

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

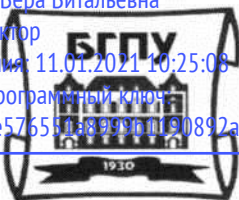
ФИО: Щёкина Вера Витальевна

Должность: Ректор

Дата подписания: 11.01.2021 10:25:08

Уникальный программный ключ:

a2232a55157e576511a89996d190892af539894204263368b6575a454e57789



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования

Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины



УТВЕРЖДАЮ
Проректор по УР ФГБОУ ВО «БГПУ»
М.Ю. Попова
«23» марта 2016 г.

Рабочая программа дисциплины

ЭНЗИМОЛОГИЯ

Направление подготовки
06.06.01 БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Направленность
«ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ»

Уровень высшего образования
АСПИРАНТУРА

Квалификация
«ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ»

Принята
на заседании кафедры химии
(протокол № 8 от «20» мая 2015г.)

Благовещенск 2016

**КОПИЯ
ВЕРНА**



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА
Рабочая программа дисциплины

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
1 Пояснительная записка.....	3
2 Учебно-тематический план.....	5
3 Содержание дисциплины.....	6
4 Методические рекомендации (указания) для аспирантов по изучению дисциплины.....	9
5 Практикум по дисциплине.....	11
6 Дидактические материалы для контроля (самоконтроля) усвоенного материала.....	23
7 Перечень информационных технологий	35
8 Список литературы и электронных ресурсов.....	35
9 Материально-техническая база.....	37
10 Лист изменений и дополнений	40



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА
Рабочая программа дисциплины

1 ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

1.1 Цель и задачи освоения учебной дисциплины

Цель дисциплины: сформировать у аспирантов знания о роли ферментов в обмене веществ и энергии и процессе адаптации растений к факторам среды.

Задачи дисциплины:

- Изложить аспирантам необходимые теоретические сведения о строении и роли ферментов как катализаторов биохимических реакций;
- Дать аспирантам основные сведения о кинетике действия ферментов и их регуляции;
- Расширить и углубить знания аспирантов о роли множественных форм ферментов в приспособлении растений к изменяющимся условиям среды;
- Познакомить аспирантов с методами выделения очистки и применения ферментов в промышленности и сельском хозяйстве.

1.2 Место дисциплины в структуре ООП

Дисциплина «Энзимология» относится к вариативной части дисциплины по выбору Б1.В.ОД.7.

1.3 Перечень планируемых результатов обучения при освоении дисциплины, соотнесённых с планируемыми результатами освоения ООП

Выпускник, освоивший программу аспирантуры, должен обладать следующими **общепрофессиональными компетенциями (ОПК):**

- способностью самостоятельно осуществлять научно-исследовательскую деятельность в соответствующей профессиональной области с использованием современных методов исследования и информационно-коммуникационных технологий (ОПК-1);

профессиональными компетенциями (ПК):

- владение знаниями о механизмах адаптации растений на молекулярном уровне (ПК-1).

В результате изучения дисциплины аспирант должен:

Формируемые компетенции	Планируемые результаты обучения
ОПК-1: способностью самостоятельно осуществлять научно-исследовательскую деятельность в соответствующей профессиональной области с использованием современных методов исследования и информационно-коммуникационных	Знание: цели и задачи научных исследований по направлению деятельности, базовых принципов и методов их организации; основных источников научной информации и требований к представлению информационных материалов Умение: составлять общий план работы по заданной теме, предлагать методы исследования и способы обработки результатов, проводить исследования по согласованному с руководителем плану, представлять полученные результаты в научном



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА
Рабочая программа дисциплины

Формируемые компетенции	Планируемые результаты обучения
технологий	сообществе Навыки: приобретения систематических знаний по направлению деятельности; получения углубленных знаний по выбранной направленности подготовки, базового проведения научно-исследовательских работ по предложенной теме.
ПК-1 владение знаниями о механизмах адаптации растений на молекулярном уровне	Знание: особенностей состава биомолекул растений, специфики их метаболизма и понимания взаимосвязи строение – свойства – биологические функции молекул; локализации физиолого-биохимических процессов в растениях, их ход и механизмы регуляции на всех структурных уровнях организации растительного организма; зависимости хода физиолого-биохимических процессов от внутренних и внешних факторов среды; молекулярно-генетического ответа растения на воздействие экологических факторов; Умение: рассчитывать, строить и анализировать диаграммы энзиматической активности и схемы энзимогамм ферментов; пользоваться биохимическими показателями в процессе прогнозирования адаптации растений к различным условиям среды; Навыки: использования современных методов исследования и получения информации о ходе физиолого-биохимических процессов в растительном организме, поиска новых сведений в области физиологии и биохимии растений, связанных с изучением молекулярно-генетических механизмов адаптации.

1.4 Объем дисциплины и виды учебной работы

Общая трудоемкость дисциплины на очной и заочной формах обучения и по индивидуальному плану обучения на очной и заочной форме составляет 108 часов (3 зачетных единицы), из них лекционных – 24 часа, 30 часов отводится на лабораторные работы. Курс завершается зачетом в 3 семестре.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

Объем дисциплины и виды учебной работы
на очной и заочной формах обучения и
по индивидуальному плану обучения на очной и заочной формах

Вид учебной работы	Всего часов	Семестры
Общая трудоемкость	108	3
Аудиторные занятия	54	
Лекции	24	
Лабораторные работы	30	
Самостоятельная работа	54	
Вид итогового контроля		зачет

2. УЧЕБНО-ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН

2.1 Учебно-тематический план для очной и заочной формы обучения и индивидуального плана обучения на очной и заочной формах

№ п/п	Раздел программы	Количество часов				
		Всего	Ауд	СР	ЛК	ПР
1	2	3	4	5	6	7
1	Раздел 1. Классификация и номенклатура ферментов. История изучения классификации ферментов. Методы регистрации ферментативной активности.	17	11	6	2	9
2	Раздел 2. Строение ферментов и механизм действия. Структурная и функциональная организация ферментов. Структура белковых молекул. Физико-химические свойства ферментов. Механизм и кинетика ферментативной реакции. Простые и сложные ферменты. Коферменты. Строение и классификация.	45	21	24	12	9
3	Раздел 3. Механизмы регуляции ферментативной активности. Регуляция ферментативной активности. Ингибиторы: классификация и применение. Множественные формы ферментов и их роль в адаптации	22	12	10	6	6
4	Раздел 4. Методы выделения и очистки ферментов. Применение ферментов. Локализация ферментов. Ферменты – маркеры. Иммобилизованные ферменты.	24	10	14	4	6
5	Всего	108	54	54	24	30

2.2 Интерактивное обучение по дисциплине «Энзимология»

№	Тема занятия	Форма интерактивного занятия	Кол-во часов
---	--------------	------------------------------	--------------



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

1	Классификация и номенклатура ферментов	Лекция-дискуссия	2
2	Коферменты. Строение и классификация	Лекция с заранее объявленными ошибками	2
3	Регуляция ферментативной активности.	Лекция-консультация	2
4	Множественные формы ферментов и их роль в адаптации.	Лекция-дискуссия	2
5	Выделение и очистка каталазы из семян сои	Лаб. раб.	2
	Всего		10

3. СОДЕРЖАНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Раздел 1. Классификация и номенклатура ферментов

История изучения классификации ферментов. Современная международная номенклатура ЕС – enzyme code. Организации, занимающиеся вопросами классификации и номенклатуры – IUBMB IUPAC. Значение и недостатки единой системы номенклатуры. Классы ферментов, подклассы и подподклассы. Характеристика трансфераз, гидролаз, оксидоредуктаз, лиаз, синтаз, изомераз.

Методы регистрации ферментативной активности. Способы количественного выражения активности ферментов. Единицы ферментов. Международная единица. Катал. Удельная активность, молекулярная активность, активность каталитического центра. Определение активности ферментов. Расчёт ферментативной активности при определении активности по конечной точке и при кинетическом определении. Методы определения активности ферментов: колориметрический, спектрофотометрический, флуориметрический, манометрический, биolumинесцентный, иммунохимический, и др. Энзим-электрофорез – метод обнаружения множественных форм ферментов.

Раздел 2. Строение и механизм действия ферментов

Структурная и функциональная организация ферментов. Белковые и небелковые ферменты (рибозимы). Общая характеристика катализаторов. Дать определение ферментам. Структура белковых молекул. Общие свойства ферментов и других катализаторов. Отличия ферментов от неорганических катализаторов.

Простые и сложные ферменты. Особенности структурной организации белковых молекул ферментов. Холофермент, апофермент, коферменты: кофакторы и простетические группы. Общие механизмы действия кофакторов. Классификация коферментов и характеристика основных представителей различных групп (глутатион, липоевая кислота, убихиноны, коферменты – производные пиридоксина, тиаминпирофосфат, биотин, коферменты – переносчики фосфата, кофермент А, никотинамидные коферменты, флавиновые коферменты, кобамидные коферменты, железопорфириновые коферменты). Принципы пространственной организации молекулы фермента, проблемы сворачивания полипептидной цепочки в нативную конформацию (фолдинг), ее важность для энзимологии. Современные представления о механизмах формирования пространственной структуры белка; иерархический принцип сворачивания; промежуточные состояния в процессе организации нативной конформации; современное



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

состояние знаний о белках теплового шока и структуре шаперонов; домены, их структурные и функциональные характеристики; роль мультидоменной организации молекулы фермента в определении ее функциональных свойств, формирование активного центра на границе между доменами. Роль подвижности доменов в катализе, структурные основы реализации феномена индуцированного соответствия, регуляторные домены, домены, обеспечивающие связывание с мембранами; факторы определяющие эффективность и специфичность ферментативного катализа, комплементарность между ферментом и субстратом. Роль доменов в осуществлении аллостерической регуляции.

Топография активных центров простых и сложных ферментов. Активный центр ферментов. Якорный (субстратсвязывающий) и каталитический сайты активных центров. Активные центры простых и сложных ферментов. Методы определения аминокислот, входящих в активные центры ферментов. Химическая модификация, действие ингибиторов, квазисубстраты, алкилирование, блокирование SH-групп. Роль серина, гистидина, лизина, тирозина, цистеина, аргинина, аспарагиновой и глутаминовой кислот в активных центрах. Глицин, цистеин и пролин как структурообразующие аминокислоты. Использование энергии связывания фермента с субстратом в катализе; природа сил, стабилизирующая различные конформационные состояния системы фермент-субстрат (водородные связи, гидрофобные взаимодействия и др.); типы катализа, используемые в ферментативных реакциях; функциональные группы ферментов.

Структура активных центров на примере лактатдегидрогеназы и химотрипсина. Методы идентификации активного центра ферментов. Использование методов рентгеноструктурного анализа и сайт-специфического мутагенеза для изучения топографии активных центров. Ингибиторный анализ. Биоинформационный подход в изучении активных центров ферментов.

