

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания

к практическим занятиям по дисциплине

«Биохимия»

для направления подготовки 18.03.01 Химическая технология
направленность (профиль) Химическая технология синтетических
биологически активных веществ, химико-фармацевтических препаратов и
косметических средств

Невинномысск 2023

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями ФГОС ВО и рабочей программы дисциплины «Биохимия». Указания предназначены для студентов очной/заочной формы обучения направления подготовки 18.03.01 Химическая технология.

Содержат основные разделы изучаемого теоретического материала, перечень вопросов необходимых для проработки, а также список рекомендуемой литературы.

Составители

Отв. редактор

Введение

Методические указания выполнены на современном научном уровне и рассчитано на студентов, обладающих достаточной подготовкой по разделам общей химии, физики и математики.

Методические указания составлены для проведения лабораторных занятий курса «Биохимия» с учетом требований стандарта ФГОС ВО для подготовки бакалавров направления 18.03.01 «Химическая технология».

Практическое занятие №1 Аминокислоты

Цель работы: изучить некоторые физические и химические свойства аминокислот

Теоретическая часть:

Белки - важнейшая и необходимая составная часть всех живых организмов. Они составляют главную массу сухого вещества тканей человека и почти всех животных.

Это очень сложные, высокомолекулярные соединения, находящиеся в организме в коллоидном состоянии. Молекула белка состоит из остатков аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Под действием специфических ферментов, а также при нагревании с кислотами или щелочами белки подвергаются гидролизу (распаду с присоединением элементов воды), давая ряд промежуточных продуктов (пептоны, пептиды), а при полном гидролизе - аминокислоты.

Обладая одновременно кислыми карбоксильными и основными аминными группами, белки являются амфотерными веществами и могут вести себя, и как кислоты, и как основания. При определённом рН, характерном для каждого белка, диссоциация кислых и щелочных групп белковой частицы уравнивается, и заряд амфотерного иона белка становится минимальным. Такое рН раствора носит название изоэлектрической точки белка. В изоэлектрической точке белок наименее устойчив в растворе.

Структура белковой молекулы очень лабильна и даже мягкая обработка может привести к денатурации белка, в результате которой изменяются его биологические и физико-химические свойства.

Реакции на присутствие белка основаны на открытии в нём тех или иных химических групп и на его физико-химических свойствах.

Некоторые реакция присущи не только белкам, но и другим веществам, содержащим те же группы. Так, ряд цветных реакций на белок является по существу реакциями на ту или иную аминокислоту, входящую в состав белка.

Поэтому, для установления наличия белка недостаточно какой-нибудь одной реакции.

Белки разделяют на две группы: протеины, или простые белки, не содержащие небелковых групп, и протеиды, или сложные белки, содержащие помимо собственно белка, ещё и небелковую (простетическую) группу.

Среди простых белков животного происхождения чаще всего приходится встречаться с альбуминами и глобулинами.

Альбумины растворимы в воде, осаждаются при насыщении раствора сернокислым аммонием, обычно не содержат аминокислоты – глицина. Примерами альбуминов являются альбумины кровяной сыворотки, молока, яичного белка, альбумины мышц (миогены).

Глобулины не растворимы в чистой воде, но растворимы в присутствии в ней нейтральных солей; осаждаются в полунасыщенном растворе сернокислого аммония, т. е. при добавлении к раствору белка равного объема насыщенного раствора этой соли. К глобулинам относят глобулины сыворотки крови и молока, куриного яйца, мышечные глобулины (миозин, глобулин X).

Среди сложных белков следует отметить: хромопротеиды - соединения белка с пигментом, например, гемоглобин; нуклеопротеиды - соединения белка с нуклеиновыми кислотами; фосфопротеиды — белки, содержащие фосфор, например казеин, мукопротеиды (гликопротеиды) - соединение белка со сложными углеводами – мукополисахариды, например муцин слюны (простые углеводные группировки содержатся во многих белках)

Оборудование и реактивы: набор химической посуды, 1%-ный раствора яичного белка, реактив Миллона, α -Нафтол, 0,1% спиртовой раствор, Гипобромит натрия, 2%-ный раствор

Практическая часть:

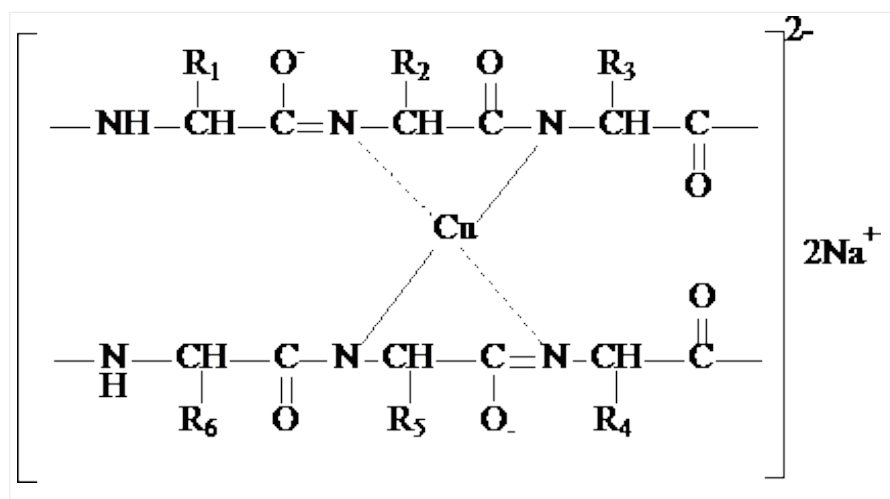
Опыт 1 Биуретовая реакция

(на обнаружение пептидных связей в белках)

В щелочной среде в присутствии солей меди белки дают фиолетовое окрашивание. Окраску дает комплексное соединение меди с пептидными группами: -CO-NH-. Биуретовая реакция получается также с продуктами неполного гидролиза белка – пептонами и полипептидами.

Эта реакция является универсальной для всех белков, так как она открывает наличие не менее двух пептидных связей (первичную структуру белка).

В основе биуретовой реакции лежит способность пептидных связей (-CO-NH-) в щелочной среде образовывать с сульфатом меди окрашенные комплексные соединения, цвет которых зависит от длины полипептидной цепи.



Раствор нативного белка дает сине-фиолетовое окрашивание, а продукты его гидролиза (пептиды) – красно-фиолетовый цвет.

Свое название биуретовая реакция получила от производного мочевины - биурета, который дает эту реакцию. Биурет образуется при нагревании мочевины с отщеплением от нее аммиака.

Помещают в сухую пробирку несколько кристалликов мочевины и нагревают на слабом огне. Мочевина сначала плавится. Когда сплавленная масса начнет твердеть, нагревание прекращают и дают пробирке остыть. В результате

нагревания из мочевины образуется биурет, а аммиак улетучивается (об этом узнают по запаху).

К полученному в пробирке биурету прибавляют около 1 мл 20% раствора сернокислой меди. При встряхивании получается характерное розовато-фиолетовое окрашивание. Необходимо избегать прибавления избытка раствора сернокислой меди, так как голубая окраска получающегося гидрата окиси меди может маскировать реакцию.

3 Прodelьвают биуретовую реакцию с раствором белка. В пробирку вносят 5-10 капель 1%-ного раствора яичного белка, 3-6 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1-2 капли 1%-ного раствора сульфата меди и перемешивают. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовое окрашивание.

Нельзя добавлять избыток сульфата меди, так как синий осадок гидрата окиси меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

Опыт 2 Нингидриновая реакция

Белки, полипептиды и свободные аминокислоты дают с нингидрином синее или фиолетовое окрашивание. Эта реакция характерна для аминогрупп в α -положении и обусловлена наличием α -аминокислоты в молекуле белка. При нагревании белка с водным раствором нингидрина происходит распад аминокислот на углекислый газ и аммиак, соответствующий аминокислоте альдегид и восстановленный нингидрин, который затем конденсируется со своей окисленной формой и аммиаком с образованием окрашенного продукта.

Нингидриновая реакция со спиртовым раствором нингидрина (или ацетона) широко используется для разделения аминокислот хроматографическим методом, для открытия отдельных аминокислот и определения их количества.

