кількостях клітинами різних залоз внутрішньої секреції (ендокринної системи) в кров або лімфу та регулюють обмін речовин і фізіологічні функції шляхом передачі сигналів від центральної нервової системи (ЦНС) клітинами тканин або органів.

Термін гормон (від грец. *hormao* – збуджую, приводжу в дію) був уведений у науковий обіг у 1905 р. У. Бейлісом та Е. Старлінгом при описі дії секретину − речовини, яка синтезується дванадцятипалою кишкою та стимулює виділення соку підшлунковою залозою.

Загальні ознаки гормонів:

а) дистантність дії: прояв активності на відстані від місця синтезу гормона;

б) сувора специфічність ефекту (принцип структурної комплементарності);

в) висока біологічна активність: гормони ефективно діють на клітини в низьких концентраціях (близько 10^{-6}-10^{-11} моль/л);

г) висока швидкість біосинтезу та розкладу;

д) наявність функцій між ЦНС і тканинами.

Регулятори, у яких немає хоча б однієї з указаних вище ознак, належать до **гормоноїдів (парагормонів):** гістамін, серотонін, брадикінін, простогландини.

До гормонів залоз внутрішньої секреції належать:

1) **гормони білкової природи:**

гормони, які продукуються **в підшлунковій залозі:**

− інсулін: знижує рівень цукру в крові;

− глюкагон: підвищує рівень цукру в крові;

гормони, які продукуються **в передній частці гіпофіза:**

− соматотпропний гормон (СТГ): регулює ріст;

− тиреотропний гормон (ТТГ): стимулює роботу щитовидної залози;

− адренокортикотропний гормон (АКТГ): стимулює роботу кори наднирників;

− гонадотропні гормони: стимулюють розвиток статевих клітин;

гормони, які продукуються **в задній частці гіпофіза:**

− вазопресин: проявляє антидиуретичну дію;

− окситоцин: стимулює скорочення гладкої мускулатури (матки);

2) **гормони − похідні амінокислоти:**

гормони, які продукуються **в щитовидній залозі:**

− тиронін, дийодтиронін, трийодтиронін, тироксин: сприяють накопиченню йоду в крові, що використовується для синтезу гормонів;

гормони, які продукуються **в мозковому шарі надниркових залоз:**

− адреналін: впливає на нервові закінчення, підвищує тиск і серцебиття;

− норадреналін: впливає на нервові закінчення, підвищує тиск і серцебиття, але його дія в 5 разів слабша, порівняно з адреналіном;

3) **стероїдні гормони:**

гормони, які продукуються **в кірковому шарі надниркових залоз:**

− глюкокортикоїди: регулюють вуглеводний обмін;

− мінералкортикоїди: регулюють мінеральний обмін;

− альдокортикоїди: регулюють вуглеводний і мінеральний обмін;

гормони, які продукуються **статевими залозами:**

− чоловічі статеві гормони (альдостерон, тестостерон): регулюють діяльність чоловічої статевої системи, синтез білка;

− жіночі статеві гормони (прогестерон, естрол, естріол, естрадіол): регулюють діяльність жіночої статевої системи.

До **гормоноподібних речовин (тканинних гормонів)** належать:

− секретин: регулює зовнішню секрецію підшлункової залози;

− гастрин: підвищує секрецію хлороводневої кислоти;

− панкреозимін: посилює утворення ферментів травлення в підшлунковій залозі;

− ентерогастрон: гальмує утворення хлороводневої кислоти у шлунку;

− холіцистокінін: посилює утворення жовчі.

За **біологічною активністю гормони** розподіляються на 5 груп:

1) гормони, що регулюють обмін вуглеводів, ліпідів, білків, амінокислот (йодтиронін, інсулін, глюкагон, адреналін, глюкокортикоїди);

2) гормони, що регулюють водно-сольовий обмін (мінералокортикоїди, вазопресин, компоненти ренін-ангіотензивної системи);

3) гормони, що діють на фосфорно-кальцієвий обмін (кальцитонін, каротин);

4) гормони, що реалізують репродуктивні функції (андрогени, естрогени, прогестини);

5) гормони, які впливають на функціональний стан ендокринних залоз (рилізинг-фактори гіпоталамуса, тропні гормони гіпофіза).

За **розчинністю гормони** розподіляють на:

1) гідрофільні – розчиняються у воді;

2) гідрофобні (ліпофільні) – розчиняються в неполярних розчинниках (стероїдні гормони, йодтиронін).

За **локалізацією біосинтезу гормонів** в організмі розрізняють гіпофізарні, гіпоталамічні, статеві гормони, кортикостероїди (гормони кори надниркових залоз), гормони щитовидної залози (тиреоїдні гормони).