Специфичность – особая способность фермента осуществлять выбор субстрата данной структуры из большой совокупности близких по строению веществ. Концепция стерического соответствия «ключ-замок» (Э. Фишер). Теория индуцированного соответствия субстрата активному центру фермента (Д. Кошланд). Абсолютная специфичность действия (уреаза). Стереоспецифичность ферментов (D- и L-стереоизомеры, *цис*- и *транс*-стереоизомеры). А - и В-классы NAD(P)-зависимых дегидрогеназ. Относительная или групповая специфичность действия. Протеазы как пример ферментов с относительной специфичностью. Специфичность сериновых протеаз (трипсин, химотрипсин, эластаза). Каталитические центры гидролаз. Деление гидролаза на четыре типа по строению активного центра и механизму действия. Карбоксипептидаза А, образование активной формы фермента из прокариоксипептидазы А. Субстраты фермента. Структура активного центра КПА: субстратсвязывающие и каталитические аминокислотные остатки.

Каталитические антитела (абзимы) как примитивные ферменты; структура и механизм действия ферментов отдельных групп. Роль металлов в функционировании ферментов.

Понятие ферментативной активности. Влияние концентрации фермента на скорость ферментативной реакции. Влияние концентрации субстрата. Теория Михаэлиса-Ментен. Способы графического определения константы Михаэлиса и максимальной



скорости реакции. Количественное соотношение между концентрацией субстрата и скоростью реакции. Использование кинетических параметров для сравнения активностей ферментов.

Влияние температуры и pH среды на скорость ферментативных реакций.

Раздел 3. Механизмы регуляции ферментативной активности

Регуляция активности ферментов внутриклеточными сигналами. Изостерическая регуляция (регуляция доступностью субстрата, кофактора). Компартиментализация субстратов и ферментов. Регуляция продуктом реакции. Аллостерические механизмы регуляции. Регуляция активности фосфофруктокиназы. Аллостерические механизмы регуляции пируватдегидрогеназного комплекса.

Ковалентная модификация ферментов и ее типы. Химическая модификация ферментов – быстрый механизм регуляции активности ферментов внешними сигналами. Типы химической модификации ферментов (фосфорилирование, аденилирование и уридилирование, ацетилирование, ADP-рибозилирование). Аденилатциклаза, фосфолипаза C. Протеинкиназы, типы. Протеинкиназа A, регуляция активности cAMP. Протеинкиназа C, регуляция активности диацилглицеролом, фосфолипидами и ионами кальция. Обратимость процесса ковалентной модификации. Протеинфосфатазы. Специфические рецепторы: серпентиновые и тирозинкиназные рецепторы. Рецепторы – ионные каналы. Каскадный механизм регуляции активности гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы гормонами.

Регуляция с помощью белок-белковых взаимодействий (присоединение или отщепление регуляторных субъединиц или белков-регуляторов). Регуляция активности аденилатциклазы, киназы гликогенфосфорилазы.

Разные типы регуляции активности ферментов; полифункциональные ферменты, функциональные преимущества, возникающие в результате белок-белковых взаимодействий в составе молекулы полифункциональных ферментов; четвертичная структура ферментов, роль четвертичной структуры в стабилизации молекулы фермента и регуляции активности ферментов. Уровни регуляции ферментативной активности. Образование ферментов из неактивных предшественников (проферментов, зимогенов). изменение ковалентной структуры фермента в результате расщепления одной или нескольких пептидных связей. Активация трипсина, химотрипсина, эластазы, карбоксипептидазы A, фосфолипазы A2 и пепсина.

Регуляция путём изменения количества ферментов и путём изменения их индивидуальной каталитической активности. Контроль количества ферментов в клетке – процесс, зависящий от соотношения скоростей их биосинтеза и деградации. Время полужизни различных ферментов. Биосинтез ферментов и его регуляция на генетическом уровне. Конститутивные и индуцибельные (адаптивные) ферменты. АТР-зависимые протеазы прокариот. Репрессия и индукция биосинтеза ферментов. Убиквитин-протеосомный путь деградации белков у эукариот. Убиквитин – белок, маркирующий белки для деградации.

Способы регуляции контроля разветвлённых метаболических путей. Ингибиторы ферментов и их классификация. Конкурентное, неконкурентное, бесконкурентное, смешанное ингибирование. Способы определения типа и константы ингибирования.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА
Рабочая программа дисциплины

Структура и механизм действия ферментов отдельных групп. Множественные формы ферментов и их биологическая роль. Построение нового типа ферментов. Изоферменты. Роль ферментов в адаптации.

Раздел 4. Методы выделения и очистки ферментов

Современные методы исследования ферментов. Экстрагирование ферментов из биологического материала. Кислотная обработка, термическая обработка, фракционирование солями, органическими растворителями, метод избирательной адсорбции, ионообменная хроматография, гельфилтрация, аффинная хроматография, электрофорез, изоэлектрофокусирование, ультрацентрифугирование, кристаллизация. Комбинирование различных методов для очистки ферментов на примере глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Критерии чистоты ферментных препаратов.

Тканевое, региональное, клеточное и субклеточное распределение ферментов. Локализация ферментов в клетке. Понятие компартментализации на примере лизосомальных, митохондриальных ферментов. Ферменты – маркеры субклеточных структур: ядерные, митохондриальные, лизосомальные, цитозольные ферменты. Использование ферментов-маркеров в диагностике, пищевых технологиях, сельском хозяйстве и научных исследованиях.

**4. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ И (УКАЗАНИЯ) ДЛЯ АСПИРАНТОВ
ПО ИЗУЧЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Дисциплина Энзимология имеет основополагающее значение, поскольку главным объектом его изучения являются ферменты – катализаторы и регуляторы всех биохимических процессов живых систем. Энзимология изучает каталитически активные белки, их строение, функции, взаимосвязь и зависимость от внутренних и внешних факторов.

Лабораторно-практические занятия являются важным этапом в изучении энзимологии. Основной метод – экспериментальный. Вместе с содержанием науки эксперимент стал неотъемлемой частью обучения. Постановка опытов позволяет закрепить и углубить теоретические знания отдельных функций растительного организма, научиться устанавливать причинно-следственные связи между ними и условиями окружающей среды. На лабораторно-практических занятиях аспирант осваивает методы, которые могут быть полезны для диагностики состояния фитоценозов, оценки селекционного материала, физиологической характеристики хранящихся продукции, физиологического мониторинга насаждений. Практикум позволяет научиться самостоятельно приобретать знания в процессе работы с литературой и выполнения эксперимента – осуществлять анализ и синтез, систематизацию знаний, сравнивать, делать обобщения и выводы, находить эффективные способы приложения теории к практике. , Для развития самостоятельной работы аспирантов при индивидуальном обучении, необходимо по каждому разделу дисциплины изучить основную и дополнительную литературу, пройти собеседования, подготовить самостоятельные письменные работы, в которые включены базовые вопросы курса, написать реферат, эссе, а также пройти тестирование СЭО «БГПУ».

В результате изучения данной дисциплины аспирант должен знать классификацию и номенклатуру ферментов, их строение и механизмы функционирования, а также



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

современные методы работы с ферментами; уметь применять приемы номенклатуры ферментов, давать характеристику важнейшим из них; приобрести навыки работы с ферментами. Для выделения ферментов и их рационального использования необходимо знать способы извлечения белков из тканей, методы определения ферментативной активности, действие активаторов и ингибиторов.

Учебно-методическое обеспечение самостоятельной работы аспирантов по дисциплине «Энзимология» на очной и заочной формах обучения и по индивидуальному плану обучения на очной и заочной формах

Наименование раздела (темы) дисциплины	Формы/виды самостоятельной работы	Количество часов, в соответствии с учебно-тематическим планом	Формы контроля СРА
Раздел 1. Классификация и номенклатура ферментов	Изучение основной и дополнительной литературы Подготовка письменной самостоятельной работы (серии 1). Оформление лабораторных работ. Подготовка отчетов по лабораторной работе.	6	Проверка отчетов лабораторных работ и письменной самостоятельной работы (серии). Тест. Зачет
Раздел 2. Строение и механизм действия ферментов.	Изучение основной и дополнительной литературы. Подготовка письменной самостоятельной работы (серии 2). Оформление лабораторных работ. Подготовка отчетов по лабораторной работе.	24	Проверка отчетов лабораторных работ и письменной самостоятельной работы (серии). Тест. Реферат. Зачет
Раздел 3. Механизмы регуляции ферментативной активности.	Изучение основной и дополнительной литературы Подготовка письменной самостоятельной работы (серии 3). Оформление лабораторных работ. Подготовка отчетов по лабораторной работе.	10	Проверка отчетов лабораторных работ и письменной самостоятельной работы (серии). Тест. Зачет
Раздел 4. Методы выделения и очистки ферментов.	Изучение основной и дополнительной литературы. Оформление лабораторных работ. Подготовка отчетов по лабораторной работе. Подготовка реферата.	14	Проверка отчетов лабораторных работ. Контрольная работа. Зачет

	МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
	федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Благовещенский государственный педагогический университет»
	ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА Рабочая программа дисциплины

5. ПРАКТИКУМ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

№ п/п	Раздел	Кол-во часов
1.	Раздел 1. Классификация и номенклатура ферментов Лаб. р.1. Фотоколориметрический метод обнаружения ферментов Лаб. р.2. Спектрофотометрический метод обнаружения ферментов Лаб. р.3: Энзим-электрофорез.	3 3 3
2.	Раздел 2. Строение и механизм действия ферментов. Лаб. р.4 Влияние концентрации пероксида водорода на активность каталазы. Лаб. р.5: Зависимость скорости реакции, катализируемой каталазой от количества ферментного белка. Лаб. р.6: Влияние pH и температуры на активность каталазы.	3 3 3
3	Раздел 3. Механизмы регуляции ферментативной активности. Лаб. р.7: Механизм действия аминотриазола на каталазную активность Собеседование 1: Множественные формы ферментов и их роль в адаптации	3 3
4.	Раздел 4. Методы выделения и очистки ферментов. Лаб. р.8: Выделение и очистка каталазы из семян сои Лаб. р.9: Определение молекулярной массы ферментов.	3 3
	Итого	30

Раздел 1. Классификация и номенклатура ферментов

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Тема: Фотоколориметрический метод обнаружения ферментов

Оборудование и реактивы: фотоколориметр, центрифуга, дозаторы, термостат.