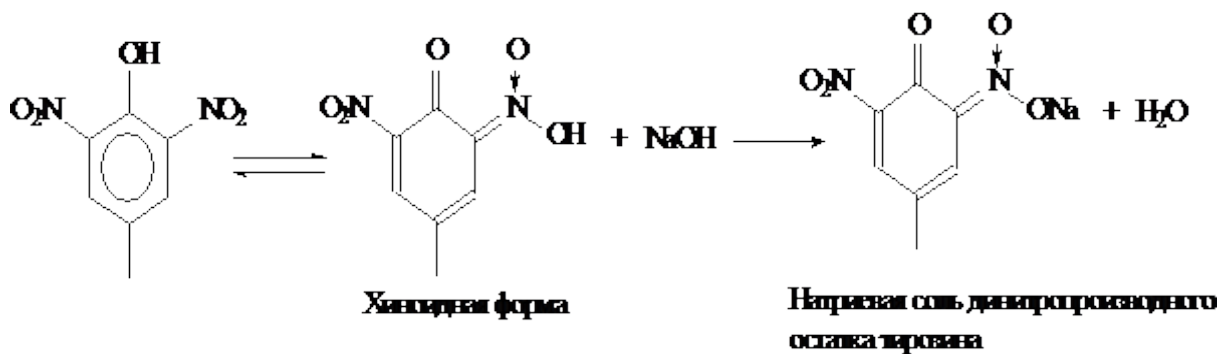
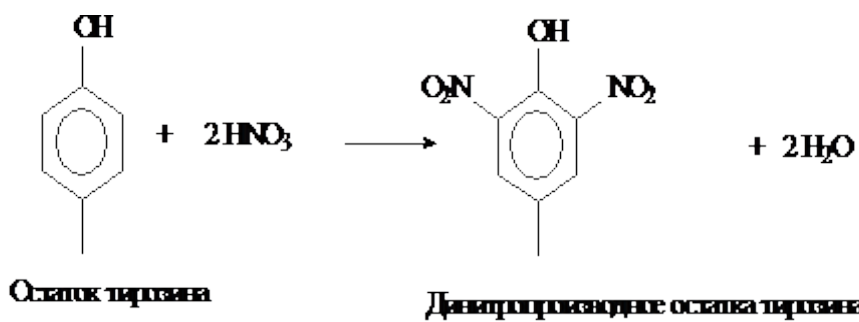
К 5-10 каплям 1%-ного раствора яичного белка приливают 5-10 капель 0,5%-ного водного раствора нингидрина и нагревают до кипения. Через 2-3 минуты развивается розовое или сине-фиолетовое окрашивание.

1 Прodelьвают реакцию с какой-нибудь аминокислотой, например с глицином. Наливают в пробирку около 1 мл раствора глицина, добавляют 5-6 капель слабого (0,1%) раствора нингидрина и нагревают. Появляется фиолетово-синее окрашивание

2 Так же производят нингидриновую реакцию с 1-2 мл раствора белка, взяв 0,3-0,5 мл раствора нингидрина. Получается фиолетовое (иногда фиолетово-розовое окрашивание). С течением времени раствор синее

Опыт 3 Ксантопротеиновая реакция.

Подавляющее большинство белков при нагревании с крепкой азотной кислотой дает желтое окрашивание, переходящее в оранжевое при добавлении щелочи или аммиака По-гречески «ксантос» - желтый, откуда реакция и получила название ксантопротеиновой. Такое желтое окрашивание можно наблюдать при попадании крепкой азотной кислоты на кожу, ногти, шерсть и т. п. Эта реакция характерна для бензольного ядра циклических аминокислот (тирозина, фенилаланина, и триптофана), которые содержится почти во всех белках. При действии крепкой азотной кислоты на эти аминокислоты происходит нитрование бензольного кольца с образованием нитросоединений желтого цвета. При добавлении щелочи желтое окрашивание переходит в оранжевое.



К 5-10 каплям 1%-ного раствора яичного белка добавляют 3-6 капель концентрированной азотной кислоты и (**осторожно!!!**) нагревают. Появляется осадок желтого цвета.

После охлаждения в пробирку (желательно на осадок) добавляют 5-10 капель 10%-ного раствора едкого натра до появления оранжевого окрашивания (оно связано с образованием натриевой соли полученных нитросоединений).

Опыт 4 Реакция Миллона

Фенолы, например, *карболовая* кислота, и их производные дают ртутные соединения красного цвета. Эти соединения получают при нагревании со специально приготовленным раствором ртути в азотной кислоте (реактив Миллона), содержащей азотистую кислоту.

Большинство белков дает миллонову реакцию, так как в их состав входит аминокислота тирозин, являющийся одновременно фенолом.

Сначала проделывают реакцию с карболовой кислотой (фенолом). Наливают в пробирку около 1-2 мл раствора карболовой кислоты, прибавляют около 0,5 мл реактива Миллона и осторожно нагревают. Появляется розовое окрашивание.

2. Проводят миллонову реакцию с раствором белка. В пробирку наливают 1-2 мл раствора белка и прибавляют 5-6 капель реактива Милона. Появляется осадок свернувшегося белка, так как реактив Милона содержит соли ртути и азотную кислоту. Содержимое пробирки осторожно нагревают. Осадок окрашивается в кирпично-красный цвет.

Следует избегать прибавления избытка реактива Милона, так как этот реактив содержит азотную кислоту, которая может дать желтое окрашивание (ксантопротеиновую реакцию), маскирующее реакцию Милона.

Продельывают аналогичным образом миллонову реакцию с раствором желатины. Если желатина достаточно чиста, реакция не получается, так как в молекуле желатина остаток тирозина отсутствует.

Опыт 5 Реакция Сакагучи

С помощью этой реакции обнаруживают аминокислоту аргинин, содержащую гуанидиновую группировку. Сущность реакции заключается в том, что эта группировка в присутствии щелочи и гипобромита окисляется и, соединяясь с α -нафтолом, образует окрашенное соединение красного цвета.

К 5 каплям 1%-ного раствора яичного белка приливают 5 капель 10%-ного раствора едкого нара, 3 капли 0,1%-ного спиртового раствора α -нафтола и по каплям (всего 1-5 капель) 2%-ного раствора гипобромита натрия. Жидкость в пробирке приобретает красный цвет.

Опыт 6 Реакция Адамкевича (на триптофан)

Эта реакция открывает аминокислоту триптофан и основана на его способности в кислой среде взаимодействовать с альдегидами кислот, и образовывать окрашенные продукты конденсации.

В пробирку вносят 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и 5 капель ледяной уксусной кислоты. Раствор вначале слегка нагревают, затем охлаждают и по стенкам пробирки (**осторожно!!!**), чтобы жидкости не смешивались, приливают 10 капель концентрированной серной кислоты. При стоянии на границе двух слоев наблюдается красно-фиолетовое окрашивание в виде кольца.

Опыт 7 Реакция Фоля

В состав молекулы большинства белков входят содержащие серу аминокислоты - цистин и цистеин. Под действием щёлочи эти аминокислоты легко отщепляют серу в виде сероводорода или сульфида натрия. Поэтому почти все белки дают положительную реакцию на слабо связанную серу.

К 5 каплям 1%-ного раствора яичного белка приливают 5 капель 30%-ного раствора гидроксида натрия и 1 каплю 5%-ного раствора ацетата свинца. Через 1-2 мин после интенсивного кипячения появляется бурый или черный осадок.

Ион серы S^{2-} , образующийся из цистеина или цистина в сильнощелочной среде можно обнаружить с помощью нитропруссидной реакции. К 10 каплям 1%-ного раствора яичного белка добавляют 10 капель 20%-ного раствора щелочи, интенсивно кипятят, затем после охлаждения приливают 3-5 капель свежеприготовленного 5%-ного раствора нитропрусида натрия, после чего появляется красно-фиолетовое окрашивание. Интенсивность окрашивания в данных реакциях зависит от количества аминокислот, содержащих серу, и от количества белка в растворе.

Опыт 8 Реакция на остаток аргинина (Сакагучи)

Белки, содержащие аргинин, дают розово-красное окрашивание с гипобромитом (или гипохлоритом) и α -нафтолом в щелочной среде. Окраска зависит от наличия в молекуле белка остатка аминокислоты аргинина

1 В пробирку наливают 1-2 мл раствора белка. Добавляют 1-2 капли 10% раствора едкого натра и 1-2 капли раствора α - нафтола (0,02%).

2 Перемешивают содержимое пробирки и прибавляют каплю гипобромита ($NaBrO$). Появляется малиново-красное окрашивание.

3 Таким же образом проделывают реакцию с раствором аргинина. Получается окраска кирпично-красного оттенка.

Опыт 9 Диазореакция

Белки дают оранжево-красное окрашивание с диазореактивом. Окраска зависит от образования окрашенных азосоединений с остатками аминокислот — тирозина,

триптофана и гистидина, входящих в состав белковой молекулы. Диазореакция используется для качественного и количественного определения тирозина и гистидина в белковых гидролизатах и других объектах.

1 Наливают в пробирку 1-2 мл раствора тирозина, 0,3-0,5 раствора соды и около 1 мл диазореактива. Появляется оранжево-красное окрашивание.

2 Прodelьывают ту же реакцию с раствором белка, беря его вместо раствора тирозина. Получается оранжево-красное окрашивание.

Опыт 10 Реакция на присутствие углеводных компонентов

Почти все белки содержат в своём составе углеводные компоненты. Благодаря этому большинства белков, как показали Баллас и Подобедов, в присутствии концентрированной серной кислоты дают характерное для углеводов фиолетовое окрашивание с α -нафтолом (реакция Молиша) или красное окрашивание с тимолом. Окраску с нафтолом или тимолом дают фурфурол и его производные, которые образуются из углеводов под действием концентрированной серной кислоты.

1 Наливают в 2 пробирки по 1-2 мл раствора сахара, добавляют в первую пробирку 5-6 капель раствора α -нафтола, а в другую пробирку - 5-6 капель раствора тимола.

2 Осторожно подслаивают в обе пробирки по 1-2 мл концентрированной серной кислоты. Наблюдают фиолетовое (в случае α -нафтола) и красное (в случае тимола) окрашивание на границе раздела серной кислоты и раствора сахара.

3 Прodelьывают те же реакции, взяв вместо раствора сахара раствор белка.

Отмечают положительную реакцию, указывающую на наличие углеводных групп в белке.

Опыт 11 Реакция Вуазене (на триптофан)

В пробирку внесите 2 мл раствора яичного белка и 1 каплю раствора формальдегида. К полученной смеси при охлаждении (лед) добавьте по каплям 6 мл серной кислоты (конц.). Через 10 мин внесите 10 капель раствора нитрита натрия. Аналитический эффект: сине-фиолетовый цвет раствора.