Оскільки більшість гормонів є складними за структурою сполуками, їх хімічні назви достатньо громіздкі. Тому можуть використовуватися тривіальні назви гормонів, які відображають їх біологічну функцію (пролактин, вазопресин) або вказують на джерело гормона (інсулін від лат. *insula* – острівець).

Під впливом подразників у ЦНС виникають сигнали – нервові імпульси, які потім потрапляють до гіпоталамуса або через спинний мозок у мозкову речовину надниркових залоз. У гіпоталамусі синтезуються перші гормони «дистанційної» дії, так звані нейрогормони або рилізинг-фактори (від англ. *release* – вивільнювати). Потім нейрогормони досягають гіпофіза, де регулюють (посилюють або сповільнюють) виділення тропних гормонів, процеси синтезу гормонів своєю чергою контролюють процеси синтезу гормонів периферичними залозами. Мозкова речовина надниркових залоз під дією сигналів із ЦНС виділяє адреналін та низку інших гормональних речовин.

Відтак гіпоталамус, мозкова речовина ниднриркових залоз знаходяться під прямим контролем ЦНС, тоді як інші ендокринні залози пов'язані з ЦНС лише опосередковано − через гормони гіпоталамуса та гіпофіза.

У результаті такої передачі ендокринні залози організму синтезують специфічні гормони, які забезпечують регулюючий вплив на різні органи та тканини організму.

Між залозами внутрішньої секреції утворюються складні взаємодії, серед яких можна виділити такі основні типи:

1) **Взаємодія за принципом позитивного прямого або негативного зворотного зв'язку**.

Наприклад, тиреотропний гормон, що продукується в гіпофізі, стимулює утворення гормонів щитовидної залози (позитивний прямий зв'язок), однак підвищення концентрації гормонів щитовидної залози понаднормово зупиняє утворення тиреотропного гормона гіпофіза (негативний зворотний зв'язок);

2) **Синергізм та антагонізм гормональних впливів.**

Наприклад, адреналін, що синтезується надниркovими залозами, глюкагон, що виділяється підшлунковою залозою, зумовлюють підвищення вмісту глюкози в крові за рахунок розкладання глікогену в печінці (синергізм). Серед групи жіночих статевих гормонів прогестерон − ослаблює, а естрогени − посилюють скорочувальні функції мускулатури матки (антагонізм);

Механізми дії гормонів:

1) **цитозольний** − характерний для гормонів (стероїди та похідні ароматичних амінокислот), що проникають у середину клітин крізь ліпідний шар мембран і впливають на активність генетичного апарату клітин;

2) **мембранний** − гормони відіграють роль алостеричного ефектора транспортних систем клітинної мембрани, змінюючи її проникність відносно різних речовин (іони металів, глюкоза та ін.);

3) **мембранно-внутрішньоклітинний** − взаємодія гормона з білковими рецепторами мембрани зумовлює активацію специфічних ферментів, які підвищують швидкість синтезу циклічних нуклеотидів, що регулюють хімічні реакції в клітині (характерно для пептидних гормонів).

Ейкозаноїди − сполуки, що належать до біурегуляторів клітинних функцій ліпідної природи. Ейкозаноїди є фізіологічно активними похідними арахідонової кислоти.

Залежно від особливостей хімічної структури, ейкозаноїди поділяються на **простагландини, тромбоксани** та **лейкотрієни** − сполуки, що розрізняються за будовою та характером біологічної дії. Крім похідних арахідонової кислоти, деякі сполуки з класу простагландинів є похідними α- та γ-ліноленової кислот.

? Питання для самоконтролю

1. Наведіть приклади класифікації гормонів.
2. Розкрийте механізм дії гормонів.
3. Охарактеризуйте гормони гіпоталамуса.

4. Охарактеризуйте гормони гіпофіза.

5. Охарактеризуйте гормони щитовидної та паращитовидної залоз.

6. Охарактеризуйте гормони мозкового та кіркового шарів надниркових залоз.

7. Охарактеризуйте гормони підшлункової залози.

8. Охарактеризуйте гормони статевих залоз.

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Заповніть таблицю 18.

Таблиця 18 − Класифікація гормонів

Місце синтезу гормона	Назва	Хімічна природа	Функція	Надлишок / недостатність
1	2	3	4	5
Гіпоталамус				
Гіпофіз: передня частка задня частка				
Паращитовидна залоза				
Щитовидна залоза				
Підшлункова залоза				
Надниркові залози				
Статеві залози				

Лабораторна робота № 14
ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ГОРМОНИ

Мета роботи: виконати якісні реакції на гормони та засвоїти їх особливості.