Исследуемый материал: семена сои или амаранта

Опыт 1. Определение удельной активности аминотрансфераз

Ход работы:

Аминотрансферазы – ферменты, содержащие в качестве коферментов фосфопиридоксаль и фосфопиридоксамин, катализируют обратимый перенос аминокрупп с аминокислот на α -кетокислоты. Определение концентрации α -кетокислот, образовавшихся в процессе трансаминирования аминокислот, лежит в основе методов определения трансаминазной активности. Существует 2 группы методов определения активности трансаминаз: спектрофотометрические и колориметрические. В основе спектрофотометрических методов лежит использование оптического теста Варбурга, эти методы наиболее специфичные и точные. Колориметрические методы основаны на образовании окрашенного динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты, освобождающейся в результате реакции переаминирования.

Наибольшее значение имеет определение активности двух ферментов – аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ), поскольку они обладают большой каталитической активностью.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА
Рабочая программа дисциплины

Определение активности аминотрансфераз проводят в гомогенатах семян сои (см. приложение, опыт 1). Для этого проводят грубую гомогенизацию, гомогенат затем центрифугируют для получения экстрактов, которые и используют для определения активности АлАт и АсАт.

Определение активности АлАт

Принцип метода:

L-аланин + α -кетоглутарат $\xleftarrow{\text{АлАт}}$ пируват + L-глутамат;

Пируват + NADH + H⁺ $\xleftarrow{\text{ЛДГ}}$ лактат + NAD⁺

Скорость окисления NADH в NAD⁺ пропорциональна активности АлАт.

Определение активности АсАт

Принцип метода:

L-аспартат + α -кетоглутарат $\xleftarrow{\text{АсАт}}$ оксалоацетат + L-глутамат.

оксалоацетат + NADH + H⁺ $\xleftarrow{\text{МДГ}}$ L-малат + NAD⁺

Скорость окисления NADH в NAD⁺ пропорциональна активности АсАт.

Фотометрирование: спектрофотометр – 340 им. Кювета – 1 см. Соотношение рабочий реагент/ экстракт – 10:1 (например, 0,5 мл рабочего реагента + 0,05 мл экстракта). Введите анализируемый материал в рабочий реагент, перемешайте и через 1 минуту начинайте считывать изменения экстинкции с интервалом 1 минута (или через другие равные промежутки времени) в течение 3 минут. Вычислите среднее изменение экстинкции за 1 минуту (DE/мин). Если DE/мин превышает 0,06/мин при фотометрировании в варианте 365 или 0,11/мин в варианте 340/334 разведите образец в 10 раз физиологическим раствором, повторите анализ и умножьте результат на 10.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Тема: Спектрофотометрический метод обнаружения ферментов

Оборудование и реактивы: спектрофотометр, центрифуга, дозаторы, термостат, 1%-ная дрожжевой РНК, 0,2 М ацетатный буфер (pH=5,6), спиртово-магниевый осадитель (0,19 г. MgCl₂, 90 мл этанола, 10 мл воды).

Опыт 1. Определение удельной активности рибонуклеазы

Ход работы:

Субстратом для определения РНКазной активности служила высокополимерная РНК из дрожжей. Инкубационная смесь содержала 0,1 мл соевого экстракта, содержащего РНКазу, 0,4 мл 1%-ной дрожжевой РНК в 0,2 М ацетатном буфере (pH=5,6). Инкубацию проводили при 37⁰С в течение 45 минут. После чего негидролизованную РНК осаждали, добавляя к пробам по 1 мл) спиртово-магниевый осадителя (0,19 г. MgCl₂, 90 мл этанола, 10 мл воды. Затем пробирки ставили на 1 час на лед для лучшего формирования осадка, который удаляли центрифугированием при 2000 об/мин. В течение 10 мин. Из супернатанта отбирали пробы по 0,5 мл, к каждой прибавляли по 3 мл воды и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 260 нм против воды. Параллельно обрабатывали контрольную пробу, в которую спиртово-магниевый осадитель вносили до ферментного раствора.



За единицу активности принимали такое количество фермента, которое вызывает увеличение поглощения раствора на единицу оптической плотности при 260 нм в мин.

$$A_{уд} = (\Delta E_{260} * V_1 * V_2) / (V_3 * t * W)$$

ΔE_{260} – прирост экстинкции опытной пробы по отношению к контрольной.

t – Время инкубации (в мин.)

V_1 – объем после разбавления.

V_2 – объем пробы после осаждения РНК спиртово-магниевым раствором.

V_3 – объем пробы, взятой для разбавления.

W – масса белка (фермента в пробе) в мг.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Тема: Энзим-электрофорез.

Цель: Познакомиться с методом экстракции растворимых белков, разделением их в электрическом поле и обнаружением активности ферментов.

Объекты исследования: семена сои, сыворотка крови.

Оборудование. Прибор для электрофореза, прибор для обесцвечивания красителя, шприцы, пробирки, колбы на 100, 1000мл, дозаторы на 0,1мл и 0,05мл, центрифуга, центрифужные весы и пробирки, ступки с пестиками, воронки, палочки, мельничный газ, пипетки на 5мл, кристаллизаторы со льдом.

Реактивы. Рабочие растворы №1, №2, №3 для приготовления 7,5% геля, бромфеноловый синий, 0,001% раствор, трис-глициновый буфер (рН=8,3), амидовый черный 10Б, 1% в 7% растворе уксусной кислоты CH_3COOH , уксусная кислота CH_3COOH , 7% раствор, ТХУ, 7% раствор, хлорид натрия, 0,15М раствор. пероксид водорода, 0,1%-ный раствор; бензидин в ацетатном буфере (рН=4,7).

Ход работы:

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) представляет собой один из наиболее удобных методов для анализа смеси белков. Высокая разрешающая способность этого метода определяется тем, что разделение веществ по их электрофоретической подвижности удачно сочетается с эффектом молекулярного сита. Таким образом, скорость движения белковых молекул через гель определяется не только зарядом молекулы, но также ее размером и формой.

Применяемый для электрофореза полиакриламид получают полимеризацией двух мономеров: акриламида и метилен-бис-акриламида в присутствии катализатора, представляющего собой смесь раствора персульфата аммония с П,П,П,П-тетраметилэтилендиамином (ТЕМЭД). Мономеры и катализаторы сначала смешивают в буфере, а затем заливают в стеклянные трубочки для полимеризации. При этом линейные цепи полиакриламида сшиваются метиленовыми мостиками. Гель обладает ярко выраженными гидрофильными свойствами благодаря наличию в структуре правильно чередующихся амидных групп.

Ход электрофореза. Прибор для электрофореза состоит из двух камер, которые устанавливают одну под другой. В верхней камере укрепляют трубочку с гелем, нижние концы которой опущены в нижнюю камеру. В верхнюю и нижнюю камеры прибора наливают электродный трисглициновый буфер рН 8,3, так, чтобы концы трубочек



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА
Рабочая программа дисциплины

погружались в буфер в верхней и нижней камер, в центре камеры укреплены электроды: верхний – катод (-), нижний – анод (+).

1. Прибор соединяют с выпрямителем, тщательно соблюдая правильность подключения электродов к соответствующим полюсам выпрямителя (БПЭ) (блок питания электронный)

2. Ручку БПЭ «Электрофорез» устанавливают в крайнее левое положение, тумблер «Сеть» выключают.

3. Подключают БПЭ в сеть с напряжением 220 В.

4. Ручку «Электрофорез» – обесцвечивание устанавливают в положение «Электрофорез». Ручку БПЭ «Режим работы» устанавливают в положение 25-50мА. Ручку БПЭ «Измерение» устанавливают в положение $\times 1$ мА.

5. Включают тумблер «Сеть», при этом должна загореться сигнальная лампочка на панели БПЭ.

6. Поворачивают ручку «Электрофорез» по часовой стрелке до тех пор пока измерительный прибор не будет показывать ток из расчета 2мА на трубочку (20 мА на десять трубочек); спустя 15 мин увеличивают силу тока на 4 мА на трубочку (40мА на десять трубочек) и поддерживают заданный режим работы до окончания процесса электрофореза. Электрофорез продолжают 1-1,5ч. За это время краситель в виде узкой фиолетовой полоски располагается на 0,5 см выше верхнего конца трубочки.

7. Закончив работу, прибор выключают. Для этого выключают тумблер «Сеть» на БПЭ, отключают БПЭ от сети и камеру от БПЭ.

Буфер из верхней камеры сливают в одну колбу, буфер из нижней камеры в другую. Буферы могут быть использованы до 10 раз (хранят в холодильнике).

Трубочки вынимают из камеры, помещают в пронумерованные пробирки. Гель из них извлекают с помощью воды, вводимой шприцем с длинной иглой между столбиком геля и стенкой трубочки, при этом гель выскальзывает из трубочки.

На поверхность геля в каждую трубочку дозатором на 0,05мл наносят белок. Затем шприцем каплю индикатора бромфеноловый синий и шприцем, осторожно буфер (трис-глициновый рН 8,3). Трубочки закрепляют в верхней камере прибора для электрофореза, избегая встряхивания. Втулки с нижних концов снимают. Проводят разделение белков на приборе для электрофореза.

Столбик геля помещают в пробирку с ТХУ на 10 мин для фиксации белка в геле, а затем в пробирку с красителем на 10 мин для окрашивания и фиксации белковых полос, при этом окрашивается и гель. Затем краситель сливают в склянку (для многократного использования), а гель заливают 7% раствором уксусной кислоты для отмывки от избытка красителя. Пробирки оставляют на сутки, при этом несколько раз заменяют раствор уксусной кислоты. В результате гель обесцвечивается, а белковые полосы остаются окрашенными.

Избыток красителя можно удалить с помощью прибора для обесцвечивания (прибор для электрофореза имеет приставку). В этом случае процесс обесцвечивания занимает 10-20 мин.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА
Рабочая программа дисциплины

Раздел 2. Строение и механизм действия ферментов

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Тема: Влияние концентрации пероксида водорода на активность каталазы

Реактивы: 1. 1 М трис-HCl буфер, pH 8,0, содержащий 5 мМ ЭДТА. Для приготовления буферного раствора 12,1 г триса и 0,186 г динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой. 2. 1 М фосфатный буфер, pH 7,0. Для его приготовления берут 14,13 г фосфата натрия двузамещенного, помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой. 3. 10 мМ раствор пероксида водорода. Его готовят из концентрированного раствора пероксида водорода следующим образом: сначала готовят раствор пероксида водорода с разведением 1:99. Затем в спектрофотометрическую кювету помещают 2,7 мл 1 М фосфатного буфера, pH 7,0, разбавленного дист. водой в соотношении 1:9. Измеряют оптическую плотность ОД₁ при длине волны 230 нм. Далее в кювету добавляют 0,3 мл разведенного раствора пероксида водорода и определяют оптическую плотность ОД₂. Расчет концентрации приготовленного раствора пероксида водорода осуществляют по формуле:

$C = 141 \times (ОД_2 - ОД_1)$.