Содержащийся в яичном белке триптофан, конденсируясь с формальдегидом, образует окрашенный продукт конденсации бис-2-трипто-фанилметан (I), который окисляется до бис-2-триптофанилкарбинола (II), образующего в кислой среде соль, окрашенную в фиолетовый цвет.

Опыт 12 . Реакция Паули (на гистидин и тирозин)

Реакция Паули позволяет обнаружить в белке аминокислоты гистидин и тирозин, которые образуют с диазобензол-сульфоновой кислотой комплексные соединения вишнево-красного цвета. Диазобензол-сульфоновая кислота образуется в реакции диазотирования при взаимодействии сульфаниловой кислоты с нитритом натрия (или калия) в кислой среде:

К 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты (готовится на 5% растворе соляной кислоты) прибавляют 2 мл 0,5% раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают, добавляют 2 мл 1% раствора яичного белка и после перемешивания 6 мл 10% раствора карбоната натрия. После перемешивания смесь окрашивается в вишнево-красный цвет.

Продельывают эту реакцию с 0,1% раствором гистидина, сравнивают полученные результаты и делают вывод.

Контрольные вопросы:

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Дайте определение и приведите классификацию аминокислот.
- 3 Перечислите протеиногенные аминокислоты.
- 4 Сформулируйте правила образования названия аминокислот.
- 5 Перечислите качественные реакции на аминокислоты (реактивы, условия проведения, аналитический эффект).
- 6 Укажите реакции аминокислот по карбоксильной группе, напишите уравнения реакций.
- 7 Укажите реакции аминокислот по аминогруппе, напишите уравнения реакций.
- 8 Какие элементы можно обнаружить в составе аминокислот?

9 Предложите схему синтеза аланина из этилового спирта. Для аминокислоты напишите уравнения

реакций взаимодействия с гидроксидом натрия и соляной кислотой.

10 Сколько мл раствора NaOH (10 %, $\rho = 1,1$ г/мл) потребуется для нейтрализации карбоксильной группы аминокислоты (глицина), полученной из 3,2 г карбида кальция?

Практическое занятие №2 Реакции осаждения белков

Цель работы: ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций белки; закрепить представления о структурах белковых молекул

Теоретическая часть:

Устойчивость белков в биологических жидкостях организма человека обуславливают два фактора:

- заряд и водная оболочка – для гидрофильных белков
- только заряд – для гидрофобных белков.

Для каждого белка характерна по крайней мере одна трехмерная структура, в которой он стабилен и проявляет биологическую активность при физиологических условиях (рН, температура). Эта структура называется нативной конформацией белка.

При изменении внешних условий белки теряют нативную структуру.

Денатурация – изменение уникальной структуры белковой молекулы, приводящее к потере характерных свойств (растворимости, электрофоретической подвижности, биологической активности и т. д.)

Наиболее ярким признаком денатурации является резкое снижение биологической активности, при этом разрушаются в основном невалентные водородные и дисульфидные связи и не затрагиваются пептидные связи.

При непродолжительном действии возможен возврат биологической активности, т. е. ренатурация белка с полным восстановлением исходной структуры и нативных свойств.

Для белков характерны следующие основные физико-химические свойства: высокая вязкость растворов, незначительная диффузия, способность к набуханию в больших пределах, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, низкое осмотическое давление и высокое онкотическое давление, способность к поглощению лучей при 280 нанометрах (10–9м).

Оборудование и реактивы: набор химической посуды, фильтры, стеклянные палочки, спиртовки, пробирки, штативы, электрическая плитка, 1%-ный раствор

яичного белка, 1%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный раствор гидроксида натрия, концентрированные серная, соляная и азотная кислоты, 10%-ный раствор сульфосалициловой кислоты, 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, 10%-ный раствор сульфата меди, 5%-ный раствор ацетата свинца, 5%-ный раствор нитрата серебра, неразведенный яичный белок, насыщенный раствор сульфата аммония;

Практическая часть:

Опыт 1 Осаждение белка кипячением

Белки являются термолабильными соединениями и при нагревании свыше 5С наступает денатурация. Сущность тепловой денатурации заключается в разворачивании специфической структуры полипептидной цепи и разрушении гидратной оболочки белковых молекул, что проявляется заметным уменьшением их растворимости. Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в изоэлектрической точке белка, т. е. при таком значении рН среды, когда суммарный заряд белковой молекулы равен нулю. Белки, обладающие кислыми свойствами, осаждаются в слабокислой среде, а белки, обладающие щелочными свойствами – в слабощелочной. В сильнокислых и сильнощелочных средах денатурированный при нагревании белок в осадок не выпадает, так как частицы его перезаряжаются и несут в первом случае положительный, а во втором отрицательный заряд, что повышает его устойчивость в растворе.

В четыре пронумерованные пробирки приливают по 10 капель 1%-ного раствора яичного белка. Затем:

- а) первую пробирку нагревают до кипения. Раствор белка мутнеет, но так как частицы денатурированного белка несут заряд, они в осадок не выпадают. Это связано с тем, что яичный белок имеет кислые свойства (изоэлектрическая точка его равна рН 4,8) и в нейтральной среде заряжен отрицательно.
- б) во вторую пробирку добавляют 1 каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Выпадает осадок белка, так как белок приближается к изоэлектрической точке и белок теряет заряд.

в) в третью пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Осадка не образуется, так как в сильноокислой среде частицы белка приобретают положительный заряд (сохраняется один из факторов устойчивости белка в растворе).

г) в четвертую пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают до кипения. Осадка не образуется, так как в щелочной среде отрицательный заряд частиц увеличивается.

Опыт 2 Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Концентрированная серная, соляная, азотная и другие кислоты при взаимодействии с белком вызывают его денатурацию. Это связано с тем, что кислоты удаляют гидратную оболочку и нейтрализуют заряд молекулы. При избыточном количестве серной и соляной кислот выпавший осадок денатурированного белка вновь растворяется, по-видимому, за счет перезарядки молекул белка и частичного его гидролиза. При добавлении же избытка азотной кислоты растворения осадка не происходит (механизм этого явления до конца не изучен). Поэтому в клинических лабораториях при определении белка в моче пользуются азотной кислотой.

В три пробирки наливают по 5-10 капель концентрированных серной, соляной и азотной кислот. Затем, наклонив пробирку под углом 45°, осторожно по стенке пробирки (так, чтобы жидкости не смешивались) наслаивают такой же объем 1%-ного раствора яичного белка. На границе двух слоев жидкости появляется осадок белка в виде белого кольца. Затем, осторожно, встряхивая пробирки, обнаруживают растворение белка в пробирках с соляной и серной кислотами, тогда как в пробирке с азотной кислотой растворения белка не происходит.

Опыт 3 Осаждение белков органическими кислотами

Органические кислоты типа трихлоруксусной, сульфосалициловой вызывают необратимое осаждение белков, основанное на нейтрализации заряда и удалении гидратной оболочки с белковой молекулы. Однако, трихлоруксусная кислота денатурирует только белки, тогда как сульфосалициловая кислота осаждает и

белки, и высокомолекулярные полипептиды, поэтому в клинической лабораторной практике при определении остаточного азота используют трихлоруксусную кислоту., чтобы можно было отдельно определить содержание азота белков и других азотсодержащих веществ – пептидов, мочевины, аминокислот и др.

В две пробирки приливают по 5 капель 1%-ного раствора яичного белка, затем в одну из них вносят 1-2 капли 10%-ного раствора сульфосалициловой кислоты, а в другую – такое же количество 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. В пробирках выпадает осадок белка.

Опыт 4 Осаждение белков солями тяжелых металлов.

Белки при взаимодействии с солями ртути, свинца, меди и других тяжелых металлов денатурируют и выпадают в осадок. В основе этого процесса лежит адсорбция металла на поверхности белковой молекулы, в результате которой происходит образование нерастворимого комплекса. Это свойство белков широко используется в клинике при отравлениях солями тяжелых металлов. В качестве адсорбентов этих металлов применяют белки молока и сырых яиц, что приводит к ограничению всасывания металлов и снижению степени отравления.

Однако при избытке некоторых солей (ацетата свинца, сульфата меди) наблюдается растворение (пептизация) первоначально образовавшегося осадка. Это связано с накоплением ионов металла на поверхности денатурированного белка и появлением положительного заряда на белковой молекуле. При избытке солей серебра и ртути растворения осадка не происходит.

В три пробирки вносят по 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и прибавляют: в первую пробирку – 1 каплю 10%-ного раствора сульфата меди, во вторую – 1 каплю 5%-ного раствора ацетата свинца, в третью – такое же количество 5%-ного раствора нитрата серебра. Во всех пробирках выпадает осадок. Затем, в первую пробирку добавляют 10 капель 10%-ного раствора сульфата меди и наблюдают растворение осадка. В третью пробирку наливают 10 капель 5%-ного раствора нитрата серебра – растворение осадка не происходит.

Опыт 5 Осаждение белков органическими растворителями.

К 1 мл 1% раствора белка добавляют 2 мл органического растворителя (этанол, хлороформа, ацетона или эфира) и перемешивают. Образование осадка можно усилить добавлением нескольких капель насыщенного раствора хлорида натрия.

Опыт 6 Осаждение белков реактивами на алкалоиды.