Практичне значення роботи: за допомогою якісних реакцій можна визначити наявність гормонів різної природи у пробі.

Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, піпетки, електрична плитка, азбестова сітка; дистильована вода, розчин адреналіну (1:1000), розчин інсуліну (в ампулах), 3%-й розчин ферум (III) хлориду, 10%-й розчин натрій гідроксиду, діазореактив (або 1%-а сульфанілова кислота та 5%-й розчин натрій нітриту), 10%-й розчин натрій карбонату; 10%-й розчин натрій гідроксиду, 1%-й розчин купрум сульфату, 5%-й розчин плюмбум ацетату, 20%-й розчин сульфосаліцилової кислоти.

Хід роботи

Дослід 1. Якісні реакції на адреналін.

Принцип реакції. Реакції ґрунтуються на утворенні забарвлених продуктів під час окиснення адреналіну в пробі.

а) Реакція з ферум (III) хлоридом.

Хід роботи. У пробірку вносять 0,5-1 мл розчину адреналіну (1:1000), додають 1-2 краплі 3%-го розчину ферум (III) хлориду, перемішують. Спостерігають появу *смарагдово-зеленого забарвлення*. Додають 1 краплю 10%-го розчину натрій гідроксиду – з'являється *вишнево-червоне забарвлення*, а потім **–** *коричневе*.

б) Реакція з діазореактивом.

Хід роботи. До 0,5 мл діазореактиву (або до 0,5 мл 1%-ої сульфанілової кислоти додають 0,5 мл 5%-го розчину натрій нітриту − утворюється діазореактив) додають 0,5 мл розчину адреналіну (1:1000), 0,5 мл 10%-го розчину натрій карбонату, перемішують. Розчин набуває *червоного забарвлення.*

Дослід 2. Якісні реакція на інсулін.

а) Біуретова реакція на інсулін.

Принцип реакції. У лужному середовищі поліпептиди утворюють комплексні солі Купруму, які мають фіолетове забарвлення. Біуретова реакція підтверджує білкову природу інсуліну, що містить пептидний зв'язок.

Хід роботи. До 5 крапель розчину інсуліну додають 5 крапель 10%-го розчину натрій гідроксиду та 1 краплю 1%-го розчину купрум сульфату. Вміст пробірки перемішують і струшують. Спостерігають появу *фіолетового забарвлення.* Роблять висновки про пептидну природу інсуліну.

б) Реакція на залишки сульфуровмісних амінокислот в інсуліні (реакція Фоля).

Принцип реакції. Реакція ґрунтується на взаємодії сульфуровмісних амінокислот з лугами при нагріванні. При цьому від амінокислот відщеплюється Сульфур у вигляді гідроген сульфіду, який виявляється за допомогою реакції з плюмбум ацетатом.

Хід роботи. До 5 крапель розчину інсуліну додають 5 крапель 10%-го розчину натрій гідроксиду, нагрівають до кипіння. Потім додають 2-3 краплі 5%-го розчину плюмбум ацетату. Спостерігають появу *коричневого* або *чорного забарвлення.* Роблять висновок про вміст цистину, цистеїну в складі інсуліну, а також відзначають значення дисульфідних зв'язків у його структурі.

в) Реакція на інсулін із сульфосаліциловою кислотою.

Принцип реакції. Реакція ґрунтується на взаємодії інсуліну з розчином сульфосаліцилової кислоти з утворенням осаду білого кольору.

Хід роботи. До 1 мл розчину інсуліну, додають 5 крапель 20%-го розчину сульфосаліцилової кислоти. Спостерігають утворення *білого осаду*.

Результати дослідів 1-2 внесіть у таблицю 19 за аналогією:

Таблиця 19 − Якісні реакції на гормони

№ з/п	Назва реакції	Реактиви, які використовуються	Зміни, що відбуваються під час реакції	Висновок
1	2	3	4	5
1	Якісна реакція на адрена-лін а) реакція із ферум (III) хлоридом	1) 0,5 мл-1 мл розчину адреналіну (1:1000); 2) 1-2 краплі 3%-го розчину ферум (III) хлориду; перемішують. 4) 1 краплю 10%-го розчину натрій гідроксиду	З'являється смарагдово-зелене забарвлення, потім – вишнево-червоне і, зрештою, – коричневе.	Якісна реакція на адреналін

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна:

1. Боєчко Ф. Ф., Боєчко Л. О., Шмиголь І. В. Основи молекулярної біології : курс лекцій. Черкаси : Видавництво ЧНУ ім. Богдана Хмельницького, 2013. 255 с.
2. Жегунов Г. Ф. Практикум з біологічної хімії : навчально-методичний посібник для студентів. Харків : БУПУН, 2014. 304 с.
3. Лисиця А. В. Біохімія. Практикум : навчальний посібник. Суми : Університетська книга, 2019. 240 с.
4. Павлоцька Л., Дуденко Н., Дімітриєвич Л., Божко Н. Біологічна хімія : підручник. Суми : Університетська книга, 2019. 379 с.
5. Павлоцька Л., Дуденко Н., Левітин Є. Біологічна хімія : підручник. Суми : Університетська книга, 2019. 513 с.
6. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія: підручник. Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 384 с.