Оборудование: спектрофотометр, набор автоматических пипеток, пробирки, мерные колбы, кварцевые кюветы.

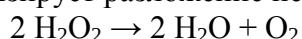
Каталаза (КФ 1.11.1.6 пероксид водорода: пероксид водорода оксидоредуктаза) – двухкомпонентный фермент, состоящий из белка и соединенной с ним простетической группы. Это хромопротеин с молекулярной массой около 240 кДа, состоит из 4-х субъединиц, имеющих по одной группе гема.

Каталазная активность в клетках растений сосредоточена в основном в пероксисомах, которые содержат другие ферменты, образующие H₂O₂. Частично каталаза локализуется в микросомах и в меньшей мере – в цитозоле. Полагают, что каталаза не имеет высокого сродства к H₂O₂ и не может эффективно обезвреживать это соединение при низких концентрациях, имеющихся в цитозоле. В пероксисомах, где концентрация H₂O₂ высока, каталаза, напротив, активно разрушает ее.

Каталаза предотвращает накопление в клетке пероксида водорода образуемого при аэробном окислении восстановленных флавопротеинов, который в присутствии двухвалентного железа может генерировать гидроксильный радикал, являющийся особо агрессивной активной формой кислорода.

Определение активности каталазы в этой работе осуществляли спектрофотометрическим методом.

Принцип метода: каталаза катализирует разложение пероксида водорода по реакции:



О ходе реакции судят по изменению концентрации пероксида водорода в пробе спектрофотометрическим методом при длине волны 230 нм, максимуме поглощения H₂O₂. В качестве источника фермента можно использовать экстракты растворимых белков сои или амаранта.



Скорость ферментативной реакции зависит прежде всего от природы фермента, характеризующегося низкой или высокой активностью. При прочих равных условиях и при наличии избытка субстрата и кофакторов начальная скорость ферментативной реакции пропорциональна концентрации фермента: $v = k [E]$, где k – константа скорости, v – скорость, $[E]$ – концентрация фермента. При графическом изображении получается прямая линия, если по оси абсцисс откладывать концентрацию фермента, а по оси ординат – соответствующую ей величину начальной скорости реакции.

Изучение влияния концентрации фермента на скорость реакции, катализируемой каталазой проводят при постоянной концентрации субстрата (пероксида водорода) и варьируемых концентраций фермента (источник каталазы – экстракты семян сои). В работе используют экстракты со следующими разведениями: 1:5; 1:9; 1:24; 1:49; 1:74; 1:100. Для определения активности каталазы используют метод с молибдатом аммония. По результатам исследования строят график зависимости скорости реакции от концентрации фермента и делают выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

Тема: Зависимость скорости реакции, катализируемой каталазой от количества ферментного белка

Реактивы: 1. 1 М трис-HCl буфер, pH 8,0, содержащий 5 мМ ЭДТА. Для приготовления буферного раствора 12,1 г триса и 0,186 г динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой. 2. 1 М фосфатный буфер, pH 7,0. Для его приготовления берут 14,13 г фосфата натрия двузамещенного, помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой. 3. 10 мМ раствор пероксида водорода. Его готовят из концентрированного раствора пероксида водорода следующим образом: сначала готовят раствор пероксида водорода с разведением 1:99. Затем в спектрофотометрическую кювету помещают 2,7 мл 1 М фосфатного буфера, pH 7,0, разбавленного дист. водой в соотношении 1:9. Измеряют оптическую плотность ОД1 при длине волны 230 нм. Далее в кювету добавляют 0,3 мл разведенного раствора пероксида водорода и определяют оптическую плотность ОД2. Расчет концентрации приготовленного раствора пероксида водорода осуществляют по формуле:

$C = 141 \times (ОД2 - ОД1)$.

Оборудование: спектрофотометр, набор автоматических пипеток, пробирки, мерные колбы, кварцевые кюветы.

Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата почти всегда выражается в виде кривой, близкой по форме к одной из ветвей равнобочной гиперболы. Таким образом, при низком содержании субстрата в системе наблюдается отчетливая зависимость между его концентрацией и скоростью реакции. При больших концентрациях субстрата подобное явление отсутствует. Постоянную скорость, наблюдаемую в реакции при избытке субстрата, полностью насыщающего фермент, называют максимальной скоростью ферментативной реакции. При очень высоких концентрациях субстрата может наблюдаться субстратное ингибирование, обусловленное



образованием непродуктивного комплекса фермента с несколькими молекулами субстрата.

Изучение влияния концентрации пероксида водорода на скорость реакции, катализируемой каталазой проводят постоянной концентрации фермента (экстракт, приготовленный из отмытых от плазмы упакованных эритроцитов, разведение 1:49) и варьируемых концентраций субстрата (H_2O_2). В работе используют следующие концентрации пероксида водорода: 3%-ная, 0,6%; 0,3%; 0,15%; 0,06%; 0,03%; 0,015%. Для определения активности каталазы используют метод с молибдатом аммония. По результатам исследования строят график зависимости скорости реакции от концентрации пероксида водорода и делают выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

Тема: Влияние pH и температуры на активность каталазы

Реактивы: 1. 1 М трис-HCl буфер, pH 8,0, содержащий 5 мМ ЭДТА. Для приготовления буферного раствора 12,1 г триса и 0,186 г динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой. 2. 1 М фосфатный буфер, pH 7,0. Для его приготовления берут 14,13 г фосфата натрия двузамещенного, помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой. 3. 10 мМ раствор пероксида водорода. Его готовят из концентрированного раствора пероксида водорода следующим образом: сначала готовят раствор пероксида водорода с разведением 1:99. Затем в спектрофотометрическую кювету помещают 2,7 мл 1 М фосфатного буфера, pH 7,0, разбавленного дис т. водой в соотношении 1:9. Измеряют оптическую плотность ОД1 при длине волны 230 нм. Далее в кювету добавляют 0,3 мл разведенного раствора пероксида водорода и определяют оптическую плотность ОД2. Расчет концентрации приготовленного раствора пероксида водорода осуществляют по формуле:

$$C = 141 \times (ОД2 - ОД1).$$

Оборудование: спектрофотометр, набор автоматических пипеток, пробирки, мерные колбы, кварцевые кюветы.

Ход работы:

Для определения активности каталазы готовят две пробы – контрольную и опытную в соответствии с таблицей.

Таблица 1.

Содержание проб для определения активности каталазы

Компоненты инкубационной пробы	Контрольная проба, мл	Опытная проба, мл
1 М трис-HCl буфер с 5 мМ ЭДТА при pH 5; 6; 7; 8.		
H_2O_2	0,15	0,15
H_2O	-	2,70
	2, 85	0,15
Экстракт ферментов сои	0,06	0,06



Реакцию запускают внесением в пробу, находящуюся в спектрофотометрической кювете с расстоянием между рабочими гранями 1,0 см, экстракта фермента. Содержимое кюветы перемешивают и определяют начальную оптическую плотность. За ходом реакции следят в течение 3 минут. Регистрацию оптической плотности проводят при комнатной температуре.

Влияние pH среды на активность каталазы исследуют в экстрактах семян сои. Определение активности каталазы проводят при вышеописанных условиях в 1М трис-HCl буфере при pH 5, 6, 7 и 8.

Изучение влияния температуры на активность каталазы проводят в экстрактах, приготовленных из семян сои, которые делят на пять равных частей. Каждую отобранную аликвоту подвергают инкубации при определенной температуре в течение 10 мин. Затем пробы резко охлаждают и центрифугируют 20 мин при 1700 g. Обработанные таким способом экстракты добавляют в реакционную смесь в качестве источника фермента. Исследования проводят в температурном диапазоне 20°C – 60°C с шагом в 10°C. Полученные результаты представляют в виде pH-зависимостей и графиков Аррениуса. Рассчитывают коэффициент Q₁₀.

Раздел 3. Механизмы регуляции ферментативной активности.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

Тема: Механизм действия аминотриазола на каталазу

Реактивы и оборудование (см. лаб. раб. 4)

Активность каталазы ингибируется различными веществами, включая ее природный субстрат, пероксид водорода (H₂O₂), азидом натрия, уксусной кислотой, цианидами, тяжелыми металлами и 3-амино-1,2,4-триазолом (АТ). Аминотриазол является необратимым ингибитором реакции, катализируемой каталазой. В работе используют различные источники фермента: семена сои, амаранта.

Приготовление ферментного экстракта проводят согласно описанию в приложении.

Содержание белка в препарате фермента из семян сои, амаранта или пшеницы осуществляют биуретовым методом (приложение). Инкубацию препарата фермента с АТ проводят в термостате при 37° С в течение часа при постоянном перемешивании для контакта инкубационной смеси с кислородом. Используя концентрации аминотриазола 20 mM определить: 1) является ли АТ ингибитором для каталазы из различных источников; 2) степень ингибирования фермента; 3) в различных препаратах. Использовать спектрофотометрический метод (см. работу 4) для определения активности каталазы.

Раздел 4. Методы выделения и очистки ферментов

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

Тема: Выделение и очистка каталазы из семян сои

Реактивы и оборудование (см. лаб. раб. 4)

Исследуемый материал: семена сои

Реактивы: 0,15 М фосфатный буфер (pH 7,4); 0,15 М фосфатно-цитратный буфер (pH 7,4); 90%-ный этанол; сульфат аммония; сефадекс G-25; сефадекс G-100; стандартные белки с молекулярной массой около 300 кДа, 200 кДа и 100 кДа.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

Оборудование: пробирки, пипетки, рефрижераторная центрифуга, хроматографические колонки, колбы

Ход работы:

Препарат каталазы получают в виде вытяжки из тонкоизмельченных семян сои. Для этого 5 г семян сои тщательно растирают в фарфоровой ступке пестиком до получения однородной массы. Измельченные зародыши заливают 20 мл 0,15 М фосфатным буфером (рН 7,4). Гомогенат центрифугируют при 2000 g (4°C). В супернатанте определяют белок биуретовым методом (см. раздел 6) и активность каталазы.

На первой стадии очистки фермент осаждают 60% этанолом. Для этого к 10 мл супернатанта добавляют 20 мл 90% этанола. Полученный осадок растворяют в 20 мл 0,15 М фосфатно-цитратного буфера, рН 7,4. В экстракте определяют активность каталазы и содержание белка биуретовым методом (см. работу 5.4.2). Степень очистки фермента после этой процедуры становится равной 2,38.

Затем фермент освобождают от балластных белков добавлением к 20 мл экстракта 14 г сульфата аммония. После фракционирования осадок растворяют в 15 мл фосфатно-цитратного буфера. В экстракте определяют активность каталазы и содержание белка биуретовым методом (см. работу 6.4.2). Фракционирование сульфатом аммония в пределах насыщения 60-80% позволяет получить препарат каталазы с удельной активностью 55,9 ед./мг белка; степень очистки при этом возрастает в 8 раз по сравнению с удельной активностью каталазы в гомогенате.