Танин, пикриновая кислота, растворы диодида ртути в иодиде калия, фосфорновольфрамовая и фосфорномолибденовая кислоты взаимодействуют с группой веществ, содержащих пиррольные, индольные, имидазольные гетероциклы, несущие положительный заряд в слабокислой среде. Наличие подобных группировок в белках приводит к образованию осадков, при этом растворы надо подкислить.

Протамины и гистоны осаждаются в нейтральной среде.

В три пробирки наливают по 1 мл 1% раствора белка, по 4-5 капель 1% раствора уксусной кислоты и по 2-3 капли: в первую пробирку - 10% раствора пикриновой кислоты, во вторую - насыщенного раствора танина, в третью - 5% раствора железисто-синеродистого калия. Наблюдают выпадение осадка.

Обратимое осаждение белков

Опыт 5 Обратимое осаждение белков.

Обратимое осаждение белков – это процесс, когда под воздействием факторов осаждения белки выпадают в осадок, но после прекращения действия (удаления) факторов осаждения белки вновь растворяются и приобретают свои нативные свойства. При этом молекулы белка не подвергаются глубоким нарушениям.

Одним из видов обратимого осаждения является высаливание, которое проводится с помощью нейтральных растворов концентрированных солей щелочных и щелочноземельных металлов ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , Na_2SO_4 и др.

В основе осаждения лежит снятие заряда и удаление водной оболочки. Выпадение различных белков в осадок зависит от молекулярной массы и величины их молекул, заряда и степени гидрофильности. Поэтому с помощью метода высаливания можно разделять белки на фракции. Например, глобулины как более крупные и плотные молекулы белка будут выпадать в осадок при меньшей

концентрации солей. Тогда как альбумины, молекулы которых намного меньше и легче высаливаются более концентрированными растворами солей.

Этот метод применяется в клинических лабораториях для разделения белков сыворотки крови на фракции и их исследования, в медицинской промышленности – при получении белковых препаратов (лечебные сыворотки), в научных исследованиях – для выделения и очистки различных белков (ферменты, гормоны и др.)

Опыт 5 Альбумины и глобулины в природных белках

Альбумины и глобулины могут быть разделены, поскольку альбумины растворимы в воде, а глобулины - только в слабых растворах солей, а в крепких растворах (например, полунасыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ осаждаются).

а) Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка.

В пробирку наливают 30 капель неразведенного яичного белка и добавляют равное количество насыщенного раствора сульфата аммония. Содержимое пробирки перемешивают. Получается полунасыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, и при этом глобулиновая фракция белка осаждается, а альбуминовая фракция остается в растворе. Через 5 минут осадок отфильтровывают. На фильтре остается глобулиновая фракция, а в фильтрате – альбумины. Осадок с фильтра снимают стеклянной палочкой и переносят в пробирку, куда добавляют 5 капель воды. Осадок растворяется. Наличие в растворе белка можно доказать с помощью биуретовой реакции.

В пробирку с фильтратом добавляют порошок сульфата аммония до полного насыщения раствора, т. е. до тех пор, пока не прекратится растворение соли. При этом выпадает осадок – альбумины. Его отфильтровывают, растворяют и проводят биуретовую реакцию.

б) Мышечные белки.

Мышцы содержат белки, растворяющиеся в воде или очень слабых растворах солей. Миофибриллы мышечной клетки содержат сократительные белки (миозин и актин) и регуляторные белки (тропомиозин и тропонин). Белки миофибрилл не

растворяются в воде, но их можно экстрагировать из мышечной ткани солевыми растворами с концентрацией соли 0,5 моль/л. Многие белки саркоплазмы (гиалоплазмы мышечных клеток) растворимы в воде или в солевых растворах низкой концентрации (0,05 моль/л). При экстракции мышечной ткани 5% раствором хлорида калия извлекаются как миофибриллярные, так и саркоплазматические белки.

Мышечную кашицу, полученную измельчением мышцы какой-либо рыбы 5-10 г, растирают с 4-5 кратным количеством воды — в воде будут находиться миоальбумины и сходные с ним белки. Отфильтрованный осадок смешивают с 4-5 кратным количеством 0,6 М раствора KCl и растирают в ступке 10-20 минут; в раствор переходит миозин.

Полученный гомогенат фильтруют через два слоя марли. С фильтратом (или центрифугатом) проделывают цветные реакции на белки (биуретовую, ксантопротеиновую, реакции Милона, Фоля и Сакагучи). Тот и другой белковой экстракт разливают по пробиркам и прибавляют по каплям 0.5% раствор уксуснокислого свинца. Появляются осадки.

Примечание. Если экстрагировать мышцу 0,5 М раствором HCl не 20 минут, а сутки - в раствор перейдет более сложный глобулин - актомиозин.

Контрольные вопросы:

1. Общая характеристика, элементарный состав, история изучения белков. Формирование представления о белках как о классе соединений и важнейшем компоненте живых организмов. Исследования Мульдера, Данилевского, Фишера и др.
2. Структура, свойства, классификация и общая характеристика протеиногенных аминокислот.
3. Первичная структура белков (умение писать структуры пептидов). Зависимость биологических, свойств белков от первичной структуры. Методы исследования первичной структуры.

4. Конформация пептидных цепей в белках (вторичная, надвторичная и третичная структуры). Слабые внутримолекулярные взаимодействия в пептидной цепи; дисульфидные связи.
5. Четвертичная структура белков. Кооперативные изменения конформации протомеров на примере гемоглобина, аллостерических ферментов.
6. Биологические функции белков. Способность к специфическим взаимодействиям. И специфическое узнавание как основа биологических функций всех белков. Комплементарность структуры центра связывания белка и лиганда; зависимость связывания от концентрации лиганда.
7. Глобулярные и фибриллярные белки. Пространственные конфигурации (α -кератиновая, β -кератиновая) фибриллярных белков, их свойства.
8. Общая характеристика физико-химических свойств белков. Растворимость и осаждаемость белков. Факторы стабилизации белковой молекулы в растворах.
9. Высаливание белков. Высаливающие агенты. Механизм высаливания. Практическое использование высаливания.
10. Денатурация белков. Факторы, механизм, практическое использование денатурации белков.
11. Электрические свойства белков. Механизм возникновения электрического заряда белков. Изоэлектрическая точка. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови на бумаге, протеинограмма здорового человека.

Практическое занятие №3 Сложные белки

Цель работы: изучить состав сложных белков – хромопротеидов, фосфопротеидов, нуклеопротеидов

Теоретическая часть:

Сложные белки – комплексы, состоящие из белка и небелкового компонента, называемого простетической группой. К сложным белкам относятся: нуклеопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды, металлопротеиды и сложные белки-ферменты. Так, небелковой частью хромопротеидов являются окрашенные вещества, фосфопротеидов – фосфорная кислота, нуклеопротеидов – нуклеиновые кислоты и т. д. С помощью цветных реакций можно открыть составные компоненты сложных белков.

Реакции на нуклеопротеиды

Нуклеопротеиды состоят из белка и нуклеиновых кислот, которые построены из монопнуклеотидов.

Нуклеиновые кислоты – это биополимеры, мономерными звеньями которых являются нуклеотиды живых организмах нуклеиновые кислоты входят в состав нуклеопротеидов. Нуклеопротеиды – комплексы белка, являющиеся важнейшими составными элементами ядер живых клеток и вирусов. Связь белка, обладающего основными свойствами, с молекулами нуклеиновой кислоты (НК) в них осуществляется за счет солеобразных и водородных связей и легко разрушается путем солевой коагуляции белка. В результате этого процесса НК могут быть выделены в свободном виде. Нуклеотидами (в широком смысле) называют природные или синтетические соединения, в которых гидроксилы углеводного остатка нуклеозиды этерифицированы одной или несколькими фосфатными группами, т. е. он является нуклеозидфосфатом.

Нуклеозиды – это природные или синтетические соединения, молекулы которых состоят из пуринового или пиримидинового основания, связанного N-гликозидной связью с остатком D-рибозы или 2,-дезокси-D-рибозы.

Важнейшую роль в установлении строения НК сыграла реакция гидролиза, который можно осуществить ступенчато по приведенной схеме:

Нуклеопротеид → Нуклеиновая кислота (+ Белок) → Нуклеотид →
→ Нуклеозид (+H₃PO₄) → Пурины + Пиримидины + Пентозы

Молекулы нуклеиновых кислот всех типов живых организмов – это длинные неразветвленные полимеры полинуклеотидов. Роль мостика между нуклеотидами выполняет 3, 5-фосфорнодиэфирная связь, соединяющая 5-фосфат одного нуклеотида и 3,-гидроксил остаток углеводной составляющей следующей. Поэтому такая цепь является полярной. На одном ее конце остается свободной 5-О-Фн-группа, а на другом – 3-ОН-группа остатка фосфорной кислоты у 5 атома углерода одного мононуклеотида с гидроксильной группой пентозы у 3 атома углерода другого. Данный тип связи осуществляет "первичную структуру" нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты классифицируют на 2 типа:

1 – дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), из которых при полном гидролизе можно выделить аденин, гуанин, цитозин, тимин, дезоксирибозу и фосфорную кислоту;

2 – рибонуклеиновые кислоты (РНК), гидролизующиеся до аденина, гуанина, цитозина, урацила, рибозы и фосфорной кислоты.

Нуклеиновые кислоты в клетке находятся в виде нуклеопротеиновых комплексов, которые рассматриваются как сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты.

