Tema 1 Общие принципы биохимического исследования. Основные методы разделения биохимического материала

Лабораторная работа №1: Изучение кинетики ферментативной реакции

А. Зависимость скорости ферментативной реакции от количества фермента

Ход работы. Взять четыре пробирки и налить в каждую по 3 *мл* фосфатно—цитратной буферной смеси с pH 6,8 (смесь № 24, см. Б часть работы). Затем в каждую пробирку поместить по 4 *мл* 0,25% —ного раствора крахмала и добавить по возможности одновременно, в первую пробирку 1 *мл* слюны, разведенной в 20 раз, во вторую — 1 *мл* слюны, разведенной в 40 раз, в третью — 1 *мл* слюны, разведенной в 80 раз и в четвертую — 1 *мл* слюны, разведенной в 160 раз. Без промедления поместить пробирки в термостат при температуре 38° C, а затем время от времени брать пробы в количестве нескольких капель и смешивать в отдельных пробирках с сильно разбавленным раствором I_2 в КІ. В начале пробы дают синее, а затем красно—фиолетовое и красное окрашивание. Отмечают с точностью до 0,5 *мин* время от начала опыта до исчезновения синего окрашивания с йодом для каждой из четырех пробирок. Этот момент является концом амилолитического расщепления.

Результаты опыта изобразить графически, откладывая по оси абсцисс относительную концентрацию амилазы, а по оси ординат соответствующее время.

Время, необходимое для расщепления крахмала, обратно пропорционально скорости реакции.

Б. Определение $[H^+]$ оптимальной для амилолитической активности амилазы слюны

Ход работы. Взять, семь пробирок и налить в каждую по *5мл* фосфатно–цитратной буферной смеси по следующей схеме:

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7
№ смеси	10	15	17	21	24	27	30
pH	4,0	5,0	5,4	6,2	6,8	7,4	8,0

Затем в каждую пробирку налить по 4 *мл* 0,25%—ного раствора крахмала и по 1 *мл* разведенной слюны. Без промедления поместить все пробирки в термостат при температуре 38° С. Время от времени брать из всех пробирок пробы в количестве нескольких капель и смешивать в отдельных пробирках с сильно разбавленным раствором I_2 в КІ. Вначале пробы дают синее окрашивание, а по прошествии некоторого времени красно-фиолетовое или красное окрашивание и, наконец, перестают давать окраску с йодом.

Для каждой из пяти пробирок отметить время (с точностью до 0,5 мин), когда проба перестает давать синее окрашивание. Этот момент можно считать концом амилолитического расщепления. Полученные результаты изобразить графически. Для этого по оси абсцисс нанести рН опытов, а по оси ординат — соответствующее время расщепления крахмала. Нанесение точки соединить кривой.

Данные опыта записать по следующей форме:

рН	Время, мин		
4,0	160		
5,0	110		
5,4	60		
6,2	8		
6,8	5		
7,4	14		
8,0	85		

Опыт, в котором расщепление произошло в наиболее короткий срок, соответствует максимальной активности фермента, а pH этого опыта — оптимальной $[H^+]$.

В. Влияние хлористого натрия и фенилтиомочевины на амилолитическую активность амилазы слюны

Ход работы. В три пробирки налить по 1 *мл* 0,25—0,5% раствора крахмала и по 4 *мл* буферной смеси с рН 6,8 (смесь № 24). Затем в первую пробирку налить 3 *мл* воды, во вторую 3 *мл* 0,1 %—ного раствора хлористого натрия, а в третью - 3 *мл* 0,02%—ного раствора фенилтиомочевины. После этого в каждую пробирку добавить по 1 *мл* разведенной слюны и сразу поставить в термостат (температура 38° C). Время от времени брать пробы и отмечать для каждой пробирки время, необходимое для исчезновения (в пробе) синего окрашивания с раствором I_2 в КІ. Сравнивая время расщепления крахмала во второй и третьей пробирках с временем расщепления в первой пробирке (контроль), вычислить соответствующее ускорение в минутах.