Для освобождения ферментного раствора от низкомолекулярных примесей осуществляют гель-фильтрацию на сефадексе G-25. В фильтрате определяют активность каталазы и содержание белка спектрофотометрическим методом (см. раздел 5). Степень очистки возрастает в 1,65 раза, а удельная активность каталазы при этом составляет 92,1 ед./мг белка.

Затем осуществляют гель-фильтрацию на сефадексе G-100. Раствор белка, выходящий из колонки, собирают в несколько фракций по 1,0-1,5 мл и в них проводят определение белка спектрофотометрическим методом (см. работу 6.4.4) и активности каталазы. Наиболее активные фракции объединяют.

Удельная активность ферментного препарата каталазы, полученного по данной схеме, составляет 545,2 ед./мг белка, степень очистки – 78,46. Молекулярная масса каталазы зародышей пшеницы, определенная гель-хроматографическим методом на сефадексе G-100, составляет $250 \pm 1,5$ кДа.

Для определения активности каталазы используют один из предложенных методов.

1. Определение активности каталазы с помощью йодистого калия

Принцип метода основан на образовании комплекса неразрушенного пероксида водорода с йодистым калием.

Реактивы: 3%-ный раствор йодистого калия в 50%-ном ацетоне (50 мл 3%-ного раствора йодистого калия растворяют в 50 мл ацетона); 3%-ный раствор пероксида водорода.

Ход работы: К 0,1 мл исследуемой пробы приливают 10 мл 3%-ного пероксида водорода и 10 мл 3%-ного раствора йодистого калия в 50%-ном ацетоне. Раствор фотоколориметрируют на синем светофильтре с длиной волны 435-445 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Активность каталазы определяют по формуле:



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

$$A = \frac{D}{0,02}, \text{ где}$$

A – активность каталазы в пробе;

D – оптическая плотность исследуемой пробы;

0,02 – коэффициент перевода в условные единицы каталазы.

2. Определение активности каталазы с помощью молибдата аммония

Принцип метода основан на способности пероксида водорода взаимодействовать с солями молибдена, образуя стойкий окрашенный комплекс.

Реактивы: 30 mM трис-HCl буфер (pH 7,4); H₂O₂; дистиллированная вода; 4%-ный раствор молибдата аммония.

Оборудование: пробирки, пипетки, ФЭК, кюветы (5 мм).

Ход работы: В опыте используют холостую, контрольную и опытную пробы. В каждую пробу вносят по 1 мл трис-HCl буфера. Затем в холостую и опытную пробу добавляют по 2 мл пероксида водорода, а в контрольную – 2 мл дистиллированной воды. После этого в контрольную и опытную пробы доливают по 0,1 мл препарата каталазы и оставляют пробы при комнатной температуре в темноте. Реакцию останавливают через 10 минут добавлением во все пробирки 1 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. После этого в холостую пробу приливают 0,1 мл препарата каталазы.

Интенсивность окраски в каждой пробе измеряют на ФЭКе при длине волны 410 нм против контрольной пробы. Активность каталазы рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(E - E_0) \cdot V_{pp}}{t \cdot K \cdot V_{шт} \cdot d \cdot B}, \text{ где}$$

A – активность мкмоль H₂O₂/мин*г белка

E_x – изменение оптической плотности холостой пробы за 10 минут;

E_o – изменение оптической плотности опытной пробы за 10 минут;

V_{рс} – объем реакционной среды (по методике = 3,01 мл);

t – время регистрации оптической плотности, равное 10 минут;

K – коэффициент микромолярной экстинкции для H₂O₂ при длине волны 400 нм, равный 22,2*10⁻³ мкМ⁻¹см⁻¹;

V_{пр} – объем пробы;

d – длина оптического пути кюветы (0,5 см).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9

Тема: Определение молекулярной массы ферментов

Цель: Познакомиться с методами определения молекулярной массы ферментов (методом гель-фильтрации и электрофореза).

Объект исследования: семена сои, каталаза, СДГ.

Оборудование и реактивы: центрифуга, центрифужные пробирки, пробирки, пипетки, пипетки градуированные стеклянные палочки, фильтровальная бумага, корковые пробки, хроматографические колонки, сефадекс, голубой декстран, набор белков маркеров.

Ход работы:



В основе метода определения молекулярной массы белков с применением гель-фильтрации лежит следующий эмпирический факт. Установлено, что объемы элюирования различных белков с одинаковыми молекулярными массами на одной и той же колонке в идентичных условиях практически совпадают. Это позволяет определять молекулярную массу неизвестного белка, если колонка с гелем предварительно прокалибрована (прокалибрована). Калибровка состоит в определении объемов элюирования нескольких чистых белков с известной молекулярной массой. Полученные данные наносят на график в виде зависимости логарифма молекулярной массы (ММ) от объема элюирования (V_e). Такие зависимости в пределах одного – полутора порядков по величине молекулярных масс имеют, как правило, линейный вид. В качестве примера, на рис. 1.1.1. приведен такой график для ряда белков.

Рисунок – 1.1.1. Логарифмическая зависимость объема элюирования от молекулярной массы белков

Опыт №1. Определение молекулярной массы каталазы методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100

Для сефадекса G-100 экспериментальным путем получено уравнение для расчета молекулярной массы:

$$G-100 \lg M_r = 5,941 - 0,847 \frac{V_e}{V_q}, \text{ где,}$$

M – молекулярная масса;

V_e – объем раствора, в котором выходят из колонки исследуемое вещество;

V_q – объем водной фазы колонки.

Для определения в колонку ввести небольшое количество вещества с высокой молекулярной массой. Затем через колонку пропустить растворитель. Объем растворителя, которым затем элюируется это вещество равен объему водной фазы колонки. В качестве вещества с высокой молекулярной массой обычно используют голубой декстран, молекулярная масса которого равна 2×10^6 .

Для определения использовать колонку объемом 13,5 куб.см, наполненную гелем сефадекса G-100 и промытую 0,1 н р-ром хлорида натрия.

1.Определение значения V_0

Открыть зажим на колонке и слить 0,1 н р-р хлорида натрия, находящийся над гелем.

Зажим закрыть и на поверхность геля аккуратно, по стенке с помощью пипетки нанести 0,5 мл р-ра голубого декстрана. Открыть зажим, собрать вытекающую из колонки жидкость в мерный цилиндр и сохранить до конца опыта. Наблюдать за проникновением нанесенного р-ра в гель (поверхность геля не должна оставаться сухой, поэтому по мере вытекания жидкости из колонки необходимо доливать хлорид натрия либо подсоединить к колонке склянку с р-ром).

Заранее приготовить 5 чистых пробирок. Как только из колонки начнет вытекать окрашенный (голубой) раствор, в эти пробирки собрать окрашенные фракции, по 20 капель в каждую пробирку. Элюат из этих пробирок от начала ряда, включая пробирку с самой интенсивной окраской, слить в цилиндр, где уже собраны предыдущие (неокрашенные) фракции. Объем остальных пробирок, в которых окраска начинает ослабевать, не учитывается.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

Таким образом, объем элюата от начала опыта до появления наиболее яркой голубой окраски составляет объем водной фазы колонки (V_0).

Закончив определение, отмыть колонку от следов голубого декстрана.

2.Определение V_s

Ход работы повторить полностью, но вместо р-ра декстрана в колонку внести 0,1 мл раствора гемоглобина (1%). Объем элюата от начала опыта с гемоглобином и до появления в пробирке максимальной розовой окраски определить как

Расчет: Полученные значения V_0 и V_s подставить в приведенное выше уравнение и найти молекулярную массу, используя таблицу антилогарифмов.

По литературным данным молекулярная масса гемоглобина равна 64500.

Теоретическое задание №1

Определение молекулярной массы множественных молекулярных форм сорбитолдегидрогеназы (СДГ-1, СДГ-2) методом электрофореза в градиенте концентрации полиакриламидного геля

Формы	M_r	$Lg M_r$	a	Rf
Тироглобулин	669000		6,0	
Ферритин	440000		8,5	
Каталаза	232000		15,0	
Лактат ДГ	140000		32,0	
Альбумин	67000		55,0	
СДГ-1	X_1		27,0	
СДГ-2	X_2		23,0	
Длина колонки (L)			120 мм	

Нарисовать график и полученную электрофореграмму: $Rf = a:L$

Теоретическое задание №2

Определение молекулярной массы субъединиц сорбитолдегидрогеназы (СДГ-1, СДГ-2) методом электрофореза в ПААГ (в присутствии додецилсульфата натрия)

Формы	M_r	$Lg M_r$	a_1	a_2	Rf
Фосфоорилаза «В»	94000		11	12	
Альбумин	67000		20	20	
Овальбумин	43000		25	27	
Карбоксиангидраза	30000		32	34	
Трипсин	20100		37	40	
Лактоальбумин	14000		45	49	
			$L=55$	$L=62$	
СДГ-1	X_1		32	$38 L=59$	
СДГ-2	X_2		34	$35 L=57$	
Длина колонки			$L=50$		

Нарисовать график и полученную электрофореграмму. $Rf=a:L$



Приложение

Опыт 1. Получение экстрактов растворимых белков сои

Опыт 2. Биуретовый метод

Принцип метода: биуретовый метод основан на способности растворов белка давать фиолетовое окрашивание при взаимодействии с раствором сульфата меди в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в растворе.

Исследуемый раствор: стандартный раствор белка, содержащий 10 мг в 1 мл.

Реактивы: биуретовый реактив – 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (виннокислый натрий-калий, или сегнетова соль) растворяют в 50 мл H_2O , при энергичном перемешивании приливают туда 30 мл 10%-ного раствора NaOH (свободного от Na_2CO_3), добавляют 0,1 г KI и доводят водой до 100 мл. Хранят в полиэтиленовой склянке.

Оборудование: пробирки, пипетки, ФЭК, кюветы с длиной светового пути 5 мм.

Ход работы: в 4 сухие пробирки вносят по 0,5 мл раствора белка. В три пробирки помещают стандартные растворы с содержанием белка 2,5; 5,0; 7,5 мг в 1 мл. Эти пробирки служат для построения калибровочной кривой. В 4-ю пробирку наливают раствор с неизвестной концентрацией белка, которую необходимо определить.

В каждую пробирку добавляют по 2 мл биуретового реактива. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 20 мин для развития окраски. Окрашенные растворы колориметрируют на ФЭКе в кюветах с длиной оптического пути 5 мм, пользуясь зеленым светофильтром (длина волны 540 нм). В качестве контрольного раствора при измерении на ФЭКе используют биуретовый реактив. Строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс концентрации стандартных растворов белка, а на оси ординат – соответствующие значения оптической плотности. Зная оптическую плотность раствора белка с неизвестной концентрацией, по калибровочной кривой определяют в нем содержание белка.