Додаткова:

1. Механізми біохімічних реакцій : навч. посіб. для студ. вищ. навч. закл.; реком. МОНУ / за ред. Н. О. Сибірної. Львів : Видавничий центр ЛНУ ім. І. Франка, 2009. 316 с.
2. Столяр О. Молекулярна біологія. Київ : КНТ, 2019. 226 с.
3. Ершов Ю. А. Биохимия человека. 2-е изд., пер. и доп. Люберцы : Юрайт, 2016. 374 с.
4. Зименковский Б., Музыченко В., Ниженковская И. Biological and Bioorganic Chemistry in 2 books. Book 1. Bioorganic Chemistry. Киев : Медицина, 2019. 288 с.
5. Комов В. П., Шведова В. Н. Биохимия : учебник. 4-е изд., испр. и доп. Люберцы : Юрайт, 2015. 640 с.
6. Deniz Ekinci. Biochemistry. Croatia, 2012. 462 p.
7. Hiram F. Gilbert Basic concepts in biochemistry. A student's survival guide biochemistry. Houston, Texas, 2000. 312 p.
8. McKee T., McKee J. Biochemistry: The Molecular Basis of Life. 3rd ed. McGraw-Hill, 2004. 774 p. URL: http://ebooks.znu.edu.ua/files/Bibliobooks/Kolisnyk/0001100.djvu.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Авдеева Л. В., Алейникова Т. Л., Андрианова Л. Е. Биохимия : учебник / под ред. Е.С. Северина. Москва : ГЭОТАР-МЕД, 2013. 768 с.
2. Албертс Б. Молекулярная биология клетки: в 3-х т. Москва - Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2013. 808 с.
3. Гидранович В. И., Гидранович А. В. Биохимия : учебное пособие. Минск : ТетраСистемс, 2012. 528 с.
4. Губський Ю. І. Біологічна хімія. Тернопіль : Книга, 2002. 508 с.
5. Новосад Н.В. Молекулярна біологія : навчальний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра напряму підготовки «Біологія». Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2016. 179 с.
6. Омельянчик Л.О., Генчева В.І., Новосад Н.В. Біохімія : методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра спеціальності «Біологія» освітньо-професійної програми «Біологія» денної та заочної форм здобуття освіти. Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2018. 60 с.
7. Омельянчик Л.О., Генчева В.І. Хімічні процеси в живих організмах : методичні рекомендації до лабораторних занять для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра спеціальності «Хімія» освітньо-професійної програми «Хімія» денної форми здобуття освіти. Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2019. 52 с.
8. Рогожин В. В. Практикум по биохимии : учебное пособие. Москва : Лань, 2013. 544 с.

Інформаційні ресурси:

1. Биохимия. URL: http://padaread.com/?book=26695
2. Книги. URL: https://www.yakaboo.ua/knigi/uchebnaja-literatura-pedagogika/studentam-i-aspirantam/biologicheskie-nauki/biohimija-molekuljarnaja-biologija.html
3. Биохимия. URL: https://www.twirpx.com/files/science/biology/biochemistry/
4. Учебный материал. URL: http://kingmed.info/knigi/Biohimia/book_4046/Naglyadnaya_meditsinskaya_biohimiya-Solvey_DjG_-2011-pdf
5. Фармацевтична енциклопедія / голова ред. ради чл.-кор. НАН України, проф. В. П. Черних. URL: https://www.pharmencyclopedia.com.ua/about
6. Popular Biochemistry Books. URL: https://www.goodreads.com/shelf/show/biochemistry

Навчально-методичне видання
(*українською мовою*)

Омельянчик Людмила Олександрівна
Генчева Вікторія Іванівна
Новосад Наталія Василівна

БІОХІМІЯ З ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Навчально-методичний посібник
для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра
спеціальності «Середня освіта»
освітньо-професійної програми «Середня освіта (біологія та здоров'я людини)»
денної форми здобуття освіти

Рецензент *В. В. Копійка*
Відповідальний за випуск *О. А. Бражко*
Коректор *Н. В. Мацюх*