Для качественного анализа химического состава нуклеопротеидов может быть использован гидролизат дрожжей как объект, богатый нуклеопротеидами. При частичном гидролизе нуклеопротеиды распадаются на белок (протамины или гистоны) и нуклеиновые кислоты. При полном гидролизе нуклеопротеидов могут быть обнаружены: полипептиды (биуретовая реакция), пуриновые основания дают специфическую реакцию образования осадка солей серебра; фосфорную кислоту

обнаруживают молибдатом аммония, рибозу или дезоксирибозу – по реакции "серебряного серебра", с реактивом Фелинга или пробой Троммера.

Оборудование и реактивы: 1 г пекарских дрожжей, 10%-ный раствор серной кислоты, дистиллированная вода, концентрированный раствор аммиака, 1%-ный раствор нитрата серебра, 1%-ный спиртовой раствор тимола концентрированная серная кислота, молибденовый реактив (7,5 г молибдата аммония, вода, 32%-ная азотная кислота ($\rho = 1,2$ г/мл), 2 мл молока, ледяная уксусная кислота, стеклянная палочка, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 10%-ный раствор азотной кислоты, 0,5%-ный раствора фенолфталеина, 1%-ный раствор яичного белка, круглодонная колба на 100 мл, фильтры, пробка с обратным холодильником длиной 25-30 см, стеклянные палочки, спиртовка, пробирки, штативы, асбестовая сетка

Практическая часть:

Опыт 1. Приготовление гидролизата дрожжей

1 г пекарских дрожжей помещают в круглодонную колбу на 100 мл и добавляют 20 мл 10%-ного раствора серной кислоты и 20 мл дистиллированной воды. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником длиной 25-30 см, закрепляют в несколько наклонном положении и кипятят под тягой 1 ч на асбестовой сетке при слабом нагревании. Затем охлаждают, доводят до первоначального объема и фильтруют. Фильтрат используют для дальнейшей работы

Опыт 2. С гидролизатом проводят следующие реакции:

а) **биуретовую** – для подтверждения наличия белков в составе нуклеопротеидов: к 6 каплям гидролизата прибавляют 10 капель 10%-ного раствора едкого натра до отчетливой щелочной реакции (по лакмусу, опущенному в пробирку), затем 2 капли 1%-ного раствора сульфата меди; появляется розовая или фиолетовая окраска.

б) **пробу на пуриновые основания.** Она основана на образовании комплексных пуриновых оснований с солями серебра.

К 10 каплям гидролизата добавляют 10 капель до щелочной реакции (по лакмусу, опущенному в пробирку) концентрированного раствора аммиака и 10 капель 2%-ного раствора нитрата серебра. Через 3-5 мин образуется рыхлый осадок бурого цвета.

в) **реакцию Молиша** – на пентозную группировку. В её основе лежит взаимодействие тимола с фурфуролом, образующимся из пентоз при нагревании с серной кислотой, что приводит к появлению окрашенного продукта конденсации. К 10 каплям гидролизата дрожжей прибавляют 2-3 капли 1%-ного спиртового раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно) – 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание.

г) **качественная реакция на углевод**. К 5 каплям гидролизата дрожжей приливают 3 капли 0,2%-ного раствора α -нафтола и 20 капель концентрированной серной кислоты; появляется розово-фиолетовое окрашивание.

д) **молибденовую пробу** – на фосфорную кислоту, когда при взаимодействии с молибденовым реактивом образуется фосфорная соль молибдата аммония. В пробирку с 3-5 каплями гидролизата дрожжей вносят 20 капель молибденового реактива. Кипятят несколько минут. При охлаждении образуется желтый кристаллический осадок.

Опыт 3. Реакции на фосфопротеиды.

Простетической группой этих сложных белков является фосфорная кислота.

Представителями фосфопротеидов являются казеиноген молока, вителлин яиц, ихтулин икры рыб, ферменты – пепсин, фосфоорилаза и др.

Биологическая роль фосфопротеидов заключается в том, что они служат одним из питательных материалов для развития эмбрионов и для растущих организмов. Так, казеиноген молока содержит все незаменимые аминокислоты и фосфорную кислоту. Вместе с казеиногеном в организм ребенка попадает фосфорная кислота, необходимая для развития скелета и процессов обмена веществ.

Опыт 4. Выделение казеиногена из молока

80% белков молока приходится на долю специфического фосфопротеида казеина. Этот белок обладает кислыми свойствами и находится в молоке в виде растворимой кальциевой соли. При подкислении казеин выпадает в осадок в виде белых рыхлых хлопьев, которые легко отделяются фильтрованием. Не следует добавлять в молоко избыток кислоты, так как молекулы казеиногена перезаряжаются и вновь переходят в раствор, что мешает осаждению.

К 2 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды и затем 2 капли ледяной уксусной кислоты. Выпавший осадок отфильтровывают и промывают на фильтре 2 раза дистиллированной водой, а затем собирают стеклянной палочкой в пробирку и используют для следующих работ.

Опыт 5. Доказательство белковой природы казеиногена

С частью осадка казеиногена прodelьвают цветные реакции на белки и аминокислоты – биуретовую, Фоля, Миллона.

Оставшуюся часть осадка подвергают гидролизу, для чего помещают его в пробирку, куда добавляют 2 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия. Пробирку закрывают пробкой со стеклянной трубкой и кипятят 10-15 мин на асбестовой сетке. Охлаждают. В гидролизате **открывают фосфорную кислоту.**

Гидролизат подкисляют несколькими каплями 10%-ного раствора азотной кислоты, в присутствии 1-2 капель 0,5%-ного раствора фенолфталеина до обесцвечивания и отфильтровывают в сухую пробирку. К 5 мл фильтрата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят несколько минут. Раствор окрашивается в лимонно-желтый цвет, а при стоянии выпадает осадок такого же цвета фосфомолибденовокислого аммония.

Опыт 6. Реакции на гликопротеиды

Это сложные белки, простетическая группа которых представлена углеводами, а также их производными (гексозаминами, глюкуроновой кислотой, сиаловой кислотой и др.) они входят в состав ткани, слизи (муцин), клеточных мембран. Простетическая группа гликопротеидов представлена нейтральными и кислыми мукополисахаридами. К кислым мукополисахаридам относятся гиалуроновая,

хондроитинсерная кислоты и гепарин. Гиалуроновая кислота входит в состав соединительной ткани, роговицы глаза, стекловидного тела, пупочного канатика, сердечных клапанов. Хондроитинсерная кислота содержится в хрящевой и соединительной тканях, гепарин – в легких и печени.

Нейтральные мукополисахариды входят в состав слизистых секретов – слюны, желудочного сока, в веществах, определяющих группу крови, в гормонах, в ферментах (трансферрин, холинэстераза). Мукополисахариды могут встречаться в тканях и жидкостях организма и в свободном состоянии.

Гликопротеиды играют важную роль в организме, неся опорную и защитную функции, препятствуя проникновению в организм инфекции. Входя в состав межклеточного и межтканевого вещества, они оказывают цементирующее действие, являются связкой в суставах.

Опыт 7. Открытие углеводного компонента в яичном белке

В сухую пробирку вносят 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и проводят реакцию Молиша. К 10 каплям раствора яичного белка прибавляют 2-3 капли 1%-ного спиртового раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно) – 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание.

Опыт 8. Выделение муцина из слюны

В пробирку собирают 2-3 мл слюны и добавляют 4-5 капель ледяной уксусной кислоты. Выпадает осадок муцина. Жидкость из пробирки осторожно сливают, а с осадком муцина проводят реакцию Молиша для доказательства присутствия углевода в этом белке.

Контрольные вопросы:

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Укажите элементный состав белков и пептидов.
- 3 Охарактеризуйте свойства пептидов.
- 4 Белки как природные полипептиды.
- 5 Функции белков.

6 Классификация белков.

7 Структуры белка.

8 Понятие о коагуляции и денатурации. Причины данных явлений.

9 Растворимость белков.

10 Отношение белков к нагреванию в нейтральной, кислой и щелочных средах.

11 Качественные реакции на белки (реактивы, условия проведения, аналитический эффект).

12 Укажите общие цветные реакции на белки и аминокислоты

13 Укажите условия выделения казеина из молока.

14 Какой состав имеют продукты гидролиза казеина?

Практическое занятие №4 Ферменты

Цель работы: ознакомить студентов с методиками проведения ферментативных реакций на примере сахарозы, амилазы, холинэстеразы

Теоретическая часть:

Ферменты — биологические катализаторы белковой природы. Термин фермент (от лат. fermentum закваска) был предложен в начале XVII в. голландским ученым Ван. Гельмонтом для веществ, влияющих на спиртовое брожение. Ферменты и катализаторы неорганической природы, подчиняясь общим законам катализа, имеют сходные признаки:

- катализируют только энергетически возможные реакции;
- не изменяют направление реакции;
- не расходуются в процессе реакции;
- не участвуют в образовании продуктов реакции.

Почти все химические процессы в организмах и в различных производственных смесях протекают при участии ферментов.

Ферменты очень чувствительны к воздействию тепла, кислот, щелочей и солей металлов.

Большинство ферментов в водном растворе при комнатной температуре быстро теряет свою активность, поэтому растворы и препараты ферментов необходимо хранить при пониженных температурах. При длительной работе с растворами ферментов необходимо вносить антисептики (толуол или тимол) во избежание развития в растворах микроорганизмов.