6. Дидактические материалы для контроля (самоконтроля) усвоения материала

6.1 Перечень компетенций с указанием этапов их формирования в процессе освоения дисциплины «Энзимология»

Перечень компетенций с указанием этапов их формирования в процессе освоения дисциплины «Энзимология»				
Формируемые компетенции	Наименование раздела (темы) дисциплины	Этапы формирования компетенций в процессе освоения дисциплины (знание, умение, навык)	Этапы формирования компетенций в процессе освоения ООП	Формы оценочных средств
1	2	3	4	5
ОПК-1	Раздел 1. Классификац	Знание: цели и задач научных исследований по	3	Контрольная работа.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

	ия и номенклатура ферментов Раздел 2. Строение и механизм действия ферментов. Раздел 3. Механизмы регуляции ферментативн ой активности. Раздел 4. Методы выделения и очистки ферментов.	направлению деятельности, базовых принципов и методов их организации; основных источников научной информации и требований к представлению информационных материалов Умение: составлять общий план работы по заданной теме, предлагать методы исследования и способы обработки результатов, проводить исследования по согласованному с руководителем плану, представлять полученные результаты представлять полученные результаты в научном сообществе Навыки: приобретения систематических знаний по направлению деятельности; получения углубленных знаний по выбранной направленности подготовки, базового проведения научно- исследовательских работ по предложенной теме.		Реферат. Тест. Письменная самостояте льная работа. Лаборатор ная работа. Зачет.
ПК-1	Раздел 1. Классификац ия и номенклатура ферментов Раздел 2. Строение и механизм действия ферментов. Раздел 3. Механизмы регуляции ферментативн ой активности. Раздел 4.	Знание: особенностей состава биомолекул растений, специфики их метаболизма и понимания взаимосвязи строение – свойства – биологические функции молекул; локализации физиолого- биохимических процессов в растениях, их ход и механизмы регуляции на всех структурных уровнях организации растительного организма; зависимости хода физиолого- биохимических процессов от внутренних и внешних факторов среды; молекулярно-генетического ответа растения на воздействие	3	Контрольн ая работа. Реферат. Тест. Письменная самостояте льная работа Лаборатор ная работа. Зачет.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

	Методы выделения и очистки ферментов.	экологических факторов; Умение: рассчитывать, строить и анализировать диаграммы энзиматической активности и схемы энзимогамм ферментов; пользоваться биохимическими показателями в процессе прогнозирования адаптации растений к различным условиям среды ; Навыки: использования современных методов исследования и получения информации о ходе физиолого-биохимических процессов в растительном организме, поиска новых сведений в области физиологии и биохимии растений, связанных с изучением молекулярно-генетических механизмов адаптации.		
--	---------------------------------------	--	--	--

6.2 Показатели и критерии оценивания компетенций на различных этапах их формирования, шкалы оценивания

Оценка контрольных работ.

Оценка "5" ставится, если аспирант:

1. выполнил работу без ошибок и недочетов;
2. допустил не более одного недочета.

Оценка "4" ставится, если аспирант выполнил работу полностью, но допустил в ней:

1. не более одной негрубой ошибки и одного недочета;
2. или не более двух недочетов.

Оценка "3" ставится, если аспирант правильно выполнил не менее половины работы или допустил:

1. не более двух грубых ошибок;
2. или не более одной грубой и одной негрубой ошибки и одного недочета;
3. или не более двух-трех негрубых ошибок;
4. или одной негрубой ошибки и трех недочетов;
5. или при отсутствии ошибок, но при наличии четырех-пяти недочетов.

Оценка "2" ставится, если аспирант:

1. допустил число ошибок и недочетов превосходящее норму, при которой может быть выставлена оценка "3";
2. или если правильно выполнил менее половины работы.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

Оценка выполнения практических (лабораторных) работ.

Оценка "5" «отлично» ставится:

- а) работа выполнена полно, научно грамотно, логично описал наблюдения; правильно, без существенных ошибок, поставлена цель и сделаны выводы;
- б) эксперимент осуществлен по плану с учетом техники безопасности и правил работы с веществами и приборами;
- в) имеются организационные навыки (поддерживается чистота рабочего места и порядок на столе, экономно используются реактивы);
- г) в представленном отчете правильно и аккуратно выполнил все записи, таблицы, рисунки, чертежи, графики, вычисления и правильно выполнил анализ погрешностей.

Оценка "4" «хорошо» ставится:

- а) работа выполнена правильно, без существенных ошибок, сделаны выводы;
- б) допустимы: неполнота проведения или оформления эксперимента, одна-две несущественные ошибки в проведении или оформлении эксперимента, в правилах работы с веществами и приборами.

Оценка "3" «удовлетворительно» ставится:

- а) аспирантом допущены одна-две существенные ошибки (в ходе эксперимента, в объяснении, в оформлении работы, по технике безопасности, в работе с веществами и приборами), которые исправляются с помощью преподавателя;
- б) подбор оборудования, объектов, материалов, а также работы по началу опыта провел с помощью преподавателя;
- в) в ходе проведения опыта и измерений были допущены ошибки в описании наблюдений, формулировании выводов;
- г) допускает грубую ошибку в ходе эксперимента (в объяснении, в оформлении работы, в соблюдении правил техники безопасности при работе с материалами и оборудованием), которая исправляется по требованию преподавателя.

Оценка "2" «неудовлетворительно» ставится,

аспирант допустил 3-4 ошибки (в проведении лабораторной работы, в объяснении, в оформлении наблюдений и выводов, по технике безопасности), которые не исправляются даже по указанию преподавателя.

Критерии оценивания написания реферата

№	Критерии	«отлично»	«хорошо»	«удовлетворительно»	«неудовлетворительно»
1	Объем выполненной работы	Оптимален	Оптимален	Занижен Завышен	Занижен Завышен
2	Логическая последовательность и связанность материала	+	Незначительные нарушения	Нарушена	Отсутствует



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

3	Полнота изложения содержания	+	Не выдержана	Не выдержана	Не выдержана
4	Сохранение основной идеи через весь реферат	+	+	Нарушено	Отсутствует
5	Использование дополнительной литературы	+	+	Не достаточно	Не используется
6	Оформление	+	+	Наличие отклонений	Наличие отклонений
7	Орфографический режим	+	+	Соблюдается	Нарушено

Критерии оценивания выполнения электронных обучающих и аттестирующих тестов

Оценка «неудовлетворительно» – менее 60 % выполненных заданий

Оценка «удовлетворительно» – 61-75 %

Оценка «хорошо» – 76-85 %

Оценка «отлично» – 86-100 %

Критерии оценивания устного ответа на зачете

Оценка «зачтено» выставляется аспиранту, если вопросы раскрыты, изложены логично, без существенных ошибок, показано умение иллюстрировать теоретические положения конкретными примерами, продемонстрировано усвоение ранее изученных вопросов, сформированность компетенций, устойчивость используемых умений и навыков. Допускаются незначительные ошибки.

Оценка «не зачтено» выставляется, если не раскрыто основное содержание учебного материала; обнаружено незнание или непонимание большей или наиболее важной части учебного материала; допущены ошибки в определении понятий, которые не исправлены после нескольких наводящих вопросов; не сформированы компетенции, умения и навыки.

6.3 Типовые контрольные задания или иные материалы, необходимые для оценки знаний, умений, навыков, характеризующих этапы формирования компетенций в процессе освоения дисциплины «Энзимология»

Образец вопросов для контрольной работы

Контрольная работа 1

К разделу 1 «Биомолекулы»

Вариант 1

1. История энзимологии.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА
Рабочая программа дисциплины

2. Механизм конкурентного ингибирования на примере реакции окисления янтарной кислоты.

3. Протеазы. Классификация по строению активного центра, природные источники.

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ

Раздел 2. Строение и механизм действия ферментов

1. Роль ферментов в углеводном обмене.
2. Роль ферментов в белковом обмене.
3. Ферменты – биологические катализаторы и регуляторы.
4. Роль ферментов в липидном обмене.
5. Ферменты фотосинтеза.
6. Ферменты азотфиксации.
7. Влияние различных экологических факторов на ферментные системы.
8. Физико-химические свойства ферментов.
9. Классификация ферментов.
10. Ферменты биологического окисления.

ОБРАЗЕЦ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПИСЬМЕННОЙ РАБОТЫ

Раздел 3. Механизмы регуляции ферментативной активности (серия 3)

1. Изостерические механизмы регуляции активности ферментов (регуляция доступностью субстрата, кофактора).
2. Аллостерические механизмы регуляции активности ферментов.
3. Ковалентная модификация ферментов и ее типы.
4. Каскадный механизм регуляции активности гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы гормонами.
5. Регуляция количества ферментов в клетке.
6. Множественные формы ферментов и их биологическая роль.
7. Регуляция метаболических путей.

КОМПЛЕКТ ТЕСТОВЫХ ЗАДАНИЙ

Пример тестового задания

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
БЛАГОВЕЩЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

РАЗДЕЛ 1 КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

Вариант №1 Энзимология как научная дисциплина

Инструкция для аспиранта

Тест содержит 20 заданий. На его выполнение отводится 90 минут. Верно выполненные задания оцениваются в 2 балла. Если задание не удастся выполнить сразу, перейдите к следующему. Если останется время, вернитесь к пропущенным заданиям.

1. Энзимология является составной частью:



1. Ботаники
2. Механики
3. Физики
4. Биохимии
2. Впервые использовал термин «катализатор»:
 1. Лавуазье
 2. Гей-Люссак
 3. Вёлер
 4. Берцелиус
3. Основные принципы катализа были сформулированы в:
 1. 18 в.
 2. 19 в.
 3. 20 в.
 4. 21 в.
4. Энзимы содержатся в:
 1. Миелине
 2. Муреине
 3. Плазмолемме
 4. Хитине
5. Ферментативная активность не свойственна:
 1. Прокариотам
 2. Эукариотам
 3. Археям
 4. Кефалинам
6. Химическая природа энзимов была доказана:
 1. Бухнером
 2. Фишером
 3. Пастером
 4. Либихом
7. В кристаллическом виде фермент впервые получен:
 1. Нейбергом
 2. Самнером
 3. Кюне
 4. Бернаром
8. Биологические катализаторы являются:
 1. Пентозанами
 2. Стеринами
 3. Белками
 4. Эйкозанами
9. Компартиментализация обусловлена наличием в клетках:
 1. Мембран
 2. Цитозоля
 3. Кислорода



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА
Рабочая программа дисциплины

4. Воды
10. К мембранным образованиям относятся:
 1. Пектины
 2. Гистоны
 3. Митохондрии
 4. Вирионы
11. В цитозоле эукариотов локализованы ферменты:
 1. Тканевого дыхания
 2. Синтеза жирных кислот
 3. β -окисления
 4. Цикла трикарбоновых кислот
12. В матриксе митохондрий не происходит:
 1. Окислительное декарбоксилирование пирувата
 2. Восстановление пировиноградной кислоты до молочной
 3. Субстратное фосфорилирование
 4. Синтез цитрата
13. Рибозимами называют:
 1. Катализаторы нуклеотидной природы
 2. Производные рибозы
 3. Витамины
 4. Гликопротеины
14. Ферменты не содержатся в:
 1. Клеточных ядрах
 2. Аппарате Гольджи
 3. Плазматических мембранах
 4. Выдыхаемом воздухе
15. Источниками ферментов не являются:
 1. Стенки растительных клеток
 2. Внутренние органы животных
 3. Культуры микроорганизмов
 4. Соки растений
16. Ферментам свойственно:
 1. Ускорять реакции
 2. Вызывать новые реакции
 3. Смещать равновесие
 4. Входить в состав конечных продуктов
17. Активность клеточных ферментов не зависит от:
 1. Плазмидных ДНК
 2. Мембранных фосфолипидов
 3. Концентрации субстрата
 4. pH
18. Ферменты выделяют путем:
 1. Кипячения



2. Высаливания
3. Высокоэффективной газо-жидкостной хроматографии
4. Электролиза
19. В пищевой промышленности ферменты не применяют для:
 1. Синтеза белков
 2. Осветления напитков
 3. Мягчения мяса
 4. Выработки сыра
20. Наибольшее промышленное применение находят:
 1. Трансферазы
 2. Гидролазы
 3. Синтетазы
 4. Лиазы

Вариант № 2. Классификация и методы определения активности ферментов

Инструкция для аспиранта

Тест содержит 20 заданий. На его выполнение отводится 90 минут. Верно выполненные задания оцениваются в 2 балла. Если задание не удастся выполнить сразу, перейдите к следующему. Если останется время, вернитесь к пропущенным заданиям.

1. Одно из следующих положений не соответствует классификации ферментов:
 1. Ферменты делят на 6 классов
 2. Название фермента включает в себя название субстрата, тип катализируемой реакции и окончание «аза»
 3. Каждому ферменту присвоен 4-х значный шифр
 4. Все тривиальные названия ферментов упразднены
2. Согласно действующей Международной классификации систематическое название фермента не содержит:
 1. Название субстрата
 2. Тип реакции
 3. Название продукта реакции
 4. Окончание «аза»
3. Шифр фермента не включает:
 1. Класс
 2. Подподкласс
 3. Порядковый номер
 4. Номер изофермента
4. Вторая цифра шифра означает, как правило,
 1. Природу донора
 2. Строение акцептора
 3. Тип катализируемой реакции
 4. Вид кофермента



5. Первый класс ферментов называется:
1. Изомеразы
 2. Дегидрогеназы
 3. Оксидоредуктазы
 4. Амилазы
6. Второй класс ферментов носит название:
1. Пептидазы
 2. Лиазы
 3. Фосфатазы
 4. Трансферазы
7. Третий класс объединяет все ферменты, катализирующие реакции:
1. Гидролиза
 2. Синтеза
 3. Окисления
 4. Восстановления
8. В четвертый класс входят ферменты, которые ускоряют реакции:
1. Расщепления с образованием двойных связей или присоединения по двойным связям
 2. Переноса тех или иных групп
 3. Карбоксилирования
 4. Фосфорилирования
9. Ферменты пятого класса катализируют:
1. Соединение отдельных мономеров в полимерные молекулы
 2. Внутримолекулярный перенос химических группировок
 3. Изменение геометрической конфигурации молекул
 4. Образование цис-транс изомеров
10. Ферменты шестого класса катализируют реакции:
1. Тканевого дыхания
 2. Дезаминирования
 3. Образования изомерных форм органических соединений
 4. Синтеза, сопряженные с гидролизом макроэргических связей
11. Фермент, катализирующий реакцию: $\text{этанол} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{ацетальдегид} + \text{NADH} + \text{H}^+$ относится к классу:
1. Трансфераз
 2. Синтаз
 3. Оксидоредуктаз
 4. Изомераз
12. Реакцию: $\text{Изоцитрат} \rightarrow \text{сукцинат} + \text{глиоксилат}$ катализирует фермент класса:
1. Гидролаз
 2. Лиаз
 3. Трансфераз
 4. Оксидоредуктаз
13. Реакцию: $\text{аланин} + 2\text{-оксоглутарат} \rightarrow \text{пируват} + \text{глутамат}$ катализирует:



1. Трансфераза
2. Дегидрогеназа
3. Глутаминсинтетаза
4. Трансглутаминаза
14. Оксидазы катализируют реакции, в которых акцептором служит:
 1. Водород
 2. Кислород
 3. Аммиак
 4. Оксикислота
15. Реакции: $RR_1 + NOH \rightarrow ROH + R_1H$ катализируют:
 1. Оксидоредуктазы
 2. Трансферазы
 3. Гидролазы
 4. Лиазы
16. Фермент, шифр которого КФ 5.1.1.1.1, катализирует реакцию:
 1. Аланин + 2-оксоглутарат $\rightarrow$ пируват + глутамат
 2. Изоцитрат $\rightarrow$ сукцинат + глиоксилат
 3. L-аланин $\leftrightarrow$ D-аланин
 4. Этанол + NAD^+ $\rightarrow$ ацетальдегид + $NADH$
17. Реакцию: сахароза + $H_2O \rightarrow \alpha, D$ -глюкопираноза + β, D -фруктофураноза не катализирует фермент:
 1. β -Фруктофуранозидаза
 2. Инвертаза
 3. Сахараза
 4. Глюкозооксидаза
18. Активность фермента:
 1. Нельзя определить по убыли субстрата во время реакции
 2. Не определяется по нарастанию количества продукта за единицу времени
 3. Это скорость реакции, соотнесенная с количеством фермента
 4. Определяется концентрацией комплекса ES
19. 1 катал – это:
 1. Концентрация катализатора, 1 моль/л
 2. Скорость реакции без фермента
 3. Активность фермента, превращающего 1 моль субстрата в секунду
 4. Активность одной молекулы фермента
20. Международная (стандартная) единица активности фермента – это:
 1. Количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкм субстрата за 1 мин
 2. Активность, отнесенная к 1 мг белка
 3. Число молекул субстрата, превращаемых одной молекулой катализатора за единицу времени
 4. Активность катализатора в расчете на его молекулярную массу.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА
Рабочая программа дисциплины

Вопросы к зачету

1. Общая характеристика катализаторов. Дать определение ферментам. Общие свойства ферментов и других катализаторов. Отличия ферментов от неорганических катализаторов. История изучения ферментов.
2. Современная международная номенклатура ЕС – enzyme code. Организации, занимающиеся вопросами классификации и номенклатуры – IUBMB IUPAC. Значение и недостатки единой системы номенклатуры. Классы ферментов, подклассы и подподклассы.
3. Молекулярное строение ферментов. Белковые и небелковые ферменты (рибозимы).
4. Множественные формы ферментов. Изоферменты.
5. Простые и сложные ферменты. Холофермент, апофермент, коферменты: кофакторы и простетические группы.
6. Общие механизмы действия кофакторов. Классификация коферментов. Характеристика основных представителей различных групп. Строение и механизм действия тиаминдифосфата, кофермента А, НАД, ФАД, пиридоксальфосфата.
7. Строение активного центра ферментов, субстратсвязывающий и каталитический центр. Методы идентификации активного центра ферментов. Теория индуцированного соответствия субстрата активному центру фермента. Строение и значение аллостерического центра
8. Методы определения активности ферментов. Единицы активности ферментов.
9. Порядок и молекулярность ферментативной реакции. Механизмы ферментативной реакции. Понятие ферментативной активности. Способы выражения ферментативной активности.
10. Влияние концентрации фермента на скорость ферментативной реакции. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата. Теория Михаэлиса-Ментен. Способы графического определения константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции. Определение кинетических констант методом Лайнуивера и Берка.
11. Влияние температуры и pH среды на скорость ферментативных реакций.
12. Ингибиторы ферментов и их классификация. Виды ингибирования. Механизм конкурентного ингибирования и его значение.
13. Активаторы ферментов и механизм их действия. Небелковые компоненты ферментов: ионы металлов. Строение глутатиона и его роль в регуляции активности ферментов.
14. Уровни регуляции ферментативной активности. Регуляция путём изменения количества ферментов и путём изменения их индивидуальной каталитической активности. Способы контроля разветвлённых метаболических путей.
15. Характеристика трансфераз.
16. Характеристика гидролаз.
17. Характеристика оксидоредуктаз.
18. Характеристика лиаз.
19. Характеристика синтетаз.
20. Характеристика изомераз.



21. Экстрагирование ферментов из биологического материала. Кислотная обработка, термическая обработка, фракционирование солями, органическими растворителями, ультрацентрифугирование, кристаллизация.
22. Экстрагирование ферментов из биологического материала. Метод избирательной адсорбции, ионообменная хроматография, гельфильтрация, аффинная хроматография.
23. Экстрагирование ферментов из биологического материала. Электрофорез и изоэлектрофокусирование. Критерии чистоты ферментных препаратов.
24. Тканевое, клеточное и субклеточное распределение ферментов. Ферменты – маркеры субклеточных структур.
25. Использование ферментов-маркеров в диагностике, пищевых технологиях. и научных исследованиях.

6.4 Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков

Программа предусматривает изучение материала на лекциях и лабораторных занятиях. Предусмотрена самостоятельная работа аспирантов по темам. Проверка знаний осуществляется фронтально, индивидуально.

Процедура оценивания знаний, умений и навыков в ходе промежуточного контроля определяется СТО БГПУ «Положение о проведении текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации обучающихся в ФГБОУ ВО «БГПУ» утвержденным решением Ученого совета от 05 апреля 2017 г (протокол №3).

7. ПЕРЕЧЕНЬ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

На лекционных занятиях используются мультимедийные технологии, включая демонстрацию презентаций, применяется иллюстративный материал. Одновременное воздействие на два важнейших органа (слух и зрение) облегчает процесс восприятия и запоминания информации, придает наглядность теоретическому материалу.

1. Использование системы электронного обучения (СЭО) БГПУ:
 - система электронного обучения Moodle - разработка и комплексное использование электронных курсов;
2. Мультимедийное сопровождение лекций.