Ферменты можно экстрагировать из растительного или животного материала водой, а затем водным экстрактом действовать на тот или иной субстрат (например, на крахмал или на белок). Учитывая количество образующихся продуктов реакции или изменения субстрата, определяют активность того или иного фермента. Так определяется активность ферментов, растворимых в воде. Однако ферменты не всегда растворяются в воде. Например, фермент липаза из семян клещевины не растворяется в воде. Поэтому в некоторых случаях

применяются автолитические методы, основанные на том, что размолотый и растертый испытуемый материал помещается в воду и оставляется на определенное время при температуре 40-45°C. Под действием как растворимых, так и нерастворимых ферментов, содержащихся в испытуемом материале, происходят соответствующие реакции. Таким образом, определяется суммарное действие ферментов, как растворимых в воде, так и нерастворимых.

Действие ферментов можно определить по вызываемому ферментами изменению окраски субстрата, по накоплению продуктов распада субстрата, по изменению вязкости, по изменению угла вращения плоскости поляризации и другими способами.

Белковую часть сложных белков ферментов называют апоферментом, а небелковую – кофактором. Кофактор условно делится на кофермент (коэнзим), легкодиссоциирующий и простетическую группу, труднодиссоциирующую. Кофермент легко присоединяется к различным апоферментам, а простетическая группа соединяется только с одним апоферментом.

Оборудование и реактивы: 1% раствора крахмала, термостат или водяная баня, 1% раствор йода, 5 % раствор сульфата меди, 10% раствор гидроокиси натрия, дистиллированная вода, 2% раствор соляной кислоты, 1% раствор хлорида натрия, 1% раствор сульфата меди, 5% эмульсия сухих сливок, 5% раствор панкреатина, 1% раствор фенолфталеина, 1% раствор карбоната натрия.

Практическая часть:

Опыт 1. Реакция на крахмал. В одну из пробирок добавляет 1 каплю 1% раствора йодида калия (реакция с йодом). В присутствии крахмала появляется синее окрашивание.

Опыт 2. Реакция Троммера. В другую – 3 капли 5 % раствора сульфата меди и 5 капель 10% раствора гидроокиси натрия и осторожно нагревают до кипения (реакция Троммера). Появление красного окрашивания указывает на присутствие в растворе конечных продуктов гидролиза крахмала – глюкозы и мальтозы.

Аналогичную процедуру сделать с содержимым пробирки №2.

Результат должен показать, что в присутствии воды гидролиза крахмала не происходит, и реакция с йодом должна быть положительной, а реакция Троммера – отрицательной, тогда как в присутствии амилазы слюны результаты должны быть противоположными, так как произошел гидролиз крахмала.

Опыт 3. Влияние температуры на активность ферментов. Ферменты весьма чувствительны к температуре и проявляют свою наивысшую активность при оптимальном ее значении, которая для ферментов тела человека находится в пределах 35-45°C. При высокой температуре (выше 50°C) их активность снижается, а затем наступает инактивация, так как при этом нарушается структура активного центра и не происходит соединения его с субстратом.

Степень инактивации зависит от длительности теплового воздействия. Вследствие тепловой денатурации белковой молекулы фермента происходит замедление и прекращение ферментативных реакций. При низких температурах ферменты хорошо сохраняются, но скорость ферментативного катализа резко снижается. Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется температурным оптимумом фермента. Различные клеточные ферменты имеют собственные температурные оптимумы, которые определяются экспериментально. Для ферментов животного происхождения температурный оптимум находится в интервале 40...50 °C.

В термолабильности ферментов можно убедиться на примере действия фермента амилазы слюны

В две пробирки прилить по 10 капель 1% раствора крахмала. Затем в одну из них добавить 5 капель раствора слюны, разведенной в 5 раз, а в другую – такое же количество предварительно прокипяченной в течение 10 мин слюны. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат на 15 мин при 37°C, после чего с содержимым каждой пробирки сделать реакции с йодом, Троммера. В пробирке с прокипяченной слюной гидролиза крахмала не произойдет (почему?).

Опыт 4. Специфичность действия ферментов. Каждый фермент действует только на одно вещество или на группу сходных субстратов, что обусловлено

соответствием структуры фермента, точнее его активного центра и структуры субстрата. Например, амилаза действует только на крахмал, сахароза – только на сахарозу и т. п.

Специфичность действия бывает абсолютная (действует только на определенный субстрат), относительная, групповая и стереохимическая. Высокая специфичность ферментов определяется только тем, что только некоторые строго определенные функциональные группы, входящие в состав ферментов, могут участвовать в образовании фермент – субстратного комплекса. Специфичность – это избирательность фермента по отношению к субстрату (или субстратам).

Специфичность действия ферментов объясняется тем, что субстрат должен подходить к активному центру как "ключ к замку".

Амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов, не действуя на дисахариды. Сахароза состоит из двух молекул глюкозы, но на неё не действует амилаза, поэтому пробирка с сахарозой не даст реакции в реактиве Фелинга.

В две пробирки (№1) вносят 10 капель 1% раствора крахмала, в другую (№2) – 10 капель 2% раствора сахарозы. Затем в пробирки добавляют по 4 капли раствора слюны, разведенной в 5 раз. Перемешивают и оставляют в термостате на 15 мин. при 37°C. После этого с содержимым всех четырех пробирок проводят реакции с йодом, с реактивом Фелинга: к 5 каплям исследуемого раствора приливают 3 капли реактива, нагревают пробирку до кипения и кипятят в течение 1 мин. В случае положительной реакции на глюкозу наблюдается красное окрашивание вследствие образующейся закиси меди

Приготовление реактива Фелинга: медный купорос х. ч. выкристаллизовывают из горячего раствора и высушивают на фильтровальной бумаге. Готовят отдельно два раствора: а) 200 г сегнетовой соли и 150 г едкого натра разводят в мерной колбе (1 л) и доводят водой до метки; б) 40г медного купороса разводят в колбе вместимостью 1 л и доводят водой до метки. Перед употреблением смешивают эти два раствора в равных пропорциях.

Опыт 5 Влияние рН среды на активность ферментов. Для каждого фермента существует определенное значение реакции среды, при которой он проявляет наивысшую активность. Изменения рН вызывают снижение или полное торможение деятельности фермента. В основе этого лежит нарушение структуры активного центра (при изменении реакции среды происходит изменение заряда функциональных групп, входящих в состав активного центра). Большинство ферментов проявляет максимальную активность при значениях рН, близких к нейтральным. Лишь отдельные ферменты "работают" в сильно кислой или сильно щелочной среде. Например, активность пепсина – фермента, гидролизующего белки в желудке, – максимальна при рН 1,5...2,5. В щелочной среде "работают" ферменты, локализованные в кишечнике. Изменение оптимального для данного фермента значения рН-среды может привести к изменению третичной структуры фермента, что скажется на его активности. С другой стороны, при изменении рН может измениться ионизация субстрата, что повлияет на образование фермент-субстратного комплекса.

Оптимум рН для амилазы слюны можно определить при взаимодействии её с крахмалом при различных значениях рН.

О степени расщепления крахмала судят по его реакции с раствором йода. При оптимальном значении рН расщепление крахмала произойдет полностью и реакция на крахмал с йодом будет отрицательная, но по мере удаления от этой точки в кислую или щелочную среду расщепление крахмала произойдет только частично, до стадии декстринов, которые дадут и йодом красно-бурую или фиолетовую окраску, или же крахмал вообще не будет расщепляться и реакция с йодом будет положительная.

а) В 8 пробирках приливают по 1 мл дистиллированной воды, а затем в пробирку №1 вносят 1 мл 0,2% раствора соляной кислоты, перемешивают и отбирают из нее 1 мл смеси, которую переносят в пробирку №3 и так далее. Из пробирки №8 отбирают 1 мл и выливают. Таким образом, получают различные разведения соляной кислоты, которые соответствуют различным значениям рН среды. После

этого в каждую пробирку добавляют по 2 мл 1% раствора крахмала и по 1 мл раствора слюны, разведенной 1:10. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат на 15 мин при 37°C. Затем охладить и добавить во все пробирки по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия. Отметить, что полный гидролиз крахмала произошел в пробирках № 5 и 6, где рН среды раствора находится в пределах 6,8 – 7,2, т. е. оптимальных для действия амилазы.

Опыт 6. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов.

Различные вещества могут вызывать или активирование действия фермента (активаторы) или тормозить его активность (ингибиторы). Примерами активаторов служат ионы хлора для амилазы, желчные кислоты для липазы поджелудочной железы, тогда как в качестве ингибиторов амилазы выступают ионы меди; цитохромов, ферментов, участвующих в биологическом окислении, - цианиды и т. п.

Активаторы и ингибиторы влияют на активный центр фермента, способствуют образованию его или блокированию. Они могут взаимодействовать с аллостерическим центром и тем самым менять ферментативную активность. Например, сульфат меди оказывает тормозящее действие на активность амилазы. Ингибиторами нередко являются продукты промежуточных или конечных реакций какого-либо биохимического процесса. Некоторые природные или синтетические вещества оказывают избирательное ингибирующее действие на ферменты и используются в качестве лекарственных препаратов. В больших дозах подобные вещества могут оказаться ядами.

Обратимые ингибиторы

Различают три типа обратимого ингибирования ферментов; конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное,

Конкурентным называют ингибитор, обратимо взаимодействующий с активным центром фермента. Как правило, конкурентные ингибиторы по структуре похожи на субстрат и могут вытесняться из фермент-ингибиторного комплекса избытком субстрата. Взаимодействие с конкурентным ингибитором не приводит к

денатурации или инактивации фермента, поэтому при замене ингибитора на субстрат скорость ферментативной реакции не снижается.

Неконкурентные ингибиторы взаимодействуют с ферментами не в области активного центра, а на каком-то от него удалении, причем никаким избытком субстрата из комплекса не удаляются. При взаимодействии ингибитора с ферментом происходит изменение его конформации с последующей частичной дезинтеграцией активного центра.

Бесконкурентное ингибирование имеет место, когда ингибитор взаимодействует с ферментом только в составе фермент-субстратного комплекса, препятствуя его распаду. Примером необратимого действия ингибиторов на ферменты могут служить фосфорорганические вещества, применяемые в качестве инсектицидов.

В пробирку №1 вносят 1 каплю 1% раствора хлорида натрия, в пробирку №2 – 1 каплю 1% раствора сульфата меди, а в пробирку №3 – 1 каплю воды. Затем во все пробирки добавляют по 10 капель слюны в разведении 1:5. Перемешивают и вносят в каждую пробирку по 5 капель 1% раствора крахмала и оставляют 1-3 мин при комнатной температуре. После чего вносят во все пробирки по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия.

Контрольные вопросы:

- 1 Правила техники безопасности при выполнении работы.
- 2 Понятие о ферментах.
- 3 Классификация ферментов.
- 4 Строение фермента.
- 5 Как можно обнаружить присутствие фермента в исследуемом материале?
- 6 Перечислите основные факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции.
- 7 Чем обусловлена специфичность ферментов?
- 8 Понятие об ингибиторах и активаторах.
- 9 Обратимое и необратимое ингибирование.
- 10 Методика исследования свойств сахаразы.

11 Методика исследования свойств амилазы.

12 Методика проведения биохимической реакции.

13 Особенность действия фосфорорганических соединений на фермент холинэстеразу.

14 Уравнение реакции гидролиза: сахарозы, крахмала, бутирилхолинйодида.

15 Определение ингибирующего действия хлорофоса.

Практическое занятие №5 Нуклеиновые кислоты

Цель работы: провести кислотный гидролиз пекарских дрожжей, изучить некоторые продукты гидролиза дрожжей

Теоретическая часть:

Нуклеиновые кислоты, биополимеры, состоящие из остатков фосфорной кислоты, сахаров и азотистых оснований (пуринов и пиримидинов). Имеют фундаментальное биологическое значение, поскольку содержат в закодированном виде всю генетическую информацию любого живого организма, от человека до бактерий и вирусов, передаваемую от одного поколения другому.

Нуклеиновые кислоты были впервые выделены из клеток гноя человека и спермы лосося швейцарским врачом и биохимиком Ф.Мишером между 1869 и 1871.

Впоследствии было установлено, что существует два типа нуклеиновых кислот: рибонуклеиновая (РНК) и дезоксирибонуклеиновая (ДНК), однако их функции долго оставались неизвестными.

В 1928 английский бактериолог Ф.Гриффит обнаружил, что убитые патогенные пневмококки могут изменять генетические свойства живых непатогенных пневмококков, превращая последние в патогенные. В 1945 микробиолог О.Эвери из Рокфеллеровского института в Нью-Йорке сделал важное открытие: он показал, что способность к генетической трансформации обусловлена переносом ДНК из одной клетки в другую, а следовательно, генетический материал представляет собой ДНК. В 1940–1950 Дж.Бидл и Э.Тейтум из Станфордского университета (шт. Калифорния) обнаружили, что синтез белков, в частности ферментов, контролируется специфическими генами. В 1942 Т.Касперсон в Швеции и Ж.Браше в Бельгии открыли, что нуклеиновых кислот особенно много в клетках, активно синтезирующих белки. Все эти данные наводили на мысль, что генетический материал – это нуклеиновая кислота и что она как-то участвует в синтезе белков. Однако в то время многие полагали, что молекулы нуклеиновых

кислот, несмотря на их большую длину, имеют слишком простую периодически повторяющуюся структуру, чтобы нести достаточно информации и служить генетическим материалом. Но в конце 1940-х годов Э.Чаргафф в США и Дж.Уайатт в Канаде, используя метод распределительной хроматографии на бумаге, показали, что структура ДНК не столь проста и эта молекула может служить носителем генетической информации.

Структура ДНК была установлена в 1953 М.Уилкинсом, Дж.Уотсоном и Ф.Криком в Англии. Это фундаментальное открытие позволило понять, как происходит удвоение (репликация) нуклеиновых кислот. Вскоре после этого американские исследователи А.Даунс и Дж.Гамов предположили, что структура белков каким-то образом закодирована в нуклеиновых кислотах, а к 1965 эта гипотеза была подтверждена многими исследователями: Ф.Криком в Англии, М.Ниренбергом и С.Очоа в США, Х.Кораной в Индии. Все эти открытия, результат столетнего изучения нуклеиновых кислот, произвели подлинную революцию в биологии. Они позволили объяснить феномен жизни в рамках взаимодействия между атомами и молекулами.

Типы и распространение. Как мы уже говорили, есть два типа нуклеиновых кислот: ДНК и РНК. ДНК присутствует в ядрах всех растительных и животных клеток, где она находится в комплексе с белками и является составной частью хромосом. У особей каждого конкретного вида содержание ядерной ДНК обычно одинаково во всех клетках, кроме гамет (яйцеклеток и сперматозоидов), где ДНК вдвое меньше. Таким образом, количество клеточной ДНК видоспецифично. ДНК найдена и вне ядра: в митохондриях («энергетических станциях» клеток) и в хлоропластах (частицах, где в растительных клетках идет фотосинтез). Эти субклеточные частицы обладают некоторой генетической автономией.

Бактерии и цианобактерии (сине-зеленые водоросли) содержат вместо хромосом одну или две крупные молекулы ДНК, связанные с небольшим количеством белка, и часто – молекулы ДНК меньшего размера, называемые плазмидами. Плазмиды

несут полезную генетическую информацию, например содержат гены устойчивости к антибиотикам, но для жизни самой клетки они несущественны. Некоторое количество РНК присутствует в клеточном ядре, основная же ее масса находится в цитоплазме – жидком содержимом клетки. Большую ее часть составляет рибосомная РНК (рРНК). Рибосомы – это мельчайшие тельца, на которых идет синтез белка. Небольшое количество РНК представлено транспортной РНК (тРНК), которая также участвует в белковом синтезе. Однако оба этих класса РНК не несут информации о структуре белков – такая информация заключена в матричной, или информационной, РНК (мРНК), на долю которой приходится лишь небольшая часть суммарной клеточной РНК.

Генетический материал вирусов представлен либо ДНК, либо РНК, но никогда обеими одновременно.

Оборудование и реактивы: спектрофотометр, термостат, раствор ДНК – 0,003%.

Практическая часть:

Чистоту препаратов нуклеиновых кислот определяют по спектральной кривой поглощения в ультрафиолетовом свете и по величине отношений $E_{260} : E_{230}$ и $E_{240} : E_{280}$.

В спектрофотометрическую кювету наливают 3мл раствора ДНК (0,003%) и на спектрофотометре измеряют оптическую плотность (D) при длине волн: 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 нм.

На основе полученных данных строят график зависимости D (ДНК) от длины волны. Находят максимум поглощения в ультрафиолетовом свете препарата ДНК. Затем высчитывают отношения $E_{260} : E_{230}$ и $E_{240} : E_{280}$. Для препаратов нуклеиновых кислот достаточно хорошо очищенных от примесей белков и полисахаридов, эти показатели должны быть в пределах 2,1 – 2,4. Делают вывод о чистоте исследованного препарата ДНК.

Контрольные вопросы:

1. Сложные белки, общая характеристика, классификация..

2. Нуклеопротеины – строение, классификация, биологическая роль. Уровни упаковки ДНК в составе хроматина. Строение простетической группы нуклеопротеинов – понятие о нуклеиновых кислотах, отличия ДНК от РНК.
3. Собственно гликопротеины. Классификация. Характеристика простетической группы гликопротеинов – классификация, структура, химические свойства углеводов. Гликопротеины слизи.
4. Гликопротеины плазмы крови. Методы их исследования. Биологическая роль отдельных представителей (трансферрин, гаптоглобин, церрулоплазмин, транскортин, урогликопротеиды и др.).
5. Протеогликаны. Строение простетической группы – гликозаминогликанов. Принцип построения протеогликановых комплексов, цементирующая роль гиалуронвой кислоты.
6. Понятие о мукополисахаридах или болезнях накопления гликозаминогликанов в тканях.

Практическое занятие №6 Липиды

Цель работы: ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на липиды

Теоретическая часть: Липиды (от греч. липос – жир) – низкомолекулярные органические соединения, практически нерастворимые в воде, которые могут быть извлечены из клеток неполярными органическими растворителями (хлороформ, бензол, петролейный эфир). Отличительным свойством липидов является их гидрофобность (липофильность). Липиды представляют собой разнородные химические соединения

I Простые липиды:

1 ацилглицеролы (жиры, триглицериды и т. п.);

2 воска.

II Сложные липиды:

1 фосфолипиды

- глицерофосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, кардиолипин, плазмалоген);

- сфингофосфолипиды (сфингомиелин);

2 стероиды (холестерол, эргостерол, ланостерол, стигмастерол, экдистероиды);

3 гликолипиды (цереброзиды, ганглиозиды, сульфатиды).

Для характеристики жира используют константы или жировые числа:

Кислотное число – масса КОН (мг), необходимая для нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г жира.

Число омыления – это масса КОН (мг), необходимая для гидролиза нейтральных липидов (омыления) и нейтрализации всех жирных кислот (в том числе и свободных), содержащихся в 1 г жира. Чем выше число омыления, тем больше низкомолекулярных кислот входит в состав жира.

Йодное число – это масса йода (г), связываемая 100 г жира. Йодное число характеризует степень ненасыщенности, так как присоединение йода происходит

по месту разрыва кратных связей в остатке жирной кислоты. Чем больше йодное число, тем выше ненасыщенность жира.

Липиды широко применяют в медицине и технике. Из них получают основу для мазей, мыло (соли жирных кислот), масляные краски, олифу и т. п.

Оборудование и реактивы: Жиры (говяжий, свиной, бараний) 10 г, масло (подсолнечное, касторовое, растительное) 10 г, толуол, ацетон, петролейный эфир, диэтиловый эфир, гексан, этиловый спирт, серная кислота (конц.), соляная кислота (0,5н), соляная кислота (разб. 1:1), гидроксид калия (водный 0,1 н), гидроксид калия, (спиртовой раствор 0,5н), раствор гидроксида натрия (разб.), раствор карбоната натрия 10%, гидросульфат калия (безвод.), раствор нитрата серебра, аммиак (водный раствор), раствор фуксинсернистой кислоты, спиртовой раствор йода (0,2н), раствор тиосульфата натрия (0,1н), раствор крахмала 1 %, бромная вода, раствор гидроксида натрия 35 %; пробирки, колбочки для титрования, держатель, спиртовка, водяная баня, кристаллизатор со льдом, часовое стекло, бюретки.

Практическая часть:

Опыт 1 Растворимость жиров и масел

а) в 5 пробирок поместите по небольшому кусочку твердого жира (свиного, говяжьего и т. п.) и прилейте по 1 мл: 1 – воды, 2 – этанола, 3 – толуола, 4 – петролейного эфира, 5 – ацетона. Если жир не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости жира на холоде и при нагревании.

б) в 5 пробирок поместите по 0,5 мл растительного масла (подсолнечного, оливкового, кукурузного и т. п) и прилейте по 1 мл: 1 – воды, 2 – этанола, 3 – толуола, 4 – петролейного эфира, 5 – ацетона. Если масло не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости растительного масла на холоде и при нагревании.

Опыт 2 Гидролиз жиров и масел

а) В 2 пробирки поместите по небольшому кусочку жира и прилейте в 1 пробирку 1...2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую – 1...2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5...10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе жиров на холоду и при нагревании.

б) в 2 пробирки поместите по 0,5 мл растительного масла и прилейте в 1 пробирку 1...2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую – 1...2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5...10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе растительного масла на холоде и при нагревании.

Опыт 3 Выделение жира из молока

К 6 мл цельного молока прибавляют 2 мл 10 %-ного раствора Na_2CO_3 , хорошо перемешивают и взбалтывают с 5 мл эфира. Эфирный слой помещают в чашечку для выпаривания на водяную баню (под тягой). После испарения эфира остается сливочное масло – молочный жир.

Опыт 4 Обнаружение глицерина в жирах (акролеиновая проба)

В пробирку вносят 2...3 капли масла (жира), 0,1...0,2 г безводного KHSO_4 и нагревают на спиртовке (под тягой) до появления белых густых паров. В пары вносят бумажку, смоченную аммиачным раствором нитрата серебра или раствором фуксинсернистой кислоты.

Аналитический эффект: Бумажка с раствором солей серебра темнеет, а с раствором фуксинсернистой кислоты становится ярко-розовой.

Акролеиновая проба проводится для обнаружения в липидах глицерина. При нагревании в присутствии водоотнимающих средств (KHSO_4 , MgSO_4 , борная кислота) из глицерина образуется непредельный альдегид – акролеин (пропеналь).

Опыт 5 Определение ненасыщенности кислот в составе жира

В пробирку поместите 2–3 капли масла (жира) и 8 – 10 капель бромной воды.

Пробирку встряхните.

Аналитический эффект: Обесцвечивание бромной воды

Опыт 6 Определение йодного числа

В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают 3...4 капли масла (жира).

Колбу повторно взвешивают на аналитических весах. По разности весов рассчитывают массу навески масла (жира). В колбу добавляют 25 мл спирта (при плохой растворимости слегка подогревают на водяной бане). Затем в колбу вносят 12,5 мл 0,2н спиртового раствора йода (из бюретки), 100 мл воды и перемешивают 5 мин. Содержимое колбы титруют 0,1н раствора тиосульфата натрия до появления слабо желтого окрашивания.

Для более точного определения в колбу приливают 1 мл раствора крахмала и титрование заканчивают до исчезновения синего окрашивания.

Опыт повторяют – контроль, но без масла (жира).

Расчет йодного числа проводят по формуле:

$$\text{И. ч.} = (V_2 - V_1) \times 0,0127 \times 100 / m,$$

где V_2 – объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование контроля; V_1 – объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование пробы масла; 0,0127 – титр тиосульфата по йоду; m – навеска масла (г)

Опыт 7 Определение кислотного числа

В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают примерно 2 мл масла (жира) – 2...3 г. Колбу повторно взвешивают на аналитических весах. По разности рассчитывают массу навески масла (жира) \approx 2...3 г. В колбочку добавляют 10...15 мл смеси спирта с эфиром (1:1), 1...2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н раствор КОН до появления слабо-розового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать в течение 0,5...1 мин.

Кислотное число рассчитывают по формуле:

$$\text{К. ч.} = V T / m,$$

где К. ч. – кислотное число; V – объем (мл) спиртового раствора КОН, пошедшего на титрование (мл); T – титр 0,1 н раствора КОН; m – масса навески масла (жира), г.

Опыт 8 Омыление жиров

В фарфоровую чашечку поместите 0,5 мл касторового масла (жира) и 4 капли 35 %-ного раствора гидроксида натрия. Тщательно размешайте смесь стеклянной палочкой до получения однородной эмульсии и поставьте на песчаную баню.

Продолжайте тщательно размешивать смесь до получения однородной прозрачной слегка желтоватой жидкости. Затем добавьте 2 мл дистиллированной воды и вновь нагрейте, тщательно перемешивая до полного удаления воды. В результате получается кусочек твердого белого мыла.

Опыт 9 Определение числа омыления

В 2 колбочки помещают: 1...0,5 г жира (навеска на аналитических весах), 2...0,5 мл воды. Затем в обе колбочки добавляют по 15 мл 0,5н спиртового раствора КОН. Колбочки закрывают пробками, соединенными с обратными холодильниками, и кипятят на водяной бане 30...40 минут.

После охлаждения в колбочки прибавляют по 15...20 мл воды, 3–4 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,5н раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания.

Расчет числа омыления проводят по формуле:

$$\text{Ч. о.} = (V_2 - V_1) \times 28 / m,$$

где Ч. о. – число омыления; V_2 – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование контроля; V_1 – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование пробы масла; m – навеска масла (г); 28 – масса КОН в 1 мл спиртового раствора.

Контрольные вопросы:

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Дайте определение и проведите классификацию липидов.
- 3 Укажите функции липидов в организме.
- 4 Особенности высших жирных кислот, входящих в состав липидов человека.

- 5 Приведите примеры качественных реакций, доказывающих неопредельный характер ВЖК.
- 6 Напишите структурные формулы представителей простых и сложных липидов: ТАГ, фосфолипидов, холестерина.
- 7 Какие реакции лежат в основе омыления жира?
- 8 Какие числа характеризуют состав и строение липидов?
- 9 Перечислите компоненты, участвующие в переваривании жиров.
- 10 Значение ВЖК, холестерина в метаболических процессах.

Литература:

Основная литература:

1. Барышева, Е. С. Биохимия Электронный ресурс : Учебное пособие / Е. С. Барышева. - Оренбург : Оренбургский государственный университет, ЭБС АСВ, 2017. - 142 с. - Книга находится в премиум-версии ЭБС IPR BOOKS. - ISBN 978-5-7410-1888-0, экземпляров неограничено
2. Емельянов, В.В.; Биохимия Электронный ресурс : учебное пособие / Н.Н. Мочульская / Н.Е. Максимова / В.В. Емельянов. - Биохимия, 2022-08-31. - Екатеринбург : Уральский федеральный университет, ЭБС АСВ, 2016. - 132 с. - Книга находится в базовой версии ЭБС IPRbooks. - ISBN 978-5-7996-1893-3, экземпляров неограничено

Дополнительная литература:

1. Глинка, Н. Л. Общая химия / Н. Г. Глинка ; Под ред. А. И. Ермакова. - Изд. 30-е, испр. - М. : Интеграл-Пресс, 2003. - 728с. - Библиогр.: с. 704. - Предм. указ.: с. 706. - ISBN 5-89602-017-1
2. Димитриев, А.Д.; Биохимия Электронный ресурс : учебное пособие / А.Д. Димитриев. - Саратов : Вузовское образование, 2018. - 111 с. - Книга находится в базовой версии ЭБС IPRbooks. - ISBN 978-5-4487-0165-8, экземпляров неограничено