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ И ЭЛЕКТРОННЫХ РЕСУРСОВ

8.1 Список основной литературы

1. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера Том 1., Основы биохимии, строение и катализ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. – 636 с.
2. Биохимия : учебник для вузов / под. ред. Е. С. Северина. – 4-е изд., испр. – М. : ГЭОТАР- Медиа, 2007. – 779 с.
3. Иваченко, Л. Е. Ферменты сои : монография / Л. Е. Иваченко ; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федеральное агентство по образованию, БГПУ, Лаборатория молекулярной биологии. – Благовещенск : Изд-во БГПУ, 2010. – 214 с.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Благовещенский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА

Рабочая программа дисциплины

4. Методы изучения полиморфизма ферментов сои / Л.Е. Иваченко, В.А. Кашина, Е.С. Маскальцова, В.И. Разанцев, Е.М. Стасюк, И. А. Трофимцова; под ред. Л.Е. Иваченко. – Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2008. – 142 с.

8.2. Дополнительная литература

1. Химическая энзимология : учебник для студ. вузов / С. Д. Варфоломеев. – М. : Академия, 2005. – 471[2] с.
2. Волькенштейн, М. В. Биофизика : учеб. пособие / М. В. Волькенштейн. - 3-е изд., стер. – СПб. ; М. ; Краснодар : Лань, 2008. – 594 с.
3. Байрамов, В. М. Основы химической кинетики и катализа : учеб. пособие для студ. хим. спец. ун-тов / В.М. Байрамов; под ред. В.В. Лунина. – М. : Академия, 2003. – 254 с.
4. Регуляция ферментативной активности у растений [Текст] : межвузовский сб. / М-во высш. и сред. спец. образования РСФСР, ГГУ им. Н.И. Лобачевского ; [отв. ред. А. А. Анисимов]. – Горький : Изд-во ГГУ, 1988. – 77 с.
5. Кретович, В. Л. Введение в энзимологию / В. Л. Кретович. - М. : Наука, 1967. - 352 с.
6. Страйер, Л. Биохимия. В 3 т. Т. 1 [Текст] : научное издание / Л. Страйер ; пер. с англ. М. Д. Гроздовой ; под ред. С. Е. Северина. – М. : Мир, 1984. – 232 с.
7. Функциональная активность ферментов и пути ее регуляции : [учеб. пособие] / под ред.: С. Е. Северина, Г. А. Кочетова. – М. : Изд-во Моск. ун-та, 1981. – 208 с. :
8. Скоупс, Р. К. Методы очистки белков / Р. Скоупс ; пер. с англ. В. К. Антонова. – М. : Мир, 1985. – 358 с
9. Бертини И. Биологическая неорганическая химия: структура и реакционная способность: в 2 т. Т. 1 / И. Бертини, Г. Грей, Э. Стифель, Дж. Валентине; пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 456 с.: ил., [16] – (Лучший зарубежный учебник).
10. Бертини И. Биологическая неорганическая химия: структура и реакционная способность: в 2 т. Т. 2 / И. Бертини, Г. Грей, Э. Стифель, Дж. Валентине; пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 623 с.: ил., [16]. – (Лучший зарубежный учебник).

8.3 Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»

Базы данных РГБ, ЛАНЬ, Флора и фауна. Научная электронная библиотека e-library, Web of Science, Scopus, Agricola. Информационные справочные поисковые системы: Rambler, Yandex, Google.

<http://www.ippras.ru/> Институт физиологии растений РАН

<http://window.edu.ru/> Единое окно доступа к образовательным ресурсам

<http://www.informika.ru/text/index.html> ФГУ «Государственный НИИ информационных технологий и телекоммуникаций».

http://www.zin.ru/BIODIV/bd_proj.htm Информационный проект «Биоразнообразие России»

	МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
	федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Благовещенский государственный педагогический университет»
	ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА Рабочая программа дисциплины

Рекомендуются для дополнительного изучения обзорные и экспериментальные статьи в журналах «Физиология растений», «Биохимия», «Успехи современной биологии», «Соросовский образовательный журнал» и др.

9. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ БАЗА

Для проведения занятий лекционного и семинарского типа, групповых и индивидуальных консультаций, текущего контроля и промежуточной аттестации используются аудитории, оснащённые учебной мебелью, аудиторной доской в том числе интерактивной, компьютером(рами) с установленным лицензионным программным обеспечением, коммутатором для выхода в электронно-библиотечную систему и электронную информационно-образовательную среду ФГБОУ ВО «БГПУ», мультимедийными проекторами, экспозиционными экранами, учебно-наглядными пособиями (стенды, таблицы, мультимедийные презентации, видео материалы). Самостоятельная работа аспирантов организуется в аудиториях оснащенных компьютерной техникой с выходом в электронную информационно-образовательную среду вуза, в специализированных лабораториях по дисциплине, а также в залах доступа в локальную сеть БГПУ.

Для проведения практических занятий также используется:

Ауд. 333 «А»

Лаборатория биологической химии

- Стол лабораторный 1-мест. (8 шт.)
- Стол письменный 1-мест. (2 шт.)
- Стол преподавателя (1 шт.)
- Стул (11 шт.)
- Ноутбук с установленным лицензионным программным обеспечением (1 шт.)
- 8 - портовый коммутатор для выхода в электронно-библиотечную систему и электронную информационно-образовательную среду БГПУ (1 шт.)
- Мультимедийный проектор (1 шт.)
- вертикальная камера для электрофореза (1 шт.)
- КФК-2 (1 шт.)
- Облучатель бактериологический (1 шт.)
- Одноканальная пипетка (4 шт.)
- Весы для уравнивания пробирок (1 шт.)
- Весы лабораторные ЕК-410 (1 шт.)
- Микроскоп «Биолам» (1 шт.)
- Прибор для гельэлектрофореза (2 шт.)
- Термостат (2 шт.)
- Фотоэлектроколориметр (1 шт.)
- Хроматограф (1 шт.)
- Центрифуга (2 шт.)
- Поляриметр (1 шт.)



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Брянский государственный педагогический университет»

ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА
Рабочая программа дисциплины

- Секундомер (1 шт.)
- Спектрофотометр ПЭ- 5400УФ (1 шт.)
- Холодильник LG Electronics (1 шт.)
- Водяная баня (1 шт)
- Сушильный шкаф (1 шт)
- Вытяжной шкаф (1 шт)
- Прибор для определения удельной активности каталаз газометрическим методом (1 шт)
- Люксометр (1шт)
- рН-метр (1 шт)
- Штативы для пробирок, химическая посуда и нагревательные приборы
- Химические реактивы по тематике лабораторных работ

Учебно-наглядные пособия, мультимедийные презентации по учебной дисциплине.

**ОСОБЕННОСТИ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ ДЛЯ ИНВАЛИДОВ И ЛИЦ С
ОГРАНИЧЕННЫМИ ВОЗМОЖНОСТЯМИ ЗДОРОВЬЯ**

Для обучающихся с ограниченными возможностями здоровья предусмотрены следующие формы организации педагогического процесса и контроля знаний:

- для слабовидящих:

обеспечивается индивидуальное равномерное освещение не менее 300 люкс;

для выполнения контрольных заданий при необходимости предоставляется увеличивающее устройство;

задания для выполнения, а также инструкции о порядке выполнения контрольных заданий оформляются увеличенным шрифтом (размер 16-20);

- для глухих и слабослышащих:

обеспечивается наличие звукоусиливающей аппаратуры коллективного пользования, при необходимости обучающимся предоставляется звукоусиливающая аппаратура индивидуального пользования;

- для лиц с тяжелыми нарушениями речи, глухих, слабослышащих все контрольные задания по желанию могут проводиться в письменной форме.

Основной формой организации педагогического процесса является интегрированное обучение инвалидов, т.е. все обучающиеся учатся в смешанных группах, имеют возможность постоянно общаться со сверстниками, легче адаптируются в социуме.

Рабочая программа дисциплины разработана на основе:

- Приказа Министерства образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) от 19 ноября 2013 г. № 1259 г. Москва «Об утверждении Порядка организации и осуществления образовательной деятельности по образовательным программам высшего образования – программам подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре».
- ФГОС ВО, утвержденного приказом Министерства образования и науки РФ от 30 июля 2014 г. № 871 «Об утверждении федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки (уровень подготовки кадров высшей квалификации)».

	МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
	федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Благовещенский государственный педагогический университет»
	ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА Рабочая программа дисциплины

- СМК СТО 7.3-2.9.07 – 2016. Положения о программе аспирантуры ФГБОУ ВО «БГПУ», утвержденного и введенного в действие решением ученого совета ФГБОУ ВО «БГПУ» № 8 от 1 июня 2016 г
- Учебного плана по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки, утвержденного и введенного в действие решением ученого совета ФГБОУ ВО «БГПУ» № 12 от 25 ноября 2015 г., № 6 от 23 марта 2016 г.

Разработчики: Иваченко Л.Е., доктор биологических наук, профессор кафедры химии, Лаврентьева С.И., кандидат биологических наук, доцент кафедры химии.

	МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
	федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Благовещенский государственный педагогический университет»
	ОСНОВНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА Рабочая программа дисциплины

10. ЛИСТ ИЗМЕНЕНИЙ И ДОПОЛНЕНИЙ

Утверждение изменений в рабочей программе дисциплины для реализации в 2015/2016 уч. г.

Рабочая программа дисциплины обсуждена и одобрена для реализации в 2015/2016 учебном году на заседании кафедры (протокол № 8 от 20 мая 2015 г).

Утверждение изменений в рабочей программе дисциплины для реализации в 2016/2017 уч. г.

Рабочая программа дисциплины пересмотрена, обсуждена и одобрена для реализации в 2016/2017 учебном году на заседании кафедры (протокол № 7 от 23 марта 2016 г).

Утверждение изменений в рабочей программе дисциплины для реализации в 2017/2018 уч. г.

Рабочая программа дисциплины пересмотрена, обсуждена и одобрена для реализации в 2017/2018 учебном году на заседании кафедры (протокол № 9 от 18 мая 2017 г).

В рабочую программу дисциплины «Энзимология» внесены следующие изменения и дополнения:

№ изменения:1	
№ страницы с изменением: 38	
Исключить:	Включить:
	Пункт: Особенности освоения дисциплины для инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья
№ изменения: 2	
№ страницы с изменением: 35	
Исключить:	Включить:
Процедура оценивания знаний, умений и навыков в ходе промежуточного контроля определяется СТО БГПУ «Положение о курсовых зачетах и экзаменах», утвержденным решением ученого совета от 04 декабря 2013 г (протокол №9).	Процедура оценивания знаний, умений и навыков в ходе промежуточного контроля определяется СТО БГПУ «Положение о проведении текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации обучающихся в ФГБОУ «БГПУ» утвержденным решением ученого совета от 05 апреля 2017 г (протокол №3).
№ изменения: _____	
№ страницы с изменением: _____	
Исключить:	Включить: