

**ОБЩАЯ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ  
БИОХИМИЯ:  
СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ  
ЛИПИДОВ. ОБМЕН ЛИПИДОВ.  
НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ.  
КОМПОНЕНТЫ  
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**



Учреждение образования  
«Международный государственный экологический  
институт имени А. Д. Сахарова»  
Белорусского государственного университета

---

**ОБЩАЯ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ  
БИОХИМИЯ:  
СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ  
ЛИПИДОВ. ОБМЕН ЛИПИДОВ.  
НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ.  
КОМПОНЕНТЫ НУКЛЕИНОВЫХ  
КИСЛОТ**

*Учебно-методическое пособие*

Минск  
«ИВЦ Минфина»  
2018

УДК 577(075.8)  
ББК 28.072  
О28

А в т о р ы:

старшие преподаватели кафедры экологической химии и биохимии  
*Е. А. Докучаева, В. Э. Сяхович;*  
преподаватели кафедры экологической химии и биохимии  
*О. Г. Пархимович, Н. В. Богданова;*  
кандидат биологических наук, доцент кафедры  
экологической химии и биохимии *С. Б. Бокуть*

Р е ц е н з е н т ы :

кандидат химических наук, доцент кафедры микробиологии БГУ  
*Д. О. Герловский;*  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой экологической медицины и радиобиологии МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ  
*А. Н. Батян*

**Общая** и экологическая биохимия: структура и функции  
О28 липидов. Обмен липидов. Нуклеиновые кислоты. Компоненты  
нуклеиновых кислот : учебно-методическое пособие /  
Е. А. Докучаева, В. Э. Сяхович, О. Г. Пархимович и др. – Минск :  
ИВЦ Минфина, 2018. – 69 с.  
ISBN 978-985-7205-42-4.

В издании помещены материалы для проведения лабораторных работ по дисциплине «Общая и экологическая биохимия». Для каждой темы приводятся основные теоретические положения, вопросы для подготовки к занятию, список рекомендуемой литературы, перечень заданий к занятию, описание используемых в лабораторной работе приборов, материалов и реактивов. Включены теоретические сведения о структуре, функции и обмене липидов, а также материалы, отражающие принцип строения нуклеиновых кислот как носителей генетической информации. Приводится описание методов идентификации и количественного определения нуклеиновых кислот в биологических препаратах.

Предназначается студентам 2-го курса, обучающимся по специальности 1–33 01 05 «Медицинская экология», а также всем интересующимся вопросами экологической биохимии.

УДК 577 (0.75.8)  
ББК 28.072

# СОДЕРЖАНИЕ

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1**

НЕЙТРАЛЬНЫЕ ЖИРЫ. СТЕРОИДЫ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ХОЛЕСТЕРИНА .....4

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2**

ФОСФОЛИПИДЫ. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОСФОЛИПИДОВ. ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ФОСФОЛИПИДОВ.....25

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3**

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ПРИСУТСТВИЕ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ В РАСТВОРЕ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ .....42

## **ПРИЛОЖЕНИЕ 1**

НАИБОЛЕЕ ВАЖНЫЕ ДЛИННОЦЕПОЧНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ.....65

## **ПРИЛОЖЕНИЕ 2**

СТРУКТУРА КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ .....66

**Лабораторная работа № 1**  
**Нейтральные жиры. Стероиды. Идентификация и методы количественного определения жирных кислот и холестерина**

**Цель работы:** изучение химических свойств липидов. Освоение методов идентификации липидов и количественного определения жирных кислот и холестерина.

**Оборудование и материалы:**

- спектрофотометр SOLAR PV 1251;
- кюветы полистирольные;
- термостат;
- центрифуга UNIVERSAL 30RF;
- весы центрифужные;
- пробирки центрифужные;
- пипетки стеклянные на 1 мл и 5 мл;
- микропипетки автоматические;
- цилиндры мерные на 250 мл и 100 мл;
- пробирки стеклянные химические;
- штативы для пробирок;
- предметное стекло;
- шприц с длинной иглой;
- бумага фильтровальная;
- палочки стеклянные.

**Реактивы:**

- жир (масло);
- воск;
- сыворотка крови;
- холестерол, 1 % хлороформный раствор;
- желчные кислоты, раствор;
- бычий сывороточный альбумин (БСА), раствор;
- гидроксид натрия (NaOH), 10 % раствор, 15 % спиртовой раствор;
- гидрокарбонат натрия (NaHCO<sub>3</sub>), раствор;
- борная кислота, крист. (либо безводный MgSO<sub>4</sub>, либо безводный KHSO<sub>4</sub>);
- оксид серебра (Ag<sub>2</sub>O), аммиачный раствор;
- осмиевая кислота, 1 % раствор;
- фуксинсернистая кислота, раствор;
- судан III, раствор;

- медный реактив –  $\text{CH}_3\text{COOH}$  /  $\text{CuNO}_3$  / триэтаноламин в соотношении 1 / 10 / 9;
- диэтилдитиокарбамат (ДЭТК), 0,1 % раствор в н-бутаноле;
- реактив Либерман–Бурхард;
- мыло, раствор;
- бромная вода;
- сера, порошок;
- сахароза, 5 % раствор;
- эфир;
- керосин (бензин);
- хлороформ;
- спирт (этиловый), 96 %;
- серная кислота ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), конц.;
- соляная кислота ( $\text{HCl}$ ), 10% раствор;
- пальмитиновая (стеариновая) кислота, стандартный раствор, 50 мкг/мл;
- холестерол, стандартный раствор, 4,68 ммоль/л;
- вода дистиллированная.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### ЛИПИДЫ

*Липиды* составляют вместе с белками и углеводами основную массу органического вещества живой клетки. В высокой концентрации они (особенно фосфолипиды) обнаруживаются в различных органах животных и человека: в головном и спинном мозге, крови, печени, сердце, почках и других органах. Эти соединения входят в состав всех структурных элементов клетки, в первую очередь клеточных (плазматических) мембран и мембран субклеточных частиц. С участием липидов протекают такие важнейшие биохимические процессы, как передача нервных импульсов, активный перенос через мембраны, транспорт жиров в плазме крови и многие ферментативные процессы, особенно те, которые связаны с транспортом электронов и системой окислительного фосфорилирования.

Многообразие функций липидов в жизни клетки определяет ту важную роль, которую они выполняют в энергетических процессах, в защитных реакциях организма, его развитии и старении, в развитии различных патологических состояний и т. д.

В структурном отношении липиды и многие жироподобные вещества (называемые иногда липоидами) представляют собой весьма гетерогенную группу органических соединений, которые так или иначе связаны

с длинноцепочечными карбоновыми (высшими жирными) кислотами. Наиболее общими свойствами липидов являются:

во-первых, их нерастворимость в воде (хотя среди липидов имеются такие, которые способны образовывать в полярных растворителях относительно устойчивые эмульсии);

во-вторых, их растворимость в неполярных растворителях – эфире, хлороформе, бензоле.

### **Классификация и структура липидов**

В последние десятилетия были достигнуты значительные успехи в изучении химии и биохимии липидов. Однако до настоящего времени отсутствуют строгая классификация липидов и критерии принадлежности к данному классу биологически активных природных соединений. Так, к липидам пытаются отнести все вещества гидрофобного характера, включая не только производные высших жирных кислот, спиртов и альдегидов, но и терпены, стероиды, жирорастворимые витамины, пигменты и другие группы липофильных соединений клетки. Часто классификацию липидов осуществляют также на основе их растворимости, что, впрочем, совершенно не отражает их строения.

Отсутствие единой классификации липидов, по-видимому, в первую очередь обусловлено крайним разнообразием их структурных компонентов. В состав липидов входят высшие жирные кислоты, спирты, в том числе высшие жирные спирты, альдегиды, различные полиолы, углеводы, азотистые основания, аминокислоты, холестерол, аминокислоты, фосфорная и фосфоновая кислоты и другие соединения, между которыми могут образовываться разнообразные связи (сложноэфирная, простая эфирная, гликозидная, амидная, фосфодизфирная, фосфоноэфирная и др.). Если учесть, что эти компоненты могут иметь различную длину цепочки атомов углерода, различную степень ненасыщенности, различные функциональные группы и различную конфигурацию двойных связей, то станет понятным чрезвычайное разнообразие структуры липидов.

К липидам целесообразно относить природные биологически активные производные высших жирных кислот, спиртов и альдегидов. Как правило, при классификации липидов в последнее время пользуются именно таким определением. На основании указанного подхода, используемого при классификации данных соединений, липиды принято подразделять на *простые* или *нейтральные липиды*, *сложные липиды* (представленные, главным образом, *фосфолипидами*), *сфинголипиды*, а также *стерины* и *стериды* (*стеролы* и их эфиры с жирными кислотами).

### **Простые или нейтральные липиды**

Простые или нейтральные липиды, в свою очередь, подразделяют на *жиры* (*триацилглицеролы*) и *воска*. Триацилглицеролы представля-

ют собой сложные эфиры трех молекул высших жирных кислот с трехатомным спиртом *глицеролом*. В зависимости от насыщенности или ненасыщенности жирных кислот, входящих в состав триацилглицеролов, их делят на собственно *жиры* и *масла* соответственно. Триацилглицеролы являются основным компонентом жировых депо растительных и животных клеток. Важно отметить, что триацилглицеролы – это неполярные, гидрофобные соединения, не содержащие заряженных или сильно полярных групп и, поэтому, не растворимы в воде.

*Воска* – это тоже сложные эфиры, образуемые длинноцепочечными насыщенными или ненасыщенными жирными кислотами (с числом атомов углерода от 14 до 36) и длинноцепочечными одноатомными спиртами (с числом атомов от 16 до 22). У позвоночных животных воска, секретлируемые кожными железами, выполняют функцию защитного покрытия, которое смазывает, смачивает кожу и предохраняет ее от действия воды. У птиц, особенно водоплавающих, воска копчиковой железы придают перьевому покрытию водоотталкивающие свойства. Воска вырабатываются и используются в очень больших количествах морскими организмами, особенно планктонными, у которых они служат основной формой накопления высококалорийного клеточного топлива. Именно поэтому воска играют важную роль в морских пищевых цепях в качестве основного источника липидов.

### **Сложные или полярные липиды (фосфолипиды)**

Существует несколько классов сложных мембранных липидов. Отличаются от триацилглицеролов тем, что, наряду с углеводородными цепями, они содержат одну или несколько сильно полярных группировок. На этом основании их часто называют *полярными липидами*. *Фосфолипиды* служат основными структурными элементами мембран. Как следует из их названия, липиды этой группы содержат фосфор в виде остатка фосфорной кислоты. Роль основного фосфолипидного компонента играют *фосфоглицериды*, в состав которых входят два остатка жирных кислот, этерифицирующих первую и вторую гидроксильные группы глицерола. Третья гидроксильная группа глицерола образует сложноэфирную связь с фосфорной кислотой. Кроме того, с остатком фосфорной кислоты сложноэфирной связью связано азотистое основание, представленное холином, серином или этаноламином или шестиатомным циклическим спиртом инозитолом, что дает возможность различать несколько классов фосфолипидов (см. лабораторную работу № 2). На основании приведенного выше описания фосфолипиды следует отнести к группе липидов, которые имеют общее название *глицерофосфолипидов* или *фосфоглицеридов*.



## Сфинголипиды

Следующий важнейший класс мембранных липидов – *сфинголипидов* – также характеризуется наличием полярной «головки» и двух неполярных хвостов. Основу структуры сфинголипидов составляет не глицерол, а аминоспирт *сфингозин* (в некоторых случаях его производные), имеющий длинную углеводородную цепь с одной двойной связью. В сфинголипидах сфингозин связывается с жирной кислотой амидной связью, образуя при этом *церамид* (N-ацилсфингозин). В целом, сфингозин служит предшественником ряда длинноцепочечных аминоспиртов, присутствующих в различных сфинголипидах. Например, у млекопитающих наиболее часто встречаются сфингозин или не имеющий двойной связи *дигидросфингозин*. В сфинголипидах полярная «головка» присоединяется к первичной спиртовой группе сфингозина. Выделяют три подкласса сфинголипидов: *сфингомиелины*, *цереброзиды* и *ганглиозиды*.

Наиболее распространенными и просто устроенными сфинголипидами являются *сфингомиелины*, у которых первичная спиртовая группа сфингозина этерифицирована *фосфорилхолином*. Тот факт, что сфингомиелины содержат остаток фосфорной кислоты, отчасти дает основание относить эти соединения к фосфолипидам. На рис. 1.1 показаны пространственные модели фосфоглицерида и сфингомиелина.

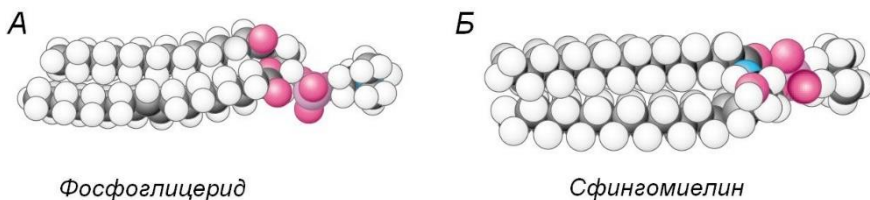


Рис. 1.1. Пространственные модели фосфоглицерида (А) и сфингомиелина (В)

*Цереброзиды* и *ганглиозиды* часто называют *гликолипидами*. Как следует из этого названия, гликолипиды (цереброзиды и ганглиозиды) – это *липиды, содержащие углеводную часть*. Аминогруппа сфингозина, как и в сфингомиелинах, ацилирована жирной кислотой. Отличие гликолипидов от сфингомиелина заключается в природе компонента, присоединенного к первичному гидроксилу сфингозинового скелета. В гликолипидах в этом положении находится один или несколько остатков моносахаридов. Простейшими гликолипидами являются *цереброзиды*, содержащие только один остаток моносахарида (чаще всего глюкозу или галактозу). В более сложных гликолипидах – *ганглиозидах* присутствует разветвленная цепочка из нескольких (вплоть до семи) остатков моносахаридов. На рис. 1.2 приведено строение ганглиозида  $G_{M1}$  и более просто устроенных ганглиозидов  $G_{M2}$  и  $G_{M3}$ .

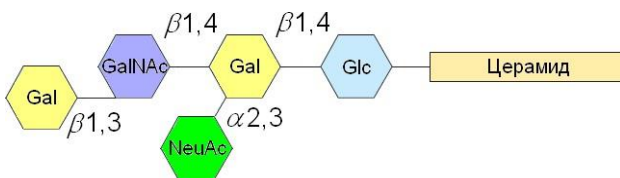
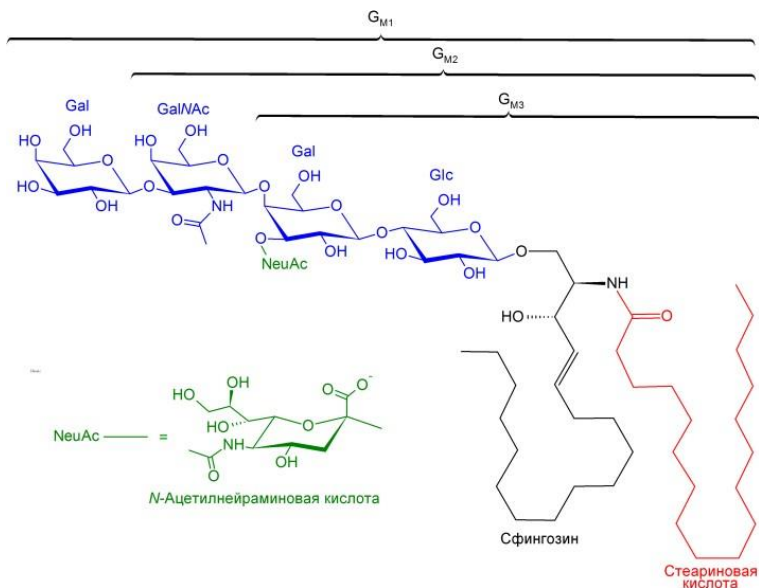


Рис. 1.2. Строение ганглиозида  $G_{M1}$  и более простых ганглиозидов  $G_{M2}$  и  $G_{M3}$ . Сокращения: Gal – галактоза; GalNAc – N-ацетилгалактозамин; Glc – глюкоза; NeuAc – N-ацетилнейраминная кислота. Справа показано упрощенное изображение ганглиозида  $G_{M1}$ . Над линиями, обозначающими связи между моносахаридами, указан тип этих связей, например  $\beta 1,4$

## Стероиды

Стероиды – сложные жирорастворимые соединения, молекулы которых состоят из четырех конденсированных колец, представляющих собой базовое ядро, называемое циклопентанпергидрофенантrenom. Подавляющее большинство стероидных соединений является производными циклопентанпергидрофенантрена, метилированного по 10-ому и 13-ому положениям базового ядра (рис. 1.3).

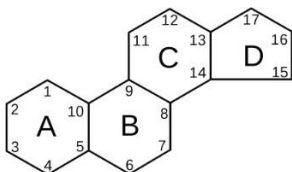


Рис. 1.3. Структура циклопентанпергидрофенантренового ядра стероидов. Показано общепринятое обозначение колец и нумерация углеродных атомов стероидов

Важную группу среди них составляют стероиды, несущие в положении  $C_3$  гидроксильную группу и отличающиеся только содержанием атомов углерода в боковой цепи, присоединяющейся к атому  $C_{17}$  в кольце D. Это так называемые стеролы или стероидные спирты. Данную группу стероидов подразделяют на:

1) *стерины*, или собственно *стеролы*, имеющие боковую цепь, состоящую из 8 атомов углерода. К ним относится, например, холестерин (холестерол);

2) *стериды*, представляющие собой сложные эфиры стеринов и высших жирных кислот;

3) *желчные кислоты* и их соли, обладающие мощным эмульгирующим действием на жиры и, соответственно, принимающие непосредственное участие в процессах переваривания липидов;

4) *половые гормоны* – стероиды-регуляторы, не имеющие боковой цепи;

5) *кортикостероиды*, содержащие боковую цепь из двух атомов углерода.

Основная масса стеринов в организме человека представлена *холестерином* – одноатомным циклическим спиртом, содержащим 27 атомов углерода и способным образовывать с жирными кислотами сложные жиры (холестериды). Холестерин (рис. 1.4) содержится в желчи, в плазме крови (3,9–6,5 ммоль/л), входит в состав клеточных мембран, определяя их вязкость, является компонентом липопротеинов.

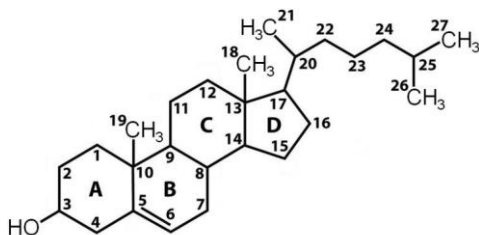


Рис. 1.4. Структура холестерина

## Предшественники и производные липидов

Сюда относятся жирные кислоты, глицерол, стероиды, прочие спирты (кроме глицерола, сфингозина и стеролов), альдегиды жирных кислот и кетоновые тела, углеводороды, жирорастворимые витамины и гормоны.

### Жирные кислоты

Выше приводилось определение, в соответствии с которым липиды – это природные биологически активные соединения, являющиеся производными высших жирных кислот, спиртов и альдегидов. Поскольку в структурном отношении липиды, представляющие собой гетерогенную группу органических соединений, так или иначе, связаны с длинноцепочечными карбоновыми кислотами, в настоящем разделе целесообразно привести более подробную характеристику жирных кислот как непременных компонентов липидов. Высшие жирные кислоты – это алифатические карбоновые кислоты, получаемые в основном из природных жиров и масел и состоящие из не менее, чем 10 атомов углерода. Практически все встречающиеся в естественных условиях жирные кислоты содержат четное число атомов углерода, причем чаще всего 16 или 18 углеродных атомов, образующих неразветвленную цепь (см. табл. в прил. 1).

Длинная углеводородная цепь, составляющая «хвост» молекулы жирной кислоты, может быть полностью насыщена, то есть содержать только одинарные связи, или может быть ненасыщена – содержать одну или несколько двойных связей. Как правило, ненасыщенные жирные кислоты встречаются в животных и растительных тканях в два раза чаще, чем насыщенные. В большинстве случаев у ненасыщенных жирных кислот имеющаяся двойная связь расположена между 9-м и 10-м атомами углерода и обозначается  $\Delta^9$ . Дополнительные двойные связи обычно расположены между  $\Delta^9$  – двойной связью и метильным концом цепи (прил. 1). Двойные связи практически во всех природных жирных кислотах находятся в цис-конфигурации, что приводит к сильному изгибу алифатической цепи, хотя могут присутствовать жирные кислоты с двойными связями в трансконфигурации (рис. 1.5).

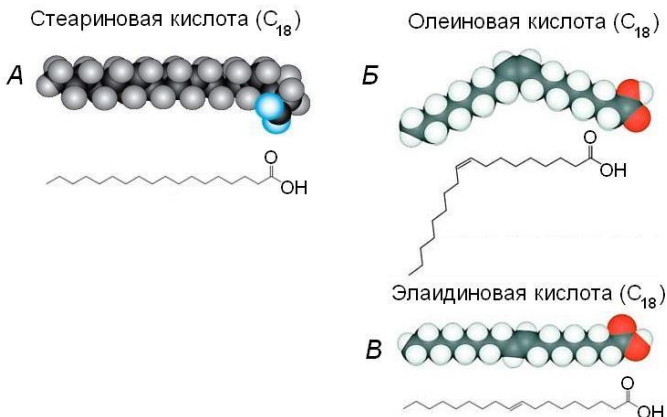


Рис. 1.5. Пространственные модели стеариновой кислоты ( $C_{18}$ , насыщенная) (А), олеиновой кислоты ( $C_{18}$ , ненасыщенная) с двойной связью в *цис*-конфигурации, обуславливающей изгиб углеводородной цепи (Б) и элаидиновой кислоты ( $C_{18}$ , ненасыщенная) с двойной связью в *транс*-конфигурации (В)

Жирные кислоты с несколькими двойными связями (*арахидоновая кислота* содержит четыре двойные связи) имеют несколько изгибов цепи, и их молекулы обладают большей жесткостью, чем молекулы насыщенных жирных кислот. Последние, благодаря свободному вращению вокруг одинарных связей, характеризуются большей гибкостью и большей длиной. При температуре тела насыщенные жирные кислоты в ряду  $C_{12}$  –  $C_{24}$  находятся в твердом воскообразном состоянии, в то время как ненасыщенные жирные кислоты представляют собой жидкости. В табл. 1.1 показана взаимосвязь температуры плавления жирных кислот от длины углеводородной цепи и степени их ненасыщенности.

Ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав жиров, подразделяют, в соответствии со степенью их ненасыщенности, следующим образом:

1) *мононенасыщенные (моноеновые)* жирные кислоты, имеющие одну двойную связь;

2) *полиненасыщенные (полиеновые)* жирные кислоты, имеющие две, три и четыре двойные связи;

3) *эйкозаноиды* (приставка *эйкоза-* означает присутствие 20 атомов углерода в жирной кислоте). Эти соединения образуются из *эйкозаполиеновых* жирных кислот и подразделяются на *простаноиды* и *лейкотриены*. Простаноиды включают *простагландины*, *простациклины* и *тромбоксаны*. Простаноиды образуются путем циклизации определенного участка в центре углеводородной цепи у эйкозаполиеновых жирных кислот

(например, арахидоновой) с образованием циклопентанового кольца. К кольцу могут быть присоединены различные группы (кетогруппы, гидроксигруппы и другие). Тромбоксаны также содержат атомы кислорода в своем циклопентановом кольце. При образовании лейкотриенов циклизация не происходит, а соответствующие ферменты осуществляют встраивание кислорода по двойным связям жирных кислот;

4) *другие ненасыщенные жирные кислоты* представлены различными соединениями, содержащими, в частности, гидроксильные группы или циклические группы.

Таблица 1.1

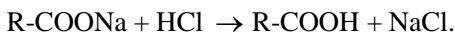
Физические свойства некоторых природных жирных кислот

| Тривиальное название           | Число атомов углерода | Температура плавления, °С |
|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Насыщенные жирные кислоты      |                       |                           |
| Лауриновая кислота             | 12                    | 44,2                      |
| Миристиновая                   | 14                    | 53,9                      |
| Пальмитиновая                  | 16                    | 63,1                      |
| Стеариновая                    | 18                    | 69,6                      |
| Арахидоновая                   | 20                    | 76,5                      |
| Лигноцериновая                 | 24                    | 86,0                      |
| Ненасыщенные жирные кислоты    |                       |                           |
| Пальмитолеиновая (1 дв. связь) | 16                    | -0,5                      |
| Олеиновая (1 дв. связь)        | 18                    | 13,4                      |
| Линолевая (2 дв. связи)        | 18                    | -5,0                      |
| Линоленовая (3 дв. связи)      | 18                    | -11,0                     |
| Арахидоновая (4 дв. связи)     | 20                    | -49,5                     |

Свободные жирные кислоты нерастворимы в воде, однако, поскольку эти соединения являются, по существу, карбоновыми кислотами, имеющими карбоксильную группу, то они способны образовывать соли с моно- и дивалентными катионами таких металлов, как  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ . *Натриевые и калиевые соли жирных кислот* получили название *мыл*. Мыла представляют собой *амфипатические вещества*: их ионизованная карбоксильная группа формирует полярную «головку», а алифатическая углеводородная цепь – неполярный, гидрофобный «хвост». *Амфипатические соединения* являются *поверхностно-активными веществами* (ПАВ), проявляющими свойства *детергентов* (или *эмульгаторов*). Данные соединения способны эмульгировать нерастворимые в воде масла и жиры, встраивая свои алифатические «хвосты» в капли жира, при этом полярные «головки» мыла взаимо-

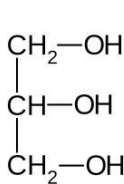
действуют с водой. Этим самым мыла переводят гидрофобные частицы в растворимое в воде состояние, что позволяет легко удалить их с загрязненной поверхности. Наиболее широкое распространение получили твердые (натриевые соли жирных кислот) и жидкие (калиевые соли жирных кислот) мыла, благодаря тому обстоятельству, что именно натриевые и калиевые соли жирных кислот хорошо растворимы в воде. Описывая физико-химические свойства мыл, следует отметить, что при попытке их растворения в жесткой (например, водопроводной) воде, они теряют свою растворимость и выпадают в виде белых хлопьев. При этом их моющая способность резко снижается. Утрата detergentных свойств мыл в жесткой воде объясняется присутствием в ней ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  в значительной концентрации, что приводит к образованию нерастворимых в воде кальциевых и магниевых солей жирных кислот.

Свободные жирные кислоты легко образуются при взаимодействии мыла с сильными неорганическими кислотами (например, соляной). Уравнение такой реакции выглядит следующим образом:

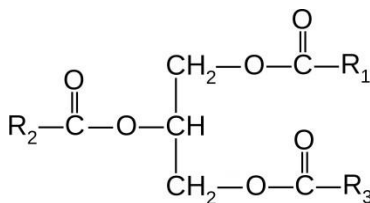


### Жиры (триацилглицеролы)

Триацилглицеролы – наиболее простые и широко распространенные липиды, содержащие жирные кислоты. Другие часто употребляемые названия этих липидов – жиры, нейтральные жиры или *триглицериды*. Такие липиды состоят из трехатомного спирта глицерола и присоединенных к нему сложноэфирными связями одного, двух или трех остатков длинноцепочечных жирных кислот. При этом образуются так называемые *моно-, ди- и триацилглицеролы* соответственно. Количество жирных кислот, а также их качественный состав (число атомов углерода в цепи; наличие или отсутствие двойных связей, а также их количество) зависит от вида жира. Большинство природных жиров – смешанные триацилглицеролы (рис. 1.6).



Глицерол (глицерин)



Триацилглицерол

Рис. 1.6. Структура триацилглицерола

Физические свойства жиров организма в основном зависят от длины углеродных цепей составляющих их жирных кислот, а также степени их ненасыщенности. Так, точка плавления жирных кислот с четным числом атомов углерода повышается с ростом длины цепи и падает при увеличении степени ненасыщенности (табл. 1). Таким образом, чем больше в составе триацилглицерола ненасыщенных жирных кислот, тем при нормальных условиях его состояние ближе к жидкому (например, если все три жирные кислоты насыщенные, то жир имеет твердую консистенцию, если все ненасыщенные – жидкую, называемую маслом).

Для выявления содержания в данном жире ненасыщенных жирных кислот, а также степени их ненасыщенности можно использовать бромную воду. Обесцвечивание бромной воды свидетельствует о присутствии в растворе соединений, содержащих двойные связи. Это обусловлено протеканием процесса бромирования данных соединений по их двойным связям и расходом брома.

Жиры относятся к нейтральным липидам, то есть не несут заряда и обладают резко выраженными гидрофобными свойствами. Поэтому жиры не растворимы в воде и плохо растворимы в других полярных растворителях. Данные соединения хорошо растворяются в таких неполярных органических растворителях, как эфиры, хлороформ, керосин и др.

Триацилглицеролы способны образовывать довольно устойчивые эмульсии при их растворении в *растворе мыла*. Эмульгирующие свойства мыл, лежащие в основе их применения в качестве моющих средств, были рассмотрены выше. Эмульгирование жира может также происходить в *растворе щелочи*, поскольку свободные жирные кислоты, всегда присутствующие в небольшом количестве в любом жире, реагируют со щелочью, образуют мыла и эмульгируют жир. Механизм эмульгирования жиров в *растворе соды* сходен с механизмом эмульгирования в растворе щелочи. В *растворах белков* образуются растворимые в воде липопротеиновые конгломераты, в составе которых гидрофильные участки белков экспонированы наружу, а гидрофобные участки и жиры располагаются внутри и не контактируют с водой. Наконец, одними из наиболее мощных эмульгаторов жиров являются *желчные кислоты* и *их соли*, которые в своем составе имеют как гидрофобные, так и гидрофильные участки и, таким образом, способны действовать как сильные ионные детергенты.

Важным свойством жиров и масел является их способность гидролизоваться под действием щелочей с высвобождением глицерола и свободных солей жирных кислот (*мыл*). Эта реакция получила название омыления (рис. 1.7).



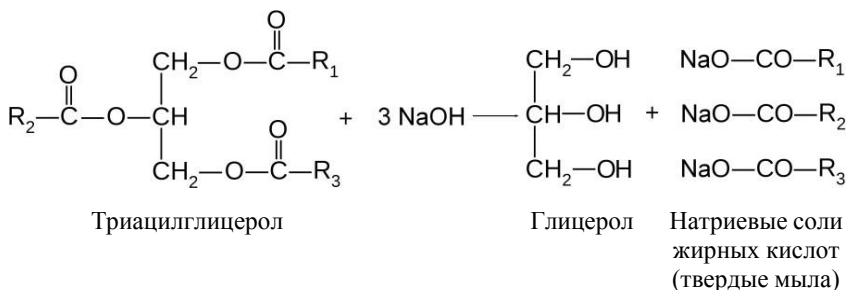


Рис. 1.7. Уравнение реакции омыления триацилглицеролов

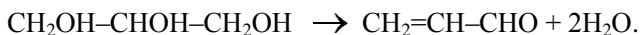
Омыление триацилглицеролов раствором щелочи протекает в течение нескольких часов из-за нерастворимости жира в воде и значительно быстрее (примерно четверть часа) в водно-спиртовом растворе, так как жир растворяется в горячем спирте и этим достигается лучшее взаимодействие молекул жира и щелочи.

## Химические свойства липидов

### Качественные реакции на жиры

#### Акролеиновая проба

Данная проба проводится для обнаружения в липидах *глицерола*. При нагревании глицерола в присутствии водоотнимающих средств (гидросульфата калия, борной кислоты либо сульфата магния) происходит образование непредельного акрилового альдегида – *акролеина*:



Акролеин имеет специфический раздражающий запах. Обнаружить присутствие данного соединения в выделяемых парах можно также по *реакции с аммиачным раствором оксида серебра*. Имеющий альдегидную группу акролеин способен восстанавливать  $\text{Ag}_2\text{O}$  до металлического серебра, вызывая почернение участка фильтровальной бумаги, смоченной в аммиачном растворе оксида серебра. Механизм данной реакции аналогичен механизму реакции «серебряного зеркала», характерной для восстанавливающих моносахаридов. Точно также качественной реакцией на альдегидную группу акролеина может служить *реакция с фуксинсернистой кислотой*. В этом случае фильтровальная бумага, смоченная в растворе фуксинсернистой кислоты и выдержанная в парах акролеина, приобретает ярко-розовую окраску.

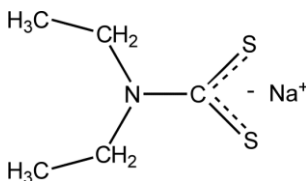
Липиды, не содержащие глицерола (воска, стероиды и др.), акролеиновой пробы не дают. В частности, при проведении этой реакции с воском образование акролеина не происходит.

### ***Пробы с осмиевой кислотой и суданом III***

*Осмиевая кислота* и *судан III* являются специфическими красителями на жиры и часто используются для окрашивания образцов в микроскопии. В случае осмиевой кислоты жир приобретает черную окраску, а краситель судан III окрашивает жиры в различные оттенки красного цвета.

### **Количественное определение жирных кислот с диэтилдитиокарбаматом**

При взаимодействии жирных кислот с медь-триэтаноламиновым реактивом (уксусная кислота:нитрат меди:триэтаноламин в соотношении 1:10:9) образуются медные соли жирных кислот. В свою очередь, медные соли жирных кислот способны образовывать с диэтилдитиокарбаматом натрия (ДЭДТК)  $[(C_2H_5)_2NCSSNa]$  окрашенные комплексные соединения, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации свободных жирных кислот:



Диэтилдитиокарбамат натрия

### **Качественные реакции на холестерол**

Рассматриваемые в данной работе качественные реакции на холестерол (*реакции Шиффа*, *Сальковского* и *Либермана–Бурхарда*) сходны друг с другом по природе химических превращений. Под действием серной кислоты происходят дегидратация и окисление холестерола. В результате этого две молекулы холестерола, потерявшие по одной молекуле воды, соединяются между собой по третьему атому углерода, образуя вещества, соответствующие суммарным формулам  $C_{54}H_{86}$  и  $C_{54}H_{88}$  (в зависимости от положения двойных связей). Эти непредельные углеводороды с сопряженными двойными связями дают различные производные с серной кислотой и уксусным ангидридом. Указанные реакции характерны не только для холестерола, но и для других стеролов, а также для холевого кислоты.

#### ***Реакция Шиффа***

При наслаивании концентрированной серной кислоты на раствор холестерола, на границе раздела двух жидкостей появляется оранжевое кольцо, которое при стоянии переходит в красное.

### ***Реакция Сальковского***

При легком встряхивании полученной в предыдущем опыте смеси после отслаивания верхний слой жидкости окрашивается в красный цвет, нижний имеет желто-оранжевую окраску с зеленой флуоресценцией (жидкость в проходящем свете прозрачна и желто-красного цвета, в отраженном свете кажется мутной с зеленым оттенком).

### ***Реакция Либермана–Бурхарда***

При добавлении к раствору холестерина реактива Либермана–Бурхарда (смесь серной и уксусной кислот, а также уксусного ангидрида) вначале появляется красное окрашивание, которое затем переходит в фиолетовое, синее и зеленое. При незначительном содержании холестерина в растворе сразу появляется зеленое окрашивание.

## **Количественное определение общего холестерина**

### ***Метод Илька***

Принцип метода основан на реакции Либермана–Бурхарда: холестерол в присутствии уксусного ангидрида и смеси уксусной и серной кислот дает зеленое окрашивание с интенсивностью, пропорциональной концентрации холестерина.

## **Методы определения желчных кислот**

*Желчные кислоты* имеют полностью насыщенный стерановый скелет и боковую цепь, состоящую из 5 атомов углерода. Известны 4 желчные кислоты, из них две первичные и две вторичные. Первичные желчные кислоты синтезируются в печени из продуктов распада холестерина и поступают в двенадцатиперстную кишку. К первичным желчным кислотам относятся: холевая кислота, содержащая гидроксильные группы в 3-, 7- и 12- ом положениях, и хенодезоксихолевая кислота, содержащая только две гидроксильные группы в 3- и 7-ом положениях.

Вторичные желчные кислоты синтезируются в кишечнике из первичных желчных кислот под действием ферментов микрофлоры кишечника. К ним относятся: дезоксихолевая кислота, имеющая гидроксильные группы в 3- и 12-ом положениях и литохолевая, содержащая гидроксильную группу только в 3-ем положении.

В желчи содержатся, главным образом, конъюгаты желчных кислот с глицином и таурином в виде, например, гликохолевой и таурохолевой кислот.

Амфифильная природа желчных кислот и их солей обуславливает их поверхностно-активные свойства и участие в переваривании жиров.

## **Качественные реакции на желчные кислоты**

### ***Проба Гея***

В основе данной пробы лежит способность желчных кислот, являющихся поверхностно-активными веществами, снижать поверхностное

натяжение водного раствора. В связи с этим порошок серы, помещенный на поверхность раствора желчных кислот, тонет, в то время как в воде он остается на плаву.

### ***Проба Петенкоффера***

Данная реакция основана на образовании окрашенного продукта при взаимодействии желчных кислот и оксиметилфурфузола. Последний образуется из сахарозы при действии концентрированной серной кислоты. При наличии в растворе желчных кислот он приобретает красно-фиолетовую окраску.

### ***Контрольные вопросы***

1. Биологические функции липидов.
2. Общие свойства, классификация и номенклатура липидов.
3. Жирные кислоты. Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты.
4. Строение и свойства нейтральных жиров. Воска.
5. Методы оценки физико-химические свойства жиров.
6. Качественные реакции на жиры.
7. Количественное определение жиров.
8. Строение и свойства стероидов. Холестерол и его эфиры.
9. Желчные кислоты. Их биологическая роль.
10. Качественные реакции на холестерол, желчные кислоты.
11. Количественное определение холестерола.

### ***Литература***

1. *Рогожин В. В.* Практикум по биохимии. – Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2013.
2. *Чернов Н. Н., Березов Т. Т., Буровина С. С.* Биохимия: руководство к практическим занятиям. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2009.
3. *Пустовалова Л. М.* Практические работы по биохимии. – Ростов на Дону: «Феникс», 2004.
4. *Чиркин А. А.* Практикум по биохимии. – Минск: «Новое знание», 2002.
5. *Нельсон Д., Кохс М.* Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. – М.: «Бином», 2014.
6. *Чиркин А. А., Данченко Е. О.* Биохимия. – М.: «Медицинская литература», 2010.
7. *Северин Е. С., Алейникова Т. Л., Осипов Е. В. и др.* Биологическая химия. – М.: «Медицинское информационное агентство», 2008.
8. *Кольман Я., Рем К.-Г.* Наглядная биохимия. – М.: «Мир», 2000.
9. *Долгов В. В., Ованесов Е. Н., Щетникович К. А.* Фотометрия в лабораторной практике. – М.: «Витал Диагностика СПб», 2004.

### НЕЙТРАЛЬНЫЕ ЖИРЫ

#### Свойства жиров

##### *Определение непердельности высших жирных кислот*

1. В пробирку помещают 10 капель бромной воды.
2. Затем добавляют 3 капли масла и смесь встряхивают.
3. Отмечают изменение окраски бромной воды. Объясняют наблюдаемое явление и делают выводы о присутствии непердельных жирных кислот в составе данного масла.

##### *Растворение жиров*

1. В 4 пробирки помещают по 3 капли масла (жира).
2. Затем в первую пробирку приливают 2 мл керосина (бензина), во вторую – 2 мл хлороформа, в третью – 2 мл эфира, в четвертую – 2 мл спирта.
3. Отмечают различия в растворимости данного масла (жира) в приведенных растворителях. Объясняют получаемые результаты и делают выводы.

##### *Эмульгирование жиров*

1. В 6 пробирок помещают по 3 капли масла (жира) и 2 мл воды.
2. Затем в первую пробирку приливают 5 капель раствора белка, во вторую – 5 капель NaOH, в третью – 5 капель раствора NaHCO<sub>3</sub> (сода), в четвертую – 5 капель раствора мыла, в пятую – 5 капель раствора желчи, а шестую пробирку оставляют в качестве контроля.
3. Содержимое пробирок перемешивают. (Если в эксперименте используется твердый жир – пробирки предварительно инкубируют в горячей водяной бане для его плавления).
4. Отмечают поведение данного масла (жира) в каждой из пробирок. Объясняют полученные результаты и делают выводы.

##### *Омыление (щелочной гидролиз) жиров*

1. Взвешивают 2 г жира (или масла), вносят в пробирку и приливают к нему 6 мл 15 % спиртового раствора NaOH.
2. Омыление проводят при температуре около 30 °С в течение 10–12 мин.
3. Для определения окончания реакции омыления несколько капель гидролизата вливают в небольшое количество горячей дистиллированной воды. При завершившемся омылении гидролизат полностью растворяется в воде.

4. По окончании омыления смесь выливают в фарфоровую чашку, добавляют 20–30 мл воды.

5. Затем путем нагревания содержимого чашки на водяной бане удаляют спирт, при этом объем раствора уменьшается приблизительно наполовину.

6. После упаривания раствор доводят до объема 20 мл дистиллированной водой. Результирующий раствор используется для получения свободных жирных кислот.

### ***Получение свободных жирных кислот***

1. К 3 мл раствора, полученного в предыдущем опыте, добавляют 10 % HCl до кислой реакции.

2. Наблюдают образование белой мути, постепенно всплывающей в виде жировых капель на поверхности водного слоя (свободные жирные кислоты).

3. Добавляют 5 мл эфира, отверстие пробирки закрывают пробкой и встряхивают. Жировые капли растворяются, водный слой становится прозрачным.

4. Осторожно отсасывают эфирный слой пипеткой и переносят несколько капель на предметное стекло. После испарения эфира на стекле остается налет.

### **Качественные реакции на жиры**

#### ***Акролеиновая проба на жиры***

1. В пробирку вносят 3 капли масла (жира) и добавляют пятикратное количество безводного гидросульфата калия (либо безводного сульфата магния, либо борной кислоты).

2. Пробирку осторожно нагревают до появления белых густых паров.

3. Отмечают (***осторожно!***) резкий раздражающий запах акролеина.

4. В пары вносят кусочек фильтровальной бумаги, смоченный аммиачным раствором оксида серебра.

5. Отмечают изменение окраски фильтровальной бумаги. Объясняют полученный результат.

6. Затем в пары вносят кусочек фильтровальной бумаги, смоченный фуксинсернистой кислотой.

7. Отмечают изменение окраски фильтровальной бумаги. Объясняют полученный результат.

8. Такой же эксперимент (пункты 1–7) проводят с кусочком воска.

9. Делают выводы о строении используемого в данном опыте жира и воска.

### ***Проба с осмиевой кислотой***

1. На предметное стекло наносят 1 каплю масла.
2. В нее вносят 1 каплю 1 % раствора осмиевой кислоты.
3. Отмечают изменение окраски. Объясняют полученный результат и делают выводы.

### ***Проба с суданом III***

1. На предметное стекло наносят 1 каплю масла.
2. В нее вносят 1 каплю раствора судана III.
3. Отмечают изменение окраски. Объясняют полученный результат и делают выводы.

## **СТЕРОИДЫ**

### **Качественные реакции на холестерол**

#### ***Реакция Шиффа***

1. В пробирку наливают 10 капель 1 % хлороформного раствора холестерола.
2. Далее добавляют равный объем концентрированной серной кислоты (осторожно, по стенке пробирки).
3. Отмечают появление окрашенного кольца на границе слоев, а также изменение окраски со временем. Объясняют наблюдаемое явление и делают выводы.

#### ***Реакция Сальковского***

1. После проведения пробы Шиффа жидкость осторожно встряхивают, перемешивая содержимое пробирки.
2. Отмечают окрашивание различных частей раствора (после отстаивания), а также изменение окраски со временем. Объясняют полученный результат и делают выводы.

#### ***Реакция Либермана–Бурхарда***

1. В пробирку вносят 10 капель 1 %-го раствора холестерола в хлороформе.
2. Затем добавляют 5 капель реактива Либермана–Бурхарда.
3. Содержимое пробирки осторожно встряхивают и помещают в баню при температуре 40 °С на 2 мин или оставляют при комнатной температуре на 10 мин.
4. Отмечают изменение окраски. Объясняют полученный результат и делают выводы.

## Качественные реакции на желчные кислоты

### *Проба Гея*

1. В пробирку вносят 3 мл раствора желчных кислот, во вторую – 3 мл воды.
2. Затем добавляют по 1 шпателью порошка серы.
3. Отмечают различное поведение серы в присутствии и отсутствии желчных кислот.

### *Проба Петенкоффера*

1. В пробирку наливают 2 мл раствора желчных кислот.
2. Затем добавляют 0,5 мл 5 % раствора сахарозы.
3. Осторожно, по стенке пробирки, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты.
4. Оставляют на 15 мин пробирку в штативе.
5. Отмечают появление окраски. Объясняют полученный результат и делают выводы.

## МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ХОЛЕСТЕРИНА

### Количественное определение жирных кислот

#### *Количественное определение жирных кислот с диэтилдитиокарбаматом*

1. В одну пробирку вносят 0,5 мл образца, в другую 0,5 мл стандартного раствора пальмитиновой (стеариновой) кислоты.
2. В обе пробирки добавляют по 5 мл хлороформа и по 2,5 мл медного реактива.
3. Пробирки закрывают полиэтиленовыми пробками и встряхивают 3 мин.
4. Далее, не открывая пробирки, пробы центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. В результате жидкость разделяется на 3 фазы: медный раствор, водная фаза (верхняя); белковая фаза (средняя); органическая фаза (нижняя).

*Примечание.* Если полученная нижняя органическая фаза не прозрачна (в ней присутствует белок), то тонкой стеклянной палочкой обводят по стенкам пробирки так, чтобы белок прилип к ней.

5. Затем 3 мл нижнего слоя отбирают в отдельную пробирку с помощью шприца с длинной иглой.

6. К 3 мл отобранной фракции добавляют 0,5 мл 0,1 % раствора ДЭДТК в н-бутаноле. Окраска развивается немедленно.

7. Оптическую плотность раствора измеряют при 445 нм против холостой пробы, содержащей воду.



8. Концентрацию жирных кислот в образце определяют по формуле:

$$C_{(мкг/мл)} = \frac{A \cdot C_{ст}}{A_{ст}},$$

где,  $C$  – концентрация жирных кислот в исследуемом образце,  $A$  – оптическая плотность исследуемой образце,  $C_{ст}$  – концентрация пальмитиновой (стеариновой) кислоты в стандартном растворе (50 мкг/мл),  $A_{ст}$  – оптическая плотность стандартного раствора.

*Примечание.* При определении количества жирных кислот в тканях животных, для каждой ткани подбирают соответствующее разведение.

### Количественное определение холестерина

#### *Количественное определение общего холестерина методом Илька*

1. Стандартную и опытную пробы готовят в соответствии с приведенной ниже таблицей (реактив Либермана–Бурхарда добавляют к сыворотке крови и к стандарту, медленно доливая по стенке пробирки):

| Ингредиенты                     | Опытная проба, мл | Стандартная проба, мл |
|---------------------------------|-------------------|-----------------------|
| Сыворотка крови                 | 0,1               | –                     |
| Стандартный раствор холестерина | –                 | 0,1                   |
| Реактив Либермана–Бурхарда      | 2,1               | 2,1                   |

2. Затем пробирки энергично встряхивают и инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 20 мин.

3. По окончании инкубации немедленно измеряют оптическую плотность в пробах при длине волны 650 нм (красный светофильтр) против воды.

4. Расчеты выполняют по формуле:

$$C_{(сыв)}, ммоль/л = \frac{A_{ст} \cdot C_{ст}}{A_{стандарт}},$$

где  $C_{ст}$  – концентрация стандартного раствора холестерина (ммоль/л).

### Оформление работы

*К занятию:*

Кратко законспектировать теоретические данные по лабораторной работе.

*Во время занятия:*

1. Описать этапы работы.
2. Описать результаты.
3. Сделать выводы.

**Лабораторная работа № 2**  
**Фосфолипиды. Физико-химические свойства фосфолипидов.**  
**Изучение химического состава фосфолипидов**

**Цель работы:** освоение методов идентификации и установления химического состава фосфолипидов.

**Оборудование и материалы:**

- водяная баня;
- плитка электрическая;
- горелка спиртовая;
- микроскоп;
- пипетки стеклянные на 1 мл и 5 мл;
- микропипетки автоматические;
- цилиндры мерные на 250 мл и 100 мл;
- стаканы на 50 мл и 100 мл;
- воронки;
- пробирки стеклянные химические;
- штативы для пробирок;
- ступка с пестиком;
- тигель;
- предметное стекло;
- бумага фильтровальная;
- палочки стеклянные;
- бумага индикаторная лакмусовая.

**Реактивы:**

- яйцо;
- гидроксид натрия (NaOH), 10 % раствор;
- карбонат натрия (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), крист.;
- нитрат калия (KNO<sub>3</sub>), крист.;
- Молибденовый реактив:  
молибдат аммония ([NH<sub>4</sub>]<sub>12</sub>MoO<sub>4</sub>), 15 % раствор / HNO<sub>3</sub> (конц.)  
в соотношении 110/90;
- магниезиальная смесь: – MgCl<sub>2</sub> (10 %), NH<sub>4</sub>Cl (20 %), NH<sub>4</sub>OH;
- хлорид кадмия (CdCl<sub>2</sub>), насыщенный спиртовой раствор;
- борная кислота, крист. (либо безводный MgSO<sub>4</sub>, либо безводный KHSO<sub>4</sub>);
- эфир;
- спирт (этиловый), 96 %;

- ацетон;
- соляная кислота (HCl), 10 % раствор;
- азотная кислота (HNO<sub>3</sub>), 10 % раствор;
- вода дистиллированная.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

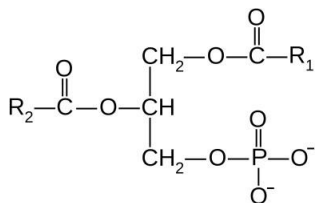
### ФОСФОЛИПИДЫ

Существует несколько классов мембранных липидов. Отличаются от триацилглицеролов тем, что, наряду с углеводородными цепями, они содержат одну или несколько сильно полярных «головок». На этом основании мембранные липиды часто называют также *полярными липидами*. В наибольшем количестве в мембранах присутствуют полярные липиды, представленные *фосфолипидами*. Фосфолипиды являются производными либо трехатомного спирта глицерола, либо более сложного аминоспирта сфингозина. Фосфолипиды, которые являются производными глицерола, получили название *фосфоацилглицеролов*. Эти соединения состоят из глицерола (в качестве основы всей структуры), двух остатков жирных кислот и фосфорилированного спирта. В фосфоацилглицеролах гидроксильные группы при C<sub>1</sub> и C<sub>2</sub> атомах в глицероле этерифицированы карбоксильными группами двух жирных кислот. Третья гидроксильная группа глицерола этерифицирована фосфорной кислотой. Образующееся при этом соединение является простейшим фосфоацилглицеролом и называется *диацилглицерол-3-фосфатом* или *фосфатидной кислотой*. Это соединение представляет собой ключевой промежуточный продукт для биосинтеза других более сложных фосфолипидов. Все основные мембранные фосфолипиды образуются путем этерификации фосфатной группы *фосфатидной кислоты* с гидроксильными группами спиртов, таких, как *серин*, *этаноламин*, *холин*, *глицерол* и *инозитол*. Таким образом, к фосфолипидам относятся *фосфатидная кислота*, *фосфатидилсерин*, *фосфатидилэтаноламин*, *фосфатидилхолин*, *фосфатидилглицеролы* и *фосфатидилинозитол* соответственно. Единственный фосфолипид мембран, не являющийся производным глицерола, – это *сфингомиелин*.

#### **Фосфатидная кислота и фосфатидилглицеролы**

Исходным соединением для всех фосфоацилглицеролов (фосфолипидов) служит, как уже упоминалось, *фосфатидная кислота* (рис. 2.1). В свободном виде это соединение встречается в крайне незначительных количествах. С другой стороны, фосфатидная кислота является важнейшим промежуточным соединением в процессах биосинтеза триацилглицеролов и множества фосфолипидов.

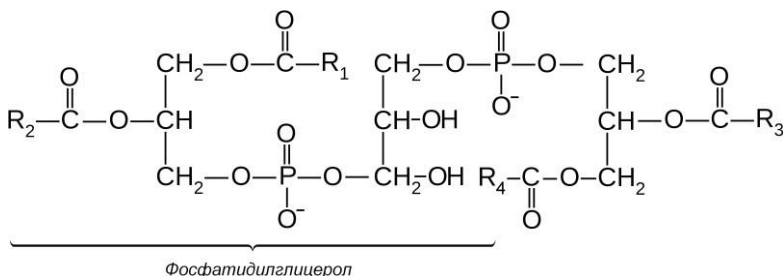
Крайне интересными фосфолипидами являются так называемые *кардиолипины*, которые представляют собой «двойные» *фосфатидилглицеролы* (рис. 2.2). Главной особенностью кардиолипинов является то, что эти соединения локализуются, главным образом во внутренней мембране митохондрий.



Фосфатидная кислота

*Рис. 2.1. Структурная формула фосфатидной кислоты. Следует отметить, что второй углеродный атом (C<sub>2</sub>) глицерола в молекуле фосфатидной кислоты асимметричен и имеет L-конфигурацию*

*Кардиолипин* – фосфолипид, входящий в состав митохондриальных мембран. Он образуется из двух молекул фосфатидной кислоты, которые соединены друг с другом «мостиком», представленным остатком глицерола.



Кардиолипин

*Рис. 2.2. Кардиолипин («двойной» фосфоглицерид) содержится в больших количествах в мембранах митохондрий. Символами R с соответствующими индексами обозначены углеводородные цепи разных длинноцепочечных жирных кислот*

### Фосфатидилхолин (лецитин)

*Лецитины*, как и нейтральные жиры, содержат глицерол и остатки жирных кислот, но в их состав входят также фосфорная кислота и азотистое основание – холин. Лецитины широко представлены в клетках различных тканей, они выполняют как метаболические, так и структурные

функции. Большинство данных фосфолипидов, как правило, содержит насыщенный ацильный радикал в положении С<sub>1</sub> и ненасыщенный радикал в положении С<sub>2</sub> глицерола.

При рН 7,0 остаток фосфорной кислоты в лецитинах, а также во всех других фосфолипидах несет отрицательный заряд. Кроме того, при рН, близких к нейтральным, азотистые основания в составе фосфолипидов (рис. 2.3, 2.4, 2.5, 2.6) могут нести один или несколько электрических зарядов. Таким образом, фосфолипиды содержат группировки двух разных типов: полярные гидрофильные «головки» и неполярные гидрофобные хвосты. Такие соединения называют *амфипатическими веществами*.

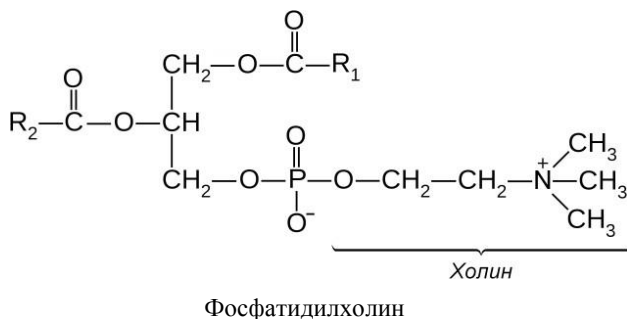


Рис. 2.3. Структурная формула наиболее распространенного фосфолипида – фосфатидилхолина

### Фосфатидилэтаноламин (кефалин)

*Кефалины* отличаются от лецитинов только тем, что у них азотистое основание холин представлено другим азотистым основанием – этаноламином.

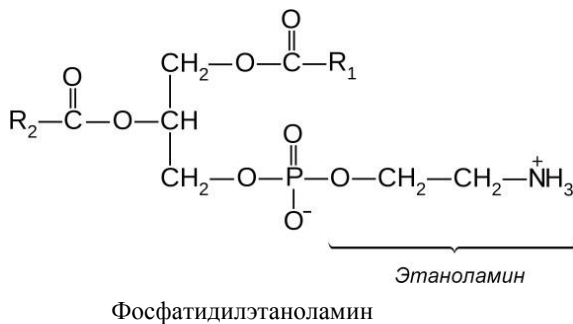
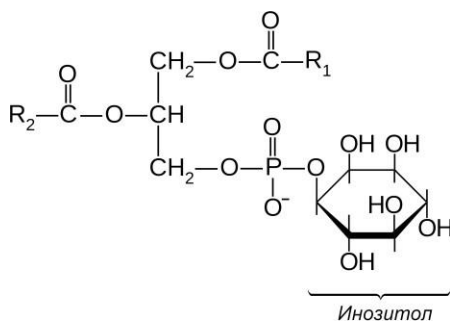


Рис. 2.4. Структурная формула фосфатидилэтанолamina

## Фосфатидилинозитол

В состав *фосфатидилинозитола*, кроме глицерола, двух остатков жирных кислот и остатка фосфорной кислоты, входит шестиатомный циклический спирт *инозитол*. Инозитол в этом соединении представлен одним из своих стереоизомеров – *миоинозитолом*. Кроме собственно фосфатидилинозитола, в клетках присутствует его фосфорилированная форма, представленная *фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатом*, который также является важным компонентом клеточных мембран. Данное соединение обладает ярко выраженными физиологическими эффектами. Таким образом, фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат принимает участие в физиологической регуляции процессов секреции, осуществляемой с помощью секретогенных соединений, которые взаимодействуют с соответствующими рецепторами на базальной стороне экзокринных клеток. Например, в результате связывания ацетилхолина или холинэстеразы со своими рецепторами на базальной стороне экзокринных клеток происходит активация внутриклеточной фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазы С, которая расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат с образованием *инозитол-1,4,5-трифосфата* и *диацилглицерола*. Последние инициируют высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума в цитозол (инозитол-1,4,5-трифосфат) или активируют протеинкиназу С (диацилглицерол), что обеспечивает выброс белковых продуктов из экзокринных клеток. Таким образом, оба этих соединения действуют как внутриклеточные вторичные мессенджеры передачи сигнала.

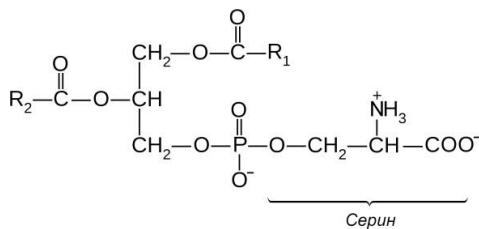


Фосфатидилинозитол

Рис. 2.5. Структурная формула фосфатидилинозитола

## Фосфатидилсерин

В тканях находится также родственный кефалину фосфолипид, содержащий вместо этаноламина остаток аминокислоты серина.

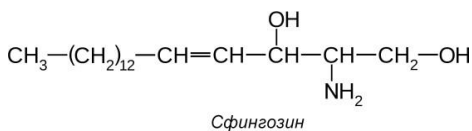


Фосфатидилсерин

Рис. 2.6. Структурная формула фосфатидилсерина

## Сфингомиелины

*Сфингомиелины* в больших количествах встречаются в нервной ткани. При гидролизе сфингомиелинов образуются жирная кислота, фосфорная кислота, холин и сложный аминоксиперт сфингозин (рис. 2.7).



В составе этих соединений глицерол отсутствует. При взаимодействии сфингозина с жирной кислотой (посредством амидной связи) образуется базовая структура сфингомиелинов, получившая название *церамида*. Церамид обнаруживается также в составе гликолипидов:

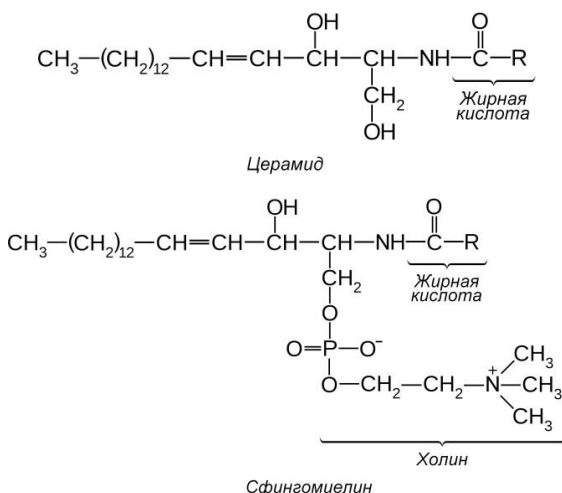


Рис. 2.7. Структурные формулы церамида и сфингомиелина

Благодаря присутствию фосфохолина в составе сфингомиелинов, последние часто относят к фосфолипидам. Однако, вследствие того, что гидрофобная часть этих молекул представлена церамидом, сфингомиелины более целесообразно считать сфинголипидами.

### Сфинголипиды (гликосфинголипиды)

*Гликолипиды* широко представлены в тканях, особенно в нервной, в частности в ткани мозга. Они локализованы преимущественно на наружной поверхности плазматических мембран, где их углеводные компоненты входят в число других *углеводов клеточной поверхности*.

Главной формой гликолипидов в животных тканях являются глико-сфинголипиды. Они построены из церамида и одного или нескольких остатков моносахаридов. На основании строения углеводного компонента гликолипидов их делят на *цереброзиды* и *ганглиозиды*. Двумя простейшими соединениями, относящимися к цереброзидам, являются *галактоцереброзид* (*галактозилцерамид*) и *глюкоцереброзид* (*глюкозилцерамид*). Как следует из названия этих гликолипидов, они включают церамид и только один углеводный остаток. Галактозилцерамид – главный гликосфинголипид мозга и других нервных тканей, в небольших количествах встречается также во многих других тканях. В его состав обычно входят различные  $C_{24}$ -жирные кислоты. Галактозилцерамид также присутствует в виде сульфопроизводного *сульфогалактозилцерамида*, который в больших количествах содержится в миелине. Простые гликосфинголипиды, входящие в состав тканей, отличных от нервной, представлены главным образом глюкозилцерамидом, хотя в небольших количествах глюкозилцерамид обнаруживается также в нервной ткани (рис. 2.8).

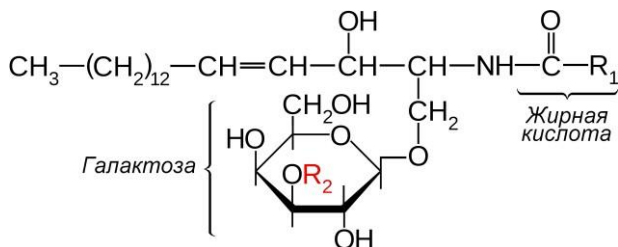


Рис. 2.8. Структура галактоцереброзида ( $R_2 = H$ ) и его сульфатида – сульфогалактоцереброзида ( $R_2 = SO_3^{2-}$ )

Более сложными гликосфинголипидами являются *ганглиозиды*, которые образуются из глюкозилцерамида посредством присоединения к нему дополнительных остатков моносахаридов. Ганглиозиды – это гликосфинголипиды, содержащие, кроме того, еще один или несколько



остатков сиаловой кислоты. В тканях человека доминирующей сиаловой кислотой является нейраминовая кислота, которая часто ацетилирована (лабораторная работа № 1). Остатки N-ацетилнейраминовой кислоты встречаются также в олигосахаридных боковых цепях некоторых мембранных гликопротеидов.

В сером веществе мозга ганглиозиды составляют около 6 % мембранных липидов. Они обнаруживаются также, хотя и в меньших количествах, в мембранах клеток других (не нервных) тканей. Например, ганглиозид  $G_{M1}$  является рецептором холерного токсина в эпителии кишечника человека. Ганглиозиды – важные компоненты расположенных на поверхности клеточных мембран специфических *рецепторных участков*. Так, они находятся в тех специфических участках нервных окончаний, где происходит связывание молекул нейромедиатора в процессе химической передачи импульса от одной нервной клетки к другой.

Наиболее простым по строению ганглиозидом, встречающимся в нервной ткани, является ганглиозид  $G_{M3}$  (аббревиатура  $G_{M3}$  означает: G – ганглиозид, M – моносиаловое соединение, индекс 3 – порядковый номер фракции, элюирующейся при хроматографическом разделении ганглиозидов). Ганглиозид  $G_{M3}$  состоит из церамида, одного остатка глюкозы, одного остатка галактозы и одного остатка нейраминовой кислоты.

Структура более сложного ганглиозида  $G_{M1}$ , образующегося из  $G_{M3}$ , показана на рис. 2.9 и на рис. 1.2. (лабораторная работа № 1).

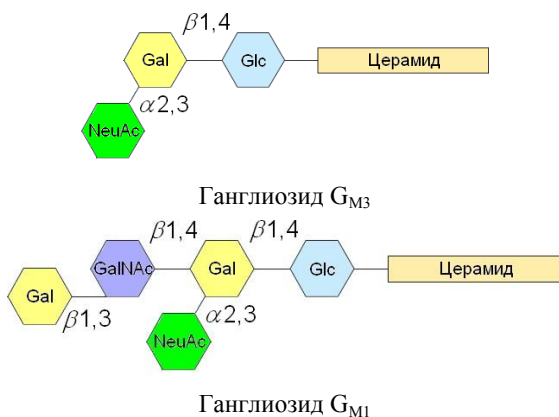


Рис. 2.9. Структура ганглиозидов  $G_{M3}$  и  $G_{M1}$

Как следует из рис. 2.9, ганглиозиды  $G_{M1}$  и  $G_{M3}$  содержат только по одному остатку N-ацетилнейраминовой кислоты. В то же время другие ганглиозиды могут содержать от одного до пяти остатков сиаловой кислоты: их называют, соответственно, моно-, ди-, трисialogанглиозиды и т. д.

## Амфипатические свойства липидов

Как известно, триацилглицеролы и воска нерастворимы в воде, поскольку состоят преимущественно из гидрофобных (углеводородных) цепей. Однако жирные кислоты (в первую очередь их соли), фосфолипиды, сфинголипиды, желчные кислоты в виде солей и, в меньшей степени, холестерол содержат, кроме гидрофобных «хвостов», полярные «гидрофильные» группы. Таким образом, одна часть их молекул *гидрофобна* (нерастворима в воде), а другая – *гидрофильна* (растворима в воде). Такие молекулы называют *амфипатическими соединениями* (рис. 2.10).

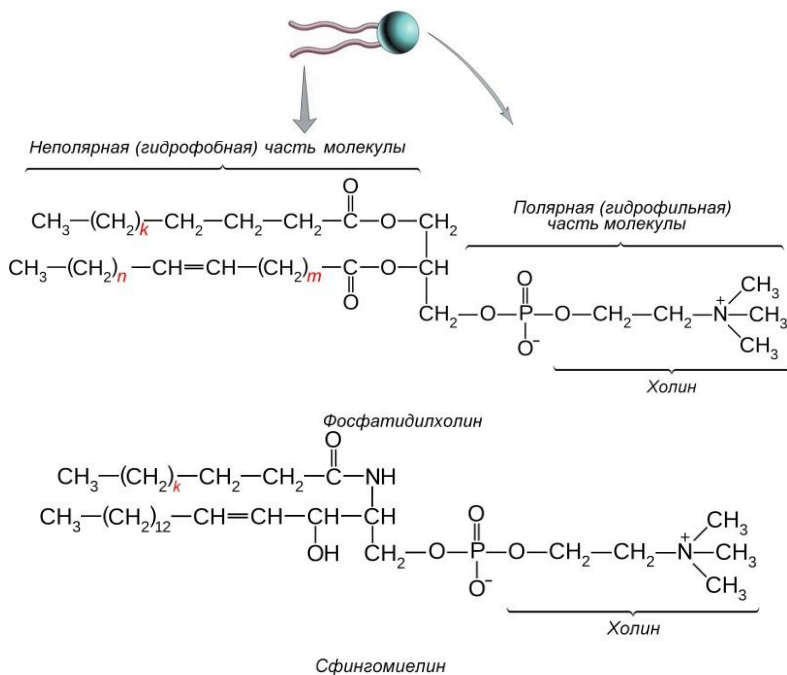
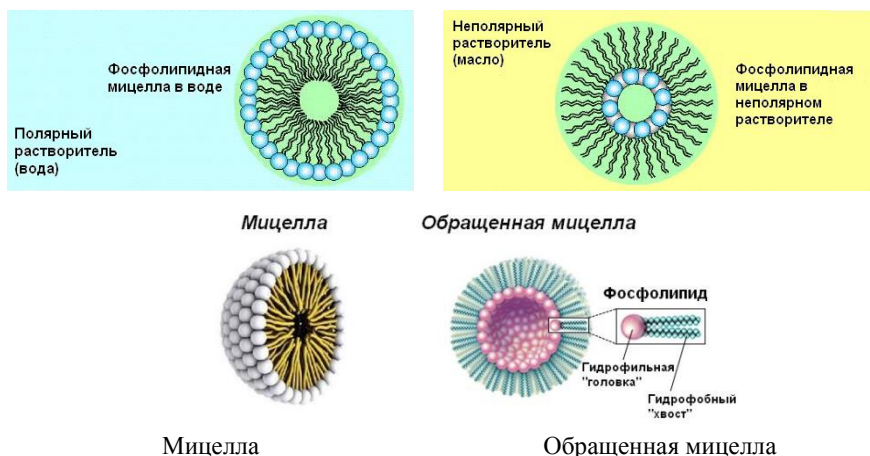


Рис. 2.10. Структура амфипатических (амфифильных) соединений фосфатидилхолина и сфингомиелина. В верхней части рисунка приводится схематическое изображение амфипатического липида, где волнистые линии обозначают два гидрофобных «хвоста», а шарик иллюстрирует гидрофильную «головку»

Представляет особый интерес поведение фосфолипидов и гликолипидов в водной среде. При смешивании амфипатических веществ с водой их молекулы спонтанно организуются таким образом, который удовлетворяет одновременно двум противоположным свойствам разных частей молекул. Они организуются так, что их гидрофильные «головки» погружаются в воду, в то время как гидрофобные «хвосты»

в контакт с водой не вступают, а контактируют только между собой, с воздухом или неполярными средами, например, маслом. Благодаря двойственной природе амфипатических соединений, в зависимости от среды, они способны образовывать разнообразные надмолекулярные структуры, к которым относятся *монослои, мицеллы, обращенные мицеллы, бислойные структуры, липосомы* и др.

При встряхивании в воде или водных растворах фосфолипиды и гликолипиды спонтанно формируют *мицеллы*, в которых углеводородные «хвосты» липидов спрятаны внутри структуры, а заряженные гидрофильные «головки» располагаются на поверхности частиц, взаимодействуя с водным окружением (рис. 2.11). С другой стороны, в неполярных растворителях фосфолипиды образуют мицеллы, в которых гидрофобные хвосты направлены наружу, а гидрофильные головки вовнутрь (обращенные мицеллы).



*Рис. 2.11. Фосфолипиды и гликолипиды способны в водной фазе спонтанно образовывать мицеллы. На рисунке приведено строение типичной мицеллы. Гидрофобные «хвосты» полярных липидов формируют внутри мицеллы неполярную область, тогда как заряженные «головки», расположенные на поверхности структуры, придают мицелле стабильность в водной среде. В неполярных растворителях у обращенных мицелл гидрофобные «хвосты» направлены наружу, а гидрофильные «головки» вовнутрь*

Фосфолипиды способны также растекаться по поверхности водной фазы, образуя слой толщиной в одну молекулу – *монослой*. В таких системах углеводородные «хвосты» обращены к воздушной среде, избегая, таким образом, контакта с водой, а гидрофильные «головки» погружены в полярную водную фазу (рис. 2.12). Соответственно, на поверхности

раздела фаз «масло–воздух» молекулы полярных липидов располагаются таким образом, чтобы полярные группы находились в воздушной среде, а неполярные гидрофобные группы – в масляной фазе.

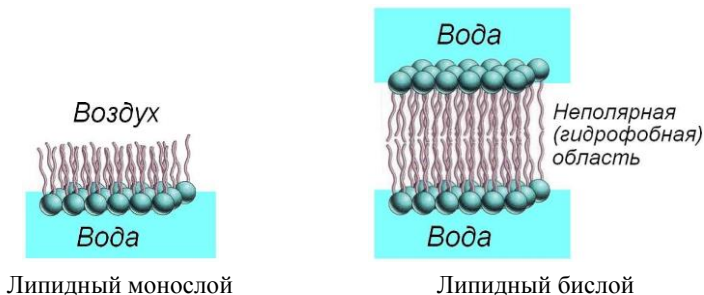
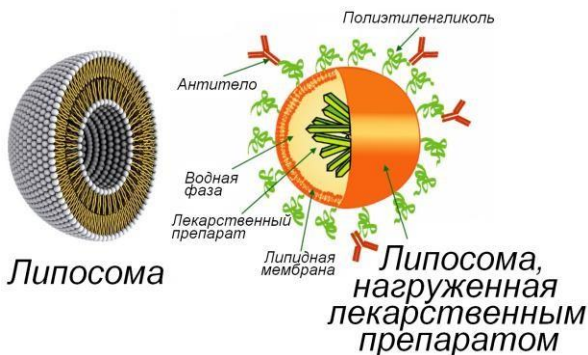


Рис. 2.12. Фосфолипиды и гликолипиды способны образовывать монослой и бислой. При образовании бислойных структур гидрофобные «хвосты» полярных липидов формируют внутреннюю неполярную область, а заряженные «головки», расположенные на каждой стороне бислоя, контактируют с водой и обеспечивают его стабилизацию в водных растворах

Возможен также способ организации полярных липидов, удовлетворяющий их амфипатическим свойствам, посредством образования бимолекулярного слоя, иначе – липидного бислоя. В действительности, в водной среде большинство фосфолипидов и гликолипидов образуют именно бислойные структуры, а не мицеллы. Такое предпочтительное образование структуры бислоев имеет огромное значение в биологии. Бислои, образованные полярными липидами, считают основой структуры биологических мембран. Действительно, размеры мицелл обычно невелики – менее 20 нм в диаметре. Бимолекулярные слои, напротив, достигают макроскопических размеров, вплоть до миллиметра ( $10^6$  нм). Именно фосфолипиды и гликолипиды являются ключевыми компонентами биологических мембран потому, что они легко образуют бимолекулярные слои. В зависимости от природы содержащихся в них жирных кислот липидные бислои имеют толщину от 6 до 7 нм. Важным является и то, что эти бислои, несмотря на жидкое состояние, могут выполнять функцию барьеров проницаемости.

В лабораторных условиях такие бислойные структуры несложно получить либо путем сильного встряхивания водных суспензий фосфолипидов, либо их обработкой ультразвуком; при этом образуются особые структуры – *липосомы* – замкнутые везикулы, окруженные непрерывным липидным бислоем. В настоящее время липосомы служат предметом интенсивных исследований, поскольку по своим свойствам они очень сходны с природными мембранами. Кроме того, липосомы

находят применение в медицинской практике, особенно при использовании их в комбинации с тканеспецифичными антителами:



Липосомы могут служить переносчиками лекарств к определенным органам. Например, при введении в кровоток липосомы захватываются клетками ретикулоэндотелиальной системы, локализованными главным образом в костном мозге и селезенке. Указанное обстоятельство позволяет использовать липосомы для доставки специфических лекарственных средств в ретикулоэндотелиальную систему и, таким образом, направленно воздействовать именно на эту ткань. С этой целью липосомы «нагружают» раствором лекарственного препарата и затем вводят в кровь. В экспериментах на животных было показано, что использование липосом в качестве переносчиков лекарств значительно снижает токсичность препаратов и увеличивает их эффективность.

При определенных условиях липосомы могут сливаться с плазматическими мембранами клеток. Это позволяет в экспериментальных условиях изменять липидный состав клеточных мембран и изучать значение таких изменений.

## Физико-химические свойства фосфолипидов

### Принципы методов

#### 1. Осаждение фосфолипидов ацетоном

Фосфолипиды, являясь амфипатическими соединениями, плохо растворимы во многих органических растворителях, например, в ацетоне.

#### 2. Эмульгирование фосфолипидов

Эмульгирование фосфолипидов обусловлено их способностью образовывать в водном растворе мицеллы и другие структуры.

#### 3. Осаждение лецитина (фосфатидилхолина) хлористым кадмием

При добавлении хлористого кадмия к спиртовому раствору фосфатидилхолина последний выпадает в виде белого хлопьевидного осадка, так как образуется комплексное соединение фосфолипида с хлористым

кадмием, в котором на 3 молекулы фосфатидилхолина приходится 4 молекулы соли. Данное соединение плохо растворимо в воде.

#### **4. Определение состава фосфатидилхолина**

##### ***Идентификация холина***

При кипячении лецитина в растворе гидроксида натрия ощущается запах селедочного рассола, характерный для триметиламина ( $N[CH_3]_3$ ), который образуется из холина при нагревании. Триметиламин обнаруживается также по посинению (щелочная реакция) влажной лакмусовой бумажки, если ее подержать над кипящим раствором.

##### ***Идентификация жирных кислот***

Натриевые соли жирных кислот (растворимы в воде) в кислой среде, например, при подкислении ее соляной кислотой, переходят в свободные жирные кислоты (не растворимые в воде), всплывающие на поверхность раствора.

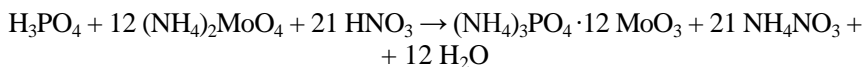
##### ***Идентификация глицерина***

Используется акролеиновая проба, уже рассмотренная в предыдущей лабораторной работе.

##### ***Идентификация фосфора***

Обнаружение фосфорной кислоты в фосфолипидах можно осуществить с использованием молибдата аммония или магнезиальной смеси.

1. Фосфорная кислота образует с молибденовым реактивом желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония:



2. Реакция с магнезиальной смесью основана на образовании кристаллического осадка фосфата магний-аммония  $MgNH_4PO_4$  в ходе двух последовательных реакций: образования фосфата аммония (при подкислении образца аммиаком) и взаимодействия данной соли со смесью хлорида магния и хлорида аммония.

##### ***Контрольные вопросы***

1. Строение и свойства глицерофосфолипидов. Фосфатидная кислота.

2. Строение и свойства фосфатидилхолина (лецитина) и фосфатидилэтаноламина (кефалина).

3. Строение и свойства фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола и кардиолипина. Лизофосфолипиды.

4. Строение и свойства сфингофосфолипидов. Сфингомиелины. Сфингозин и дигидросфингозин. Церамиды.

5. Строение и свойства гликолипидов. Биологическая роль гликолипидов.

6. Строение и свойства цереброзидов и сульфатидов.
7. Строение и свойства ганглиозидов
8. Определение состава и свойств фосфолипидов.
9. Опыт по выделению лецитина из яичного желтка.

### **Литература**

1. *Рогожин В. В.* Практикум по биохимии. – Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2013.
2. *Чернов Н. Н., Березов Т. Т., Буровина С. С.* Биохимия: руководство к практическим занятиям. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2009.
3. *Пустовалова Л. М.* Практические работы по биохимии. – Ростов на Дону: «Феникс», 2004.
4. *Чиркин А. А.* Практикум по биохимии. – Минск: «Новое знание», 2002.
5. *Нельсон Д., Кокс М.* Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. – М.: «Бином», 2014.
6. *Чиркин А. А., Данченко Е. О.* Биохимия. – М.: «Медицинская литература», 2010.
7. *Северин Е. С., Алейникова Т. Л., Осипов Е. В. и др.* Биологическая химия. – М.: «Медицинское информационное агентство», 2008.
8. *Кольман Я., Рем К.-Г.* Наглядная биохимия. – М.: «Мир», 2000.
9. *Долгов В. В., Ованесов Е. Н., Щетникович К. А.* Фотометрия в лабораторной практике. – М.: «Витал Диагностика СПб», 2004.

## **ХОД РАБОТЫ**

### **ФОСФОЛИПИДЫ**

#### **Выделение фосфатидилхолина**

##### ***Выделение лецитина (фосфатидилхолина) из яичного желтка***

1. Желток вареного яйца тщательно растирают в ступке с добавлением 40 мл эфира.

***Примечание.*** *Осторожно! Следует проверить отсутствие в кабинете работающих горелок и других источников открытого пламени.*

2. Полученный экстракт фильтруют с использованием складчатого фильтра.

3. Для полноты экстракции остаток желтка в ступке дважды промывают порциями эфира по 5 мл, сливая их на фильтр.

4. Фильтрат переносят в фарфоровую чашку и выпаривают досуха на водяной бане.

***Примечание.*** *Осторожно! Следует работать в вытяжном шкафу. Горелку не использовать.*

5. Полученный сухой остаток, содержащий смесь фосфолипидов и жиров, тщательно обрабатывают дважды кипящим этиловым спиртом отдельными порциями по 8 мл.

6. Спиртовые вытяжки охлаждают и фильтруют через сухой фильтр в фарфоровую чашку для отделения жиров. Триацилглицеролы, в отличие от лецитина, плохо растворяются в холодном этиловом спирте.

***Примечание.** Фильтрат должен быть прозрачным.*

7. Аликвоту прозрачного фильтрата в объеме 2 мл переносят в отдельную пробирку.

8. Этиловый спирт из оставшегося фильтрата выпаривают на водяной бане и получают «сырой» (неочищенный) лецитин.

9. Полученные таким образом препарат лецитина (п. 8) и его спиртовой раствор (п. 7) используют в дальнейших опытах.

### **Физико-химические свойства фосфолипидов**

#### ***Осаждение фосфолипидов ацетоном***

1. Третью часть полученного лецитина (по массе) снова растворяют в 3 мл эфира.

2. К полученному раствору при помешивании добавляют 10 мл ацетона.

3. После осаждения лецитина ацетоном надосадочную жидкость осторожно сливают.

4. Взвесь осадка лецитина в количестве 3 капель переносят на предметное стекло, дают ацетону испариться, наносят в то же место еще 3 капли и после испарения ацетона добавляют каплю воды.

5. С помощью микроскопа наблюдают образование на покровном стекле «миелиновых» фигур в виде длинных закрученных нитей с утолщениями на концах.

6. Объясняют полученный результат и делают выводы.

#### ***Эмульгирование фосфолипидов***

1. К 2 мл спиртового раствора лецитина добавляют по каплям воду и смесь сильно встряхивают.

2. Объясняют полученный результат и делают выводы.

#### ***Осаждение лецитина (фосфатидилхолина) хлористым кадмием***

1. К 2 мл спиртового раствора лецитина добавляют 1 мл насыщенного спиртового раствора хлористого кадмия и смесь сильно встряхивают.

2. Объясняют полученный результат и делают выводы.



## Изучение химического состава фосфолипидов

### *Гидролиз фосфолипидов (лецитина)*

1. Остаток лецитина переносят в пробирку и добавляют 5 мл 10 % раствора гидроксида натрия.
2. Лецитин гидролизуют (получая смесь холина, жирных кислот, глицерина и фосфорной кислоты) кипячением в течение 10 мин.

### *Обнаружение холина*

1. Отмечают появление запаха селедочного рассола при гидролизе лецитина.
2. Отмечают изменение цвета влажной лакмусовой бумажки, если ее подержать над кипящей смесью.
3. Объясняют полученный результат и делают выводы.

### *Обнаружение жирных кислот*

1. В гидролизат фосфатидилхолина вносят 10 % раствор соляной кислоты до покраснения лакмусовой бумажки (кислая среда).
2. Всплывшие на поверхность жирные кислоты отфильтровывают (фильтрат используют в следующем опыте).
3. Объясняют полученный результат и делают выводы.

### *Обнаружение глицерина*

1. К фильтрату (см. предыдущую стадию) по каплям добавляют 10 % раствор гидроксида натрия до нейтральной по лакмусу реакции.
2. Затем фильтрат выпаривают досуха на водяной бане.
3. Присутствие в остатке (берут 1/3 остатка по массе) глицерина определяют с использованием акролеиновой пробы (лабораторная работа № 1).
4. Объясняют полученный результат и делают выводы.

### *Открытие фосфора*

Приготовление образца:

1. Оставшуюся часть сухого остатка, полученного на предыдущей стадии эксперимента, переносят в фарфоровый тигель и тщательно смешивают с трехкратным количеством смеси, содержащей 2 части карбоната натрия и 1 часть нитрата калия.
2. Тигель прикрывают крышкой и осторожно нагревают.

**Примечание.** *Осторожно! Реакция идет бурно, иногда сопровождается небольшой вспышкой!*

3. Полученный сплав осторожно прокаливают до полного окисления. После этого тигель охлаждают.

4. Полученную серовато-бурую золу растворяют в 10 % растворе азотной кислоты (кислоту добавляют по каплям, растирая золу стеклянной палочкой).

5. С полученным раствором проводят реакции на обнаружение фосфорной кислоты.

#### ***Обнаружение фосфорной кислоты с молибдатом аммония***

1. К 2 мл молибденового реактива (раствора молибдата аммония в азотной кислоте) добавляют 1 мл анализируемого раствора.

2. Смесь нагревают до кипения и кипятят 2–3 мин.

3. Записывают и объясняют результаты.

#### ***Обнаружение фосфорной кислоты с магниезальной смесью***

1. К 1 мл анализируемого раствора постепенно добавляют концентрированный раствор аммиака до появления резкого запаха.

2. Затем приливают равный объем магниезальной смеси.

3. Растирают стеклянной палочкой.

4. Записывают и объясняют результаты.

#### **Оформление работы**

*К занятию:*

Кратко законспектировать теоретические данные по лабораторной работе.

*Во время занятия:*

1. Описать этапы работы.

2. Описать результаты.

3. Сделать выводы.

### *Лабораторная работа № 3*

#### **Выделение нуклеопротеидов. Качественные реакции на присутствие компонентов нуклеопротеидов в растворе. Количественное определение нуклеиновых кислот**

**Цель работы:** изучение и применение методов идентификации и количественного определения нуклеиновых кислот в биологических препаратах.

#### **Оборудование и материалы:**

- спектрофотометр SOLAR PV 1251;
- кюветы полистирольные;
- центрифуга К-24;
- весы центрифужные;
- пробирки центрифужные;
- водяная баня;
- плитка электрическая;
- колба круглодонная с обратным холодильником;
- ступка с пестиком;
- воронка стеклянная для фильтрации;
- пипетки стеклянные на 1 мл и 5 мл;
- микропипетки автоматические;
- пробирки химические;
- штативы для пробирок;
- цилиндры мерные на 50–250 мл;
- стеклянные палочки;
- фильтр бумажный.

#### **Реактивы:**

- дрожжи;
- эфир;
- песок;
- NaOH, 0,4 % и 10 % растворы;
- CH<sub>3</sub>COOH, 5 % раствор; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (конц.);
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 % раствор;
- CuSO<sub>4</sub>, 2 % раствор;
- NH<sub>4</sub>OH (конц.);
- Ag<sub>2</sub>O, 1 % раствор в NH<sub>4</sub>OH;
- тимол, 1 % спиртовой раствор;
- молибденовый реактив – молибдат аммония ([NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>), 15 %

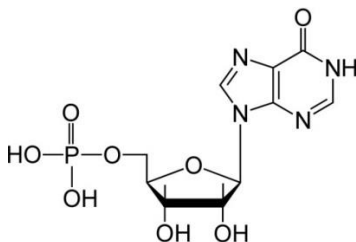
раствор/ $\text{HNO}_3$  (конц.) в соотношении 110/90;

- реагенты для орцинового метода:  
*раствор А.* Орцин, 1 % раствор;  
*раствор Б.*  $\text{HCl}$  (конц.);  
*раствор В.*  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 % раствор.
- дифениламиноновый реагент:  
дифениламин, 1,5 % раствор в  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (конц.);  
 $\text{CH}_3\text{CHO}$ ;
- $\text{HClO}_4$  (конц.);
- РНК, стандартный раствор (100 г/мл);
- ДНК, стандартный раствор (50 г/мл);
- вода дистиллированная.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты в той или иной степени были известны исследователям достаточно давно. Так, в 1847 г. немецкий химик Ю. Либих впервые выделил из мясного экстракта *инозиновую кислоту* (*монофосфорный эфир* нуклеозида *инозина*).



*Инозиновая кислота*

В 1869 г. швейцарский врач Ф. Мишер, исследуя химический состав ядер лейкоцитов, выделил из них вещество, обладавшее кислотными свойствами, которое он назвал *нуклеином*. Это событие расценивают, как открытие нуклеиновых кислот, хотя сам термин – «*нуклеиновая кислота*» был введен 30 лет спустя, в 1899 г. Немного ранее, в 1891 г. немецкий биохимик Альбрехт Кёссель осуществил и описал гидролиз нуклеиновой кислоты, а также показал, что она состоит из остатков сахара, фосфорной кислоты и четырех гетероциклических оснований, являющихся производными пурина и пиримидина. Он же впервые доказал существование двух типов нуклеиновых кислот.

С начала XX в. началось интенсивное изучение продуктов расщепления нуклеиновых кислот. Большой вклад в химию пуринов и пиримидинов внес химик-органик Э. Фишер, а позднее в работах Ф. Левена и Д. Гулланда было дано описание строения углеводных компонентов и определена природа нуклеозидных звеньев в составе нуклеиновых кислот. Используемые и в настоящее время термины *нуклеозид* и *нуклеотид* были предложены Ф. Левеном еще в 1908–1909 гг. Окончательно химическое строение *нуклеозидов* и *нуклеотидов*, а также роль *фосфодиэфирной связи* в полимеризации мономерных звеньев нуклеиновых кислот были выяснены в 1952 г. английскими исследователями под руководством А. Тодда.

После открытия того факта, что нуклеиновые кислоты являются полимерами, состоящими из нуклеотидов четырех типов, с конца 30-х гг. XX в. утвердилось мнение, что полимер нуклеиновой кислоты представляет собой многократно повторяющиеся *тетрануклеотиды*, состоящие из всех четырех азотистых оснований. Эта теория, сформулированная Ф. Левеном, была опровергнута в 1950 г. Эрвином Чаргаффом с сотрудниками из Колумбийского университета. Чаргафф установил значительные различия в нуклеотидном составе ДНК из разных источников и сформулировал основные положения, характеризующие состав нуклеиновых кислот, которые получили название *правил Чаргаффа*.

Вершиной исследований строения нуклеиновых кислот явилась модель двойной спирали ДНК, предложенная в 1953 г. американским биохимиком и генетиком Дж. Уотсоном и английским физиком Ф. Криком. Эта дата официально считается моментом рождения новой отрасли биологической науки – молекулярной биологии. На основании модели ДНК была выдвинута гипотеза *полуконсервативного способа репликации* данной молекулы, которая была подтверждена в 1957 г. после открытия Артуром Корнбергом фермента *ДНК-полимеразы*.

Начало работам, приведшим к выяснению биологической роли РНК, было положено в 30-е гг. Т. Касперсоном и Ж. Браше, которые изучали содержание и распределение в клетке нуклеиновых кислот и, в первую очередь, РНК. Значительно позже (в 50-х гг.) было показано, что синтез белка осуществляется *рибосомами*, но представления о существовании *РНК-посредника* (иРНК), переносящего информацию от ДНК к рибосомам были сформулированы французскими генетиками Ф. Жакобом и Ж. Моно только в 1961 г. Главный фермент транскрипции – *ДНК-зависимая-РНК-полимераза* был открыт в 1960 г. С. Вейсом, Ж. Гурвицем и О. Стивенсом.

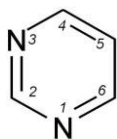
Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) являются важнейшими информационными макромолекулами клетки, которые, с химической точки зрения, представляют собой полимеры, построенные из многих

тысяч и даже миллионов *нуклеотидов*, соединенных между собой 3'-5'-фосфодиэфирными связями. В зависимости от вида нуклеиновой кислоты, различают *дезоксирибонуклеотиды* (содержат 2'-дезоксид-рибозу и входят в состав ДНК) и *рибонуклеотиды* (содержат *D*-рибозу и входят в состав РНК). Кроме того, в зависимости от химической природы азотистых оснований (*пуриновых* или *пиримидиновых*), входящих в состав *нуклеотидов*, их подразделяют на *пуриновые* и *пиримидиновые* нуклеотиды соответственно. Следует иметь в виду, что биологическая роль нуклеотидов не ограничивается их участием в качестве мономеров в процессах биосинтеза ДНК и РНК. В частности, *пуриновые рибонуклеотиды* выполняют функции универсальных источников энергии (например, АТФ и GTP), сигнальных молекул (сAMP, сGMP), они входят в состав важнейших коферментов (FAD, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>) и служат переносчиками метильных групп (S- аденозилметионин); *пиримидиновые нуклеотиды* функционируют в качестве макроэргических интермедиатов в углеводном обмене (UDP-глюкоза, UDP- галактоза) и в синтезе липидов (CDP-ацилглицерол).

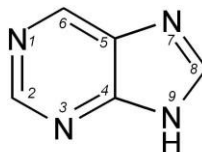
## Компоненты нуклеиновых кислот

### Структура пиримидиновых и пуриновых оснований

*Пиримидиновые* и *пуриновые азотистые основания*, входящие в состав нуклеотидов, с одной стороны, представляют собой замещенные производные шестичленного гетероцикла – *пиримидина*, а с другой – *пурина* – сложной гетероциклической системы, состоящей из двух конденсированных гетероциклов: пиримидина и имидазола (рис. 3.1).



Пиримидин



Пурин

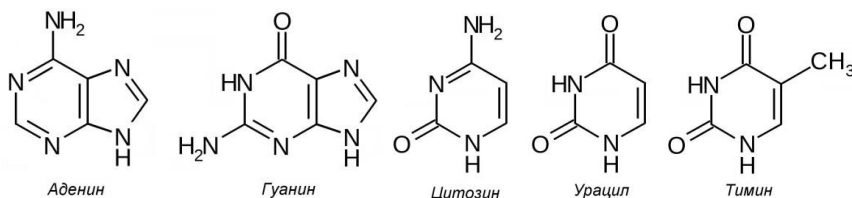
Рис. 3.1. Структурные формулы пиримидина и пурина

Положения атомов в ароматических кольцах имеют нумерацию в соответствии с номенклатурой, принятой Международным союзом теоретической и прикладной химии (International Union of Pure and Applied Chemistry – *IUPAC*) и Международным союзом биохимии и молекулярной биологии (International Union of Biochemistry and Molecular Biology – *IUBMB*). Следует обратить внимание на то, что нумерация в пиримидиновом и пуриновом кольцах идет в противополож-

ных направлениях, при этом атом углерода C5 в обеих молекулах находится в одном и том же положении.

### Азотистые основания нуклеиновых кислот

Пиримидиновые основания как у прокариот, так и у эукариот представлены *цитозином* (Cyt), *урацилом* (Ura) и *тимином* (Thy), структурные формулы которых приведены на рис. 3.2. Пуриновые основания представлены *аденином* (Ade) и *гуанином* (Gua). ДНК содержит два пиримидиновых основания – цитозин и тимин и два пуриновых основания – аденин и гуанин. В состав РНК также входят два пурина – аденин и гуанин и два пиримидина – цитозин и урацил.



Пуриновые азотистые основания

Пиримидиновые азотистые основания

Рис. 3.2. Структурные формулы пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот

Кроме аденина и гуанина, известны два других пуриновых основания – гипоксантин (Hyp) и ксантин (Xan), которые выступают в роли интермедиатов в процессах метаболизма пуринов, в частности, гипоксантин и ксантин являются продуктами *окислительного дезаминирования* аденина и гуанина соответственно. Гипоксантин выполняет важную функцию в качестве одного из оснований входящих в состав антикодонов ряда транспортных РНК (рис. 3.3). У человека в роли конечного продукта катаболизма пуринов выступает окисленное пуриновое основание – мочевая кислота (UA).

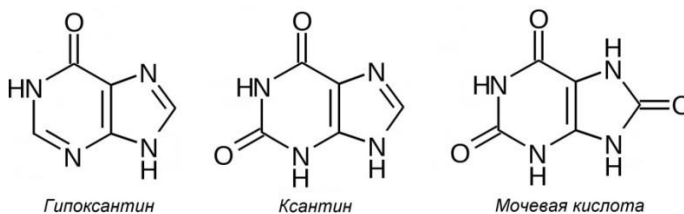


Рис. 3.3. Структурные формулы минорных пуриновых оснований

## Физико-химические свойства пуриновых и пиримидиновых оснований

### Явление таутомерии

Благодаря феномену кетоенольной таутомерии азотистые основания в нуклеотидах могут существовать либо в лактимной, либо в лактамной формах. В физиологических условиях преобладает лактамная форма гуанина тимина и урацила, но лактимные формы аденина и цитозина.

Для осуществления специфического спаривания основания должны находиться в соответствующей таутомерной форме. Миграция водородного атома позволяет каждому основанию существовать в различных *таутомерных формах*. Основания, в составе двойной спирали ДНК, образующие *канонические пары*, должны иметь amino-группы ( $-NH_2$ ) и кето-группы ( $>C=O$ ) в отличие от *таутомеров*, имеющих имино-группы ( $=NH$ ) и енольные группы ( $-OH$ ) и способных к *неканоническому спариванию*, как, например, пуриновое основание Ade, который может образовать пару с таутомерной имино-формой Cyt (рис. 3.4).

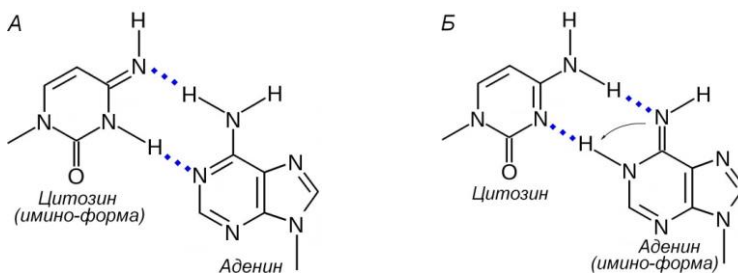


Рис. 3.4. Образование неканонических пар с участием аденина и имино-формы цитозина (А) и нормального цитозина с имино-формой аденина (Б)

Как известно, точность копирования в процессе репликации ДНК настолько велика, что в среднем на каждые  $1 \cdot 10^9$  пар нуклеотидов приходится всего одна ошибка. Такую высокую точность репликации обеспечивает корректирующая ( $3' \rightarrow 5'$ )-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы. Тем не менее, в ряде случаев ДНК-полимераза может ошибаться. Как раз одной из причин таких ошибок является способность всех азотистых оснований образовывать термодинамически невыгодные таутомерные формы за счет миграции атома водорода. При этом, как указывалось выше, amino- и оксогруппы превращаются в имино- и енольные группы соответственно. Такие редкие таутомерные формы, как правило, образуют неправильные, неканонические пары с другими основаниями. Примеры такого спаривания показаны на рис. 3.4.



Так, *имино-форма* Сyt образует пару не с Gua, а с Ade. Таким образом, в процессе последующей репликации, может произойти замена пары А-Т на G-С. Точно также Ade способен образовывать редкую таутомерную имино- форму, которая приобретает способность комплементарно спариваться с неканоническим для него Сyt.

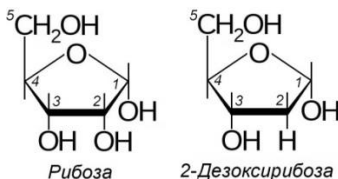
В норме образование пар между двумя пуринами, двумя пиримидинами или некомплементарными основаниями А-С или G-Т стерически затруднено, поскольку при этом не могут образовываться подходящие водородные связи и, следовательно, нарушается геометрия спирали. Модифицированные пурины и пиримидины, с небольшой частотой встречающиеся в ДНК, образуют такие же водородные связи, что и их немодифицированные аналоги. В этом случае правила спаривания не нарушаются.

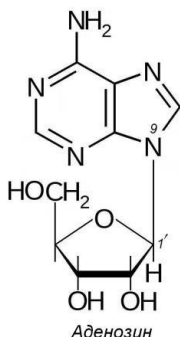
### Растворимость азотистых оснований

При значениях рН, близких к нейтральным, наименьшей растворимостью в водной среде обладает гуанин. Следующим в этом ряду стоит ксантин. Мочевая кислота в форме уратов сравнительно неплохо растворяется при нейтральном рН, но очень плохо растворима в жидкостях с более низкими значениями рН, например, в моче. Гуанин в моче человека в норме отсутствует, а ксантин и мочевая кислота являются ее обычными компонентами. Последние два пурина часто входят в состав камней мочевого тракта.

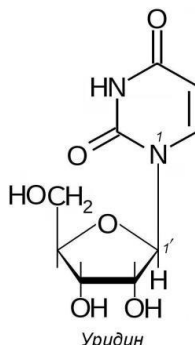
### Нуклеозиды и нуклеотиды

Свободные основания значительно менее распространены в природе, чем соответствующие *нуклеозиды* и *нуклеотиды* (рис. 3.5). Молекулы *нуклеозидов*, являющиеся β-N-гликозидами пуринов, пиримидинов и пентоз построены из пуриновых или пиримидиновых оснований, к которым, соответственно, по N9- или N1-положению β-N-гликозидной связью присоединена соответствующая пентоза (D-рибоза или 2'-дезоксид-рибоза).





Пуриновый нуклеозид



Пиримидиновый нуклеозид

Рис. 3.5. Структурные формулы пуринового (аденозина) и пиримидинового (уридина) нуклеозидов. Природные нуклеозиды являются  $\beta$ -аномерами, в которых азотские основания присоединяются к углеводам  $\beta$ -N-гликозидными связями, причем в образовании этой связи принимают участие N9 атом пурина или N1 атом пиримидина и в любом случае 1' атом D-рибозы или 2'-дезоксид-рибозы

Таким образом, адениновый рибонуклеозид (аденозин, Ado) состоит из аденина и D-рибозы, присоединенной по N9 атому пуринового цикла; гуанозин (Guo) – из гуанина и D-рибозы также в положении N9 пуринового цикла; цитидин (Cyd) состоит из цитозина и рибозы, присоединенной по N1 атому пиримидинового цикла, а уридин (Urd) построен из урацила и рибозы в положении N1 пиримидина.

В состав 2'-дезоксирибонуклеозидов также входят пуриновые или пиримидиновые основания, но углеводный фрагмент представлен 2'-дезоксирибозой, присоединенной по тем же атомам N9 и N1 в пуринах и пиримидинах соответственно. Итак, присоединение рибозы или 2'-дезоксирибозы к кольцевой структуре основания происходит за счет относительно кислотолабильной N-гликозидной связи.

Нуклеотиды (нуклеозидфосфаты) представляют собой сложные эфиры нуклеозидов и фосфорных кислот. Фосфатные остатки в нуклеотидах обычно образуют сложноэфирные связи с 2'-, 3'- или 5'-гидроксильными группами рибонуклеозидов, в случае 2'-дезоксинуклеозидов этерифицируются 3'- или 5' гидроксильные группы. Так, аденозинмонофосфат (АМФ или адениловая кислота) построен из аденина, рибозы и остатка фосфорной кислоты, образующей сложноэфирную связь с 5'-гидроксильной группой рибозы. 2'-деоксиаденозинмонофосфат (dАМФ или дезоксиадениловая кислота) представляет собой молекулу, состоящую из аденина, 2'-дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты также этерифицирующей 5'-гидроксильную группу, но 2'-дезоксирибозы. Обычно

к урацилу присоединена рибоза, а к тимину – 2'-дезоксирибоза. Таким образом, *тимидиловая кислота* (TMP) состоит из тимина, 2'-дезоксирибозы и фосфата, а в состав *уридиловой кислоты* (UMP) входят урацил, рибоза и фосфат.

Молекулы ДНК представляют собой полимеры тимидиловой, 2'-дезокситидиловой, 2'-дезоксадениловой и 2'-дезоксигуаниловой кислот. В то же время РНК образуется в результате полимеризации уридиловой, цитидиловой, адениловой и гуаниловой кислот.

### Номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов

Положение фосфатной группы в молекуле нуклеотида указывается цифрой. Например, аденозин с фосфатной группой, присоединенной сложноэфирной связью к 3-му атому углерода рибозы, обозначается как 3'-монофосфат. Штрих после цифры ставят для того, чтобы отличать номер углерода в пуриновом или пиримидиновом основании от положения атома углерода в углеводном остатке. При нумерации атомов углерода в азотистых основаниях штрих не ставится. Нуклеотид, состоящий из 2'-дезоксаденозина (dAdo) с фосфатным остатком по С5 атому в молекуле сахара, обозначается как 2'-дезоксаденозин-5'-монофосфат.

Нуклеозиды, содержащие аденин, гуанин, цитозин, тимин и урацил, принято обозначать буквами А, G, C, T, U или общепринятыми аббревиатурами Ado (dAdo), Guo (dGuo), Cyd (dCyd), Thd, Urd соответственно.

Таблица 3.1

Номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов риборяда

| Азотистое основание | Нуклеозид      | Нуклеотиды  |
|---------------------|----------------|---|
| Аденин (Ade)        | Аденозин (Ado) | Аденозинмонофосфат (AMP)<br>Аденозиндифосфат (ADP)<br>Аденозинтрифосфат (ATP) |
| Гуанин (Gua)        | Гуанозин (Guo) | Гуанозинмонофосфат (GMP)<br>Гуанозиндифосфат (GDP)<br>Гуанозинтрифосфат (GTP) |
| Цитозин (Cyt)       | Цитидин (Cyd)  | Цитидинмонофосфат (CMP)<br>Цитидиндифосфат (CDP)<br>Цитидинтрифосфат (CTP)    |
| Урацил (Ura)        | Уридин (Urd)   | Уридинмонофосфат (UMP)<br>Уридиндифосфат (UDP)<br>Уридинтрифосфат (UTP)       |

В табл. 3.1 приведены примеры только *рибонуклеозидов* и *рибонуклеотидов*. Наличие символа «d» перед соответствующей аббревиатурой нуклеозида или нуклеотида означает, что углеводным компонентом данного компонента нуклеиновых кислот является 2'-дезоксирибоза. Напри-

мер, гуанозин, содержащий 2'-дезоксирибозу, обозначается как dG (dGuo, дезоксигуанозин), а соответствующий ему монофосфат с фосфатной группой, присоединенной к пятому атому углерода дезоксирибозы, – 2'-дезоксигуанозин-5'- монофосфат (dGMP). Часто в тех случаях, когда фосфат присоединен к C5 атому рибозы или 2'-дезоксирибозы, символ «5'» опускается. Так, гуанозин 5'-монофосфат принято обозначать GMP, а 5'-монофосфат дезоксигуанозина сокращают – dGMP. Если к углеводному остатку нуклеозида присоединены 2 или 3 остатка фосфорной кислоты, используются аббревиатуры DP (дифосфат) и TP (трифосфат). Таким образом, аденозин с тремя фосфатными группами в 5'-положении углевода будет обозначаться как АТР. Примеры моно-, ди-, и трифосфатов Ado и Urd приведены на рис. 3.6.

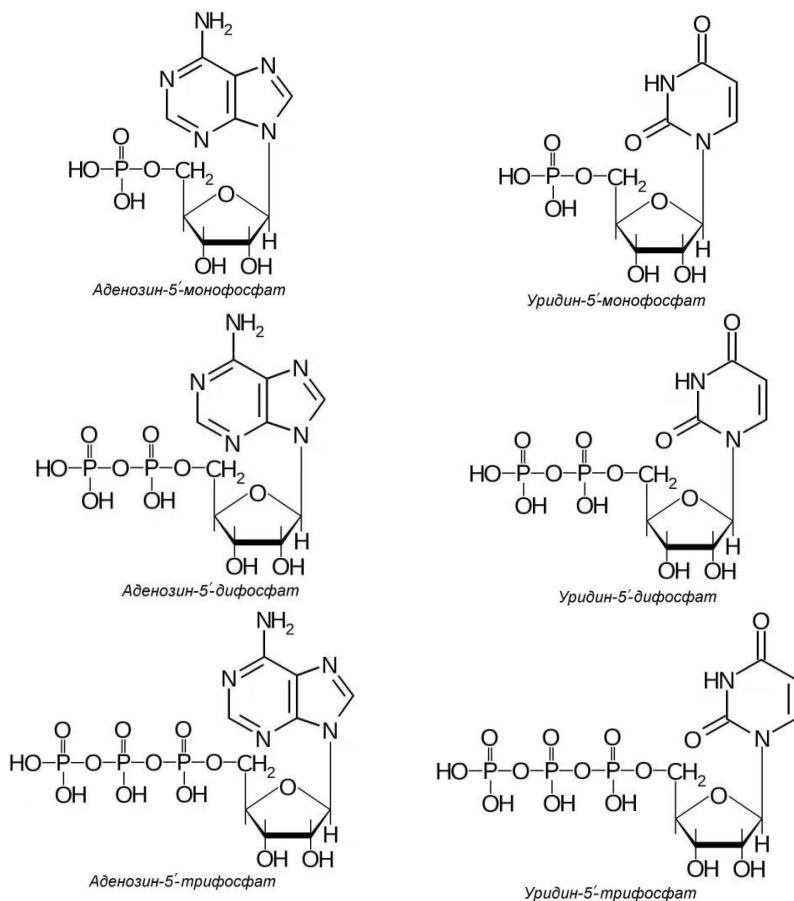


Рис. 3.6. Структурные формулы моно-, ди-, и трифосфатов аденозина и уридина

## Структура и информационные свойства нуклеиновых кислот

### Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)

К числу важнейших научных событий второй половины XX в. следует отнести открытие того факта, что генетическая информация кодируется полимерной молекулой ДНК, образованной лишь четырьмя типами мономерных единиц. Именно ДНК служит химической основой наследственности. Молекула ДНК содержит в своей структуре множество генов. Гены функционируют не автономно: их репликация и транскрипция строго контролируются по принципу обратной связи, в которой ключевую роль играют продукты экспрессии. Знание структуры и функции нуклеиновых кислот необходимо для понимания сути генетических процессов, происходящих в клетке.

При рассмотрении структуры ДНК принято различать четыре уровня организации этой макромолекулы: *первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры*. Под *первичной структурой* ДНК (как и любой другой нуклеиновой кислоты) понимают последовательность нуклеотидов в полинуклеотидных цепях.

*Вторичная структура*, согласно модели Уотсона и Крика, предложенной в 1953 г., – это двойная спираль ДНК, состоящая из двух правозакрученных вокруг общей оси полинуклеотидных цепей. Уотсон и Крик предположили, что две полинуклеотидные цепи в молекуле ДНК не связаны ковалентно, а соединяются водородными связями, возникающими между азотистыми основаниями, направленными внутрь двойной спирали.

Реакции взаимодействия G с C и A с T получили название *спаривания оснований*, а основания, способные образовывать пары, получили название *комплементарных*.

Согласно модели двойной спирали, две полинуклеотидные цепи в молекуле ДНК – *антипараллельны*: идут в противоположных направлениях. Поэтому, рассматривая спираль вдоль оси, можно видеть, что одна цепь идет в направлении  $5' \rightarrow 3'$ , а другая – в направлении  $3' \rightarrow 5'$  (рис. 3.7).

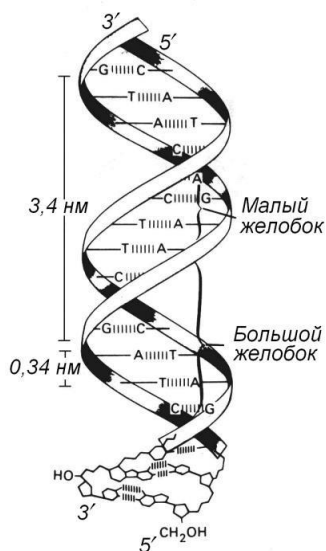


Рис. 3.7. Модель двойной спирали ДНК

Вдоль спирали основания уложены стопками друг на друга и стабилизация спиральной структуры дополнительно обеспечивается межплоскостными взаимодействиями между ароматическими кольцами соседних оснований. Эти специфические контакты получили название *стэкинг-взаимодействий*, которые являются результатом реализации *вандерваальсовых сил*, с одной стороны, возникающих за счет перекрытия  $\pi$ -облаков над и под двойными связями ненасыщенных колец пуринов и пиримидинов, а с другой – *гидрофобных взаимодействий*.

Две соседние пары оснований в молекуле ДНК, расположенные вдоль оси спирали, образуют друг относительно друга угол в  $36^\circ$ . Таким образом, 10 пар оснований составляют один полный оборот спирали в  $360^\circ$ . Две цепи, образующие двойную спираль, уложены таким способом, что наблюдаемая структура характеризуется наличием *малой бороздки*, шириной  $12\text{\AA}$  (1,2 нм), и *большой бороздки*, шириной  $22\text{\AA}$  (2,2 нм) (рис. 3.7). Двойная спираль является *правосторонней*: если смотреть вдоль оси спирали – повороты следуют по часовой стрелке. Данное описание соответствует модели ДНК, известной как *B-форма*.

Таблица 3.2

| Параметры спирали   | A-форма                | B-форма                | Z-форма  |
|---|------------------------|------------------------|--|
| Направление спирали   | Правосторонняя         | Правосторонняя         | Левосторонняя                                      |
| Диаметр   | $\cong 26 \text{ \AA}$ | $\cong 20 \text{ \AA}$ | $\cong 18 \text{ \AA}$                             |
| Число пар оснований в одном витке спирали   | 11                     | 10,5                   | 12   |
| Расстояние между парами оснований по ходу спирали   | $2,6 \text{ \AA}$      | $3,4 \text{ \AA}$      | $7,7 \text{ \AA}$                                  |
| Наклон плоскости в которой расположены основания по отношению к перпендикуляру проведенному к оси спирали | 20                     | 6                      | 7  |
| Конформация углевода  | C-3 эндо               | C-2 эндо               | C-2 эндо для пиримидинов;<br>C-2'-экзо для пуринов |
| Конформация гликозидной связи   | Анти                   | Анти                   | Анти для пиримидинов;<br>син для пуринов           |

ДНК может формировать несколько типов двойных спиралей. В настоящее время описано, по крайней мере, шесть форм (от А- до Е- и Z- форма). Большая часть структурных вариантов ДНК может существовать только в строго контролируемых условиях. Эти варианты различаются: 1) числом пар оснований, приходящихся на один виток двойной спирали; 2) расстоянием между плоскостями пар оснований и углом, который они образуют с осью спирали; 3) диаметром спирали; 4) направленностью (правая, левая) двойной спирали (табл. 3.2). Важно, что разнообразные структурные варианты абсолютно не противоречат основополагающим принципам строения ДНК, сформулированным Уотсоном и Криком: комплементарности цепей, их антипараллельности и правилам спаривания оснований –  $A = T$  и  $G \equiv C$ .

Структурные вариации в ДНК могут зависеть от трех основных процессов: изменения конформации остатков дезоксирибозы, вращения связей между атомами, формирующими сахарофосфатный остов ДНК и свободного вращения C-1'-N-гликозидной связи. Вследствие стерических причин пуриновые основания в составе пуриновых нуклеотидов в ДНК могут приобретать относительно остатка дезоксирибозы две

стабильные конформации обозначаемые как *син*- и *анти*- (рис. 3.8). В то же время пиримидиновые основания пиримидиновых нуклеотидов присутствуют в ДНК в виде анти-конформеров, что связано со стерическими несоответствиями, возникающими между углеводной частью нуклеотида и карбонильным кислородом в С-2 положении пиримидина (рис. 3.8).

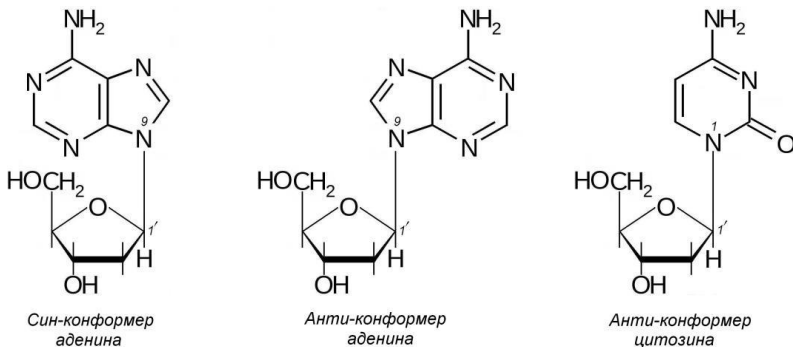


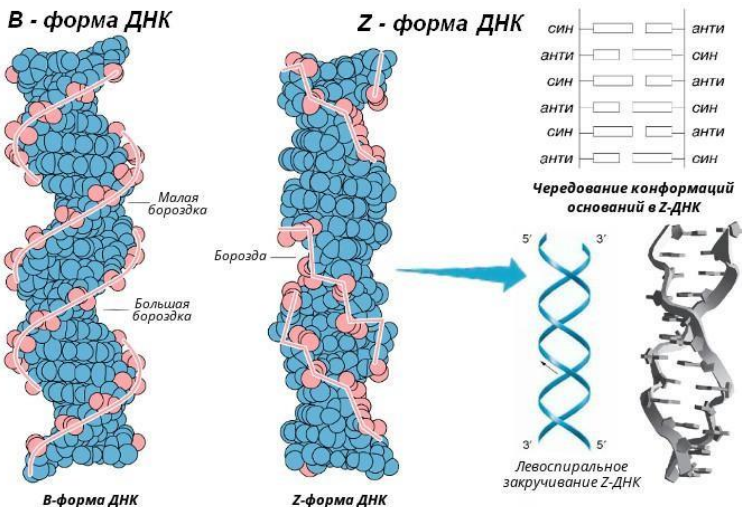
Рис. 3.8. Пуриновые основания в составе соответствующих нуклеотидов могут принимать две стерически доступные конформации – *син*- или *анти*-относительно характера присоединения основания к остатку дезоксирибозы. Пиримидиновые основания, главным образом, приобретают антиконформацию

При физиологических условиях (низкая концентрация соли, высокая степень гидратации) доминирующим структурным типом ДНК является правоспиральная В-форма. Шаг спирали такой молекулы равен 34 Å (3,4 нм). На один виток ДНК приходится 10 пар оснований, удерживаемых водородными связями и стэкинг-взаимодействиями.

*А-форма* отличается от *В-формы* тем, что плоскости оснований составляют с перпендикуляром к оси спирали угол, равный 20°. Поэтому расстояние между парами оснований по вертикали уменьшается до 2,6 Å (0,26 нм), а число пар на виток увеличивается до 11–12. *А-форма* интересна еще и тем, что ее конформация близка к структуре гибридов ДНК-РНК и структуре двухспиральных РНК.

*Z-форма* представляет собой наиболее резкий контраст с классическими формами ДНК. Характерной особенностью В- и А-форм ДНК является то, что сахарофосфатные остовы обеих цепей этих ДНК образуют правую спираль. При определенных условиях отдельные участки ДНК принимают форму *левой спирали*. В этом случае расстояние между соседними парами оснований увеличивается до 7,7 Å (0,77 нм), а число пар на один виток возрастает до 12. Свое название *Z-форма* получила из-за зигзагообразной (*zigzag*) линии, которую образует *сахарофосфатный остов вдоль спирали*:





Двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, за крайне редким исключением, обладают уникальными топологическими характеристиками. Кольцевые молекулы имеют в структуре соответствующие изгибы и петли, которые получили название *супервитков*, и которые хорошо различимых при использовании электронной микроскопии (рис. 3.9).

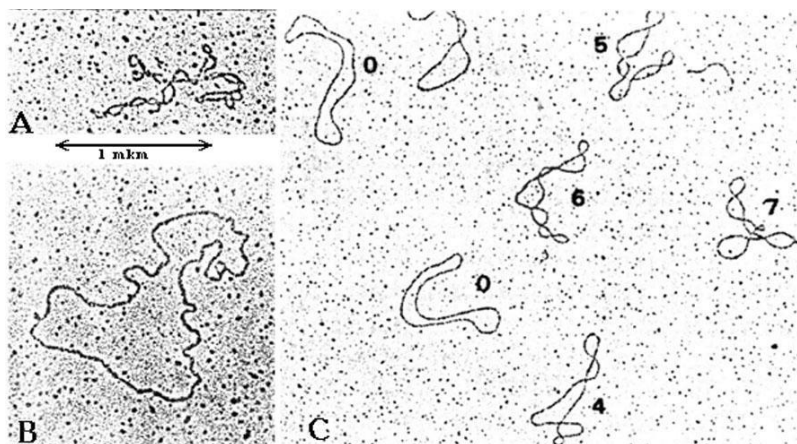


Рис. 3.9. Электронные микрофотографии суперспирализованных молекул ДНК: А – суперспирализованная митохондриальная ДНК; В – релаксированная форма митохондриальной ДНК; С – двухцепочечная кольцевая ДНК фага М13 с разной степенью сверхспиральности. На последней микрофотографии цифрами указано число супервитков в каждой молекуле

Если двойную спираль повернуть на один или несколько полных оборотов в направлении ее раскручивания, то в результате получим *напряженную структуру*. Такая напряженная структура, которая характеризуется недостатком оборотов, получила название *отрицательно суперспирализованной ДНК*. Возникшие *отрицательные супервитки* закручивают ДНК против часовой стрелки, то есть в направлении, противоположном ходу обычной правосторонней двойной спирали. Такую спираль называют *недокрученной*. Напряжение, возникающее вследствие дефицита витков, может быть компенсировано либо разрушением водородных связей между комплементарными парами оснований и раскрытием двойной спирали на небольшом участке макромолекулы, либо путем сворачивания в направлении, противоположном тому, в котором она была повернута.

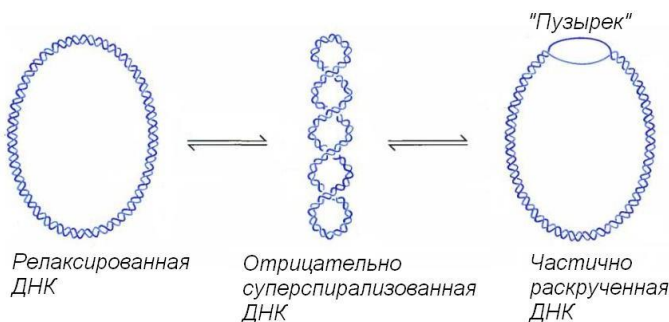


Рис. 3.10. Напряжение, возникающее вследствие дефицита витков, может быть смягчено за счет образования третичной структуры с хорошо различимыми супервитками или компенсировано разрушением водородных связей между комплементарными парами оснований и раскрытием двойной спирали на небольшом участке макромолекулы. В результате разрушения водородных связей получаемая структура может приобрести вид регулярной релаксированной двойной спирали, содержащей небольшую одноцепочечную петлю называемую «пузырьком»

Таким образом, напряжение вращения, которое было внесено в молекулу, может быть смягчено за счет образования *третичной структуры* с хорошо различимыми супервитками (рис. 3.10).

Наконец, под *четвертичной структурой* ДНК понимают образование нуклеопротеидных комплексов (нуклеосом – комплексов гистонов с ДНК у эукариот или комплексов гистонподобных белков с ДНК у прокариот), которые принимают участие в компактизации ДНК с образованием хромосом (у эукариот) или нуклеоидов (у прокариот).

## Структура рибонуклеиновых кислот (РНК)

РНК представляет собой полимер пуриновых и пиримидиновых рибонуклеотидов, соединенных друг с другом, как и в ДНК, 3'-5'-фосфодиэфирными мостиками. По ряду признаков ДНК и РНК отличаются друг от друга. У РНК углеводным остатком, к которому присоединены пуриновые или пиримидиновые основания и фосфатные группы, является рибоза, а не 2'-дезоксирибоза (как у ДНК). Пиримидиновые компоненты РНК отличаются от таковых у ДНК. РНК не содержит тимина, а его место в молекуле РНК занимает урацил. РНК – одноцепочечная молекула, которая способна сворачиваться с образованием «шпилек», особых структур, имеющих двухспиральные характеристики.

При описании строения рибонуклеиновых кислот, как правило, упоминают три вида молекул РНК: *информационные РНК* (иРНК), *рибосомные РНК* (рРНК) и *транспортные РНК* (тРНК). Информационные РНК выполняют функцию молекул-посредников и служат переносчиками информации от гена к белок-синтезирующей системе клетки. Они выполняют функцию матриц для синтезируемого полипептида, то есть определяют аминокислотную последовательность белка. Рибосомные РНК играют роль структурных компонентов рибосом, которые обеспечивают специфический контакт иРНК и тРНК, в результате которого происходит трансляция нуклеотидной последовательности, считанной с определенного гена, в аминокислотную последовательность соответствующего белка. Транспортные РНК – это адапторные молекулы, участвующие в трансляции информации иРНК в последовательность аминокислот в белках.

Кроме упомянутых выше трех видов РНК, в настоящее время открыты и интенсивно изучаются так называемые *малые ядерные РНК* (мяРНК), обозначаемые U1, U2, U4, U5 и U6, которые принимают участие в формировании *сплайсисом* – организованных структур, обеспечивающих *сплайсинг* и РНК эукариот. Следует отметить, что в 2000 г. был открыт неизвестный ранее вид *двухцепочечных* молекул РНК, которые получили название *малых интерферирующих РНК* (миРНК), принимающих участие в защите клеток от вирусных инфекций.

## Химические свойства нуклеиновых кислот

### Качественные реакции на компоненты нуклеопротеидных комплексов

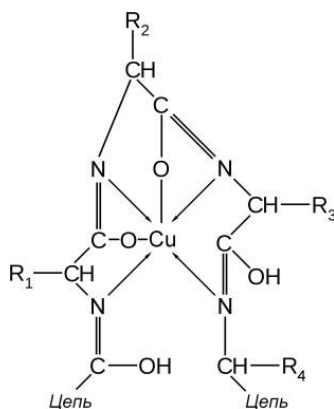
#### *Обнаружение полипептидов*

Для обнаружения полипептидов в составе нуклеопротеидов используют биуретовую реакцию. В щелочной среде белки, а также продукты их гидролиза – полипептиды – дают фиолетовое окрашивание

с солями меди. Положительная биуретовая реакция проявляется у соединений, содержащих не менее двух пептидных групп (то есть у трипептидов, тетрапептидов и т. д.). Интенсивность окраски зависит от длины пептида и варьирует от сине-фиолетовой до красно-фиолетовой и красной. Биуретовый медный комплекс имеет следующее строение:



Аналогично образуется комплексное соединение меди с енолизированными пептидными группами любого другого полипептида:

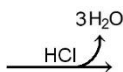
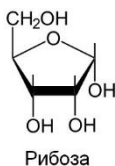
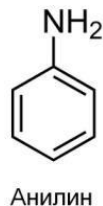
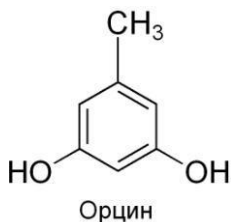
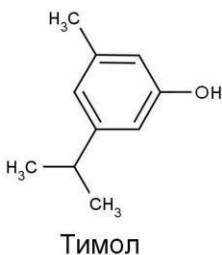


### **Обнаружение пуриновых оснований**

При добавлении аммиачного раствора оксида серебра выпадает небольшой хлопьевидный осадок серебряных соединений пуриновых оснований. Данная реакция может быть применена при синтезе нуклеозидов.

### **Обнаружение пентоз**

При нагревании с концентрированными серной или соляной кислотами пентозы теряют три молекулы воды и превращаются в фурфурол. Последний способен конденсироваться с анилином, тимолом или орцином (в присутствии хлорида железа III) с образованием характерных продуктов вишнево-красного, красного и зеленого цвета соответственно.



Продукт конденсации  
вишнево-красного  
цвета



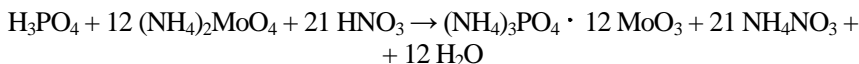
Продукт конденсации  
зеленого цвета



Продукт конденсации  
красного цвета

### ***Обнаружение фосфорной кислоты***

Обнаружение фосфорной кислоты в образце можно осуществить с использованием молибдата аммония. Фосфорная кислота образует с молибденовым реактивом желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония:



### **Количественное определение нуклеиновых кислот**

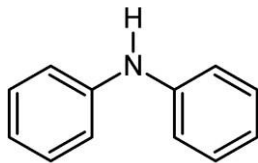
#### ***Орциновый метод определения РНК***

Рибоза, входящая в состав РНК, при взаимодействии с сильными неорганическими кислотами (в частности с HCl) образуют фурфурол, который конденсируется с орцином в присутствии следов хлорида железа III. В результате образуется соединение синего цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации РНК в растворе.

#### ***Дифениламиновый метод определения ДНК***

Дезоксирибоза, входящая в состав ДНК, при нагревании с кислотой в мягких условиях образует фурфуриловый спирт, который конденсируется с дифениламином, образуя соединение синего цвета. Интенсив-

ность окраски полученного раствора пропорциональна концентрации ДНК в растворе.



Дифениламин

### **Контрольные вопросы**

1. История исследования структуры нуклеиновых кислот.
2. Строение пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований.
3. Физико-химические свойства пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований.
4. Принципы образования канонических пар азотистых оснований в нуклеиновых кислотах.
5. Строение нуклеозидов. Характеристика моносахаридов, входящих в состав нуклеозидов.
6. Строение и роль нуклеотидов.
7. Основные принципы структурной организации дезоксирибонуклеиновых кислот.
8. Информационные свойства ДНК.
9. Структура рибонуклеиновых кислот.
10. Химические свойства нуклеиновых кислот. Качественные реакции на обнаружение компонентов нуклеопротеинов.
11. Сущность методов количественного определения ДНК и РНК.

### **Литература**

1. *Рогожин В. В.* Практикум по биохимии. – Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2013.
2. *Чернов Н. Н., Березов Т. Т., Буровина С. С.* Биохимия: руководство к практическим занятиям. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2009.
3. *Пустовалова Л. М.* Практические работы по биохимии. – Ростов на Дону: «Феникс», 2004.
4. *Чиркин А. А.* Практикум по биохимии. – Минск: «Новое знание», 2002.
5. *Нельсон Д., Кохс М.* Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. – М.: «Бином», 2014.
6. *Чиркин А. А., Данченко Е. О.* Биохимия. – М.: «Медицинская литература», 2010.
7. *Северин Е. С., Алейникова Т. Л., Осипов Е. В. и др.* Биологическая химия. – М.: «Медицинское информационное агентство», 2008.

8. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. – М.: «Мир», 2000.
9. Долгов В. В., Ованесов Е. Н., Щетникович К. А. Фотометрия в лабораторной практике. – М.: «Витал Диагностика СПб», 2004.

## ХОД РАБОТЫ

### **ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ**

#### ***Выделение нуклеопротеидов из дрожжей***

1. 5 г дрожжей увлажняют в ступке добавлением 1 мл эфира и 1 мл воды.
2. Добавляют немного песка и растирают с 0,4 % раствором NaOH, приливая его небольшими порциями по 5–10 мл (всего расходуют 50 мл раствора щелочи). Растирание продолжают в течение 15–20 мин.
3. Содержимое ступки центрифугируют 10 мин при 2500 об/мин.
4. Супернатант переливают в стакан и к нему по каплям добавляют 5 % раствор уксусной кислоты до полного осаждения нуклеопротеида (обычно расходуют 10–15 мл раствора).
5. Осадок отделяют центрифугированием (8000g в течение 5 мин).
6. Проводят гидролиз нуклеопротеидов кипячением с разбавленной серной кислотой. Для этого:
  - осадок нуклеопротеидов переносят в круглодонную колбу, смывая его 5 %-ой серной кислотой. Остаток кислоты вливают в колбу с осадком (всего расходуют не более 25 мл раствора);
  - колбу закрывают пробкой с обратным холодильником, ставят на асбестовую сетку, нагревают на малом огне до кипения и кипятят 1 ч;
  - после этого колбу охлаждают и гидролизат фильтруют через бумажный фильтр.

### **Качественные реакции на присутствие нуклеопротеидов в растворе**

#### ***Открытие полипептидов***

1. В одну пробирку наливают 2 мл фильтрата, а в другую – столько же дистиллированной воды.
2. Затем в каждую из них прибавляют 2 мл 10 % раствора NaOH, хорошо перемешивают и добавляют 2–3 капли 2 % раствора CuSO<sub>4</sub>.
3. Пробирки встряхивают, полученные результаты описывают и делают выводы.

#### ***Открытие пуриновых оснований***

1. К 2 мл фильтрата добавляют концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции на лакмус. Затем приливают 1 мл аммиачного раствора окиси серебра.

2. Через несколько минут наблюдают выпадение хлопьев осадка серебряных солей пуриновых оснований. Объясняют получаемые результаты и делают выводы.

### ***Открытие пентоз***

1. К 1 мл фильтрата добавляют 2–3 капли 1 % спиртового раствора тимола.
2. Затем по стенке осторожно наслаивают 1 мл концентрированной серной кислоты.
3. Объясняют получаемые результаты и делают выводы.

### ***Открытие фосфорной кислоты***

1. К 1 мл фильтрата приливают равный объем молибденового реактива.
2. Нагревают до кипения и кипятят 2–3 мин.
3. Наблюдают появление желтого окрашивания. При стоянии выпадает желтый осадок.
4. Объясняют получаемые результаты и делают выводы.

### **Количественное определение нуклеиновых кислот**

#### ***Орциновый метод количественного определения РНК***

1. Непосредственно перед использованием смешивают 5 мл раствора А, 20 мл раствора Б и 0,5 мл раствора В.
2. К 0,5 мл фильтрата и стандартного раствора добавляют по 3 мл полученного реактива.
3. Пробы нагревают на кипящей водяной бане в течение 25 мин, затем охлаждают.
4. Измеряют оптическую плотность растворов при 660 нм относительно чистого реагента.
5. Рассчитывают концентрацию РНК в исследуемой пробе, используя формулу:

$$C_{(\mu\text{г}/\text{мл})} = \frac{A_1 \times 100}{A_2},$$

где  $A_1$  – поглощение исследуемой пробы;  $A_2$  – поглощение стандартной пробы; 100 (μг/мл) – концентрация стандартного раствора РНК.

6. Объясняют получаемые результаты и делают выводы.



## *Дифениламинный метод определения ДНК*

1. Аналитические пробы готовят в соответствии с таблицей:

|                                | Опытная проба | Стандартная проба | Холостая проба |
|--------------------------------|---------------|-------------------|----------------|
| Фильтрат                       | 1,55          | –                 | –              |
| Стандартный раствор            | –             | 1,55              | –              |
| Дистиллированная вода          | –             | –                 | 1,55           |
| НСlO <sub>4</sub> ( конц.), мл | 0,05          | 0,05              | 0,05           |
| Дифениламинный реагент, мл     | 3,20          | 3,20              | 3,20           |

2. Пробы инкубируют в течение 30 мин при 40 °С.

3. Измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб при 660 нм относительно холостой пробы.

4. Рассчитывают концентрацию ДНК в опытной пробе, используя формулу:

$$C_{(\mu\text{г}/\text{мл})} = \frac{A_1 \times 50}{A_2},$$

где  $A_1$  – поглощение опытной пробы;  $A_2$  – поглощение стандартной пробы; 50 (μг/мл) – концентрация стандартного раствора ДНК.

5. Объясняют получаемые результаты и делают выводы.

### **Оформление работы**

*К занятию:*

Кратко законспектировать теоретические данные по лабораторной работе.

*Во время занятия:*

1. Описать этапы работы.
2. Описать результаты.
3. Сделать выводы.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1**

**НАИБОЛЕЕ ВАЖНЫЕ ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫЕ  
ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ**

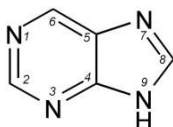
| Название   | Состав             | Формула   |
|--|--------------------|---|
| <b>Насыщенные</b>                                |                    |   |
| Пальмитиновая                                    | 16 атомов углерода | $\text{CH}_3^{16}-(\text{CH}_2)^{14}_{15-2}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$  |
| Стеариновая                                      | 18 атомов углерода | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)^{16}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$  |
| <b>Ненасыщенные</b>                              |                    |   |
| <i>С одной двойной связью (моноеновые)</i>       |                    |   |
| Пальмитолеиновая                                 | 16:1, 9*)          | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)^5_{10}-\overset{9}{\text{C}}\text{H}=\overset{9}{\text{C}}\text{H}-(\text{CH}_2)^7_{7}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$  |
| Олеиновая  | 18:1, 9            | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)^7_{10}-\overset{9}{\text{C}}\text{H}=\overset{9}{\text{C}}\text{H}-(\text{CH}_2)^7_{7}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$  |
| <i>С двумя двойными связями (диеновые)</i>       |                    |   |
| Линолевая  | 18:2, 9, 12        | $\text{CH}^3-(\text{CH}^5)^4_{12}-\overset{9}{\text{C}}\text{H}=\overset{9}{\text{C}}\text{H}-\overset{5}{\text{C}}\text{H}-\overset{10}{\text{C}}\text{H}=\overset{6}{\text{C}}\text{H}-(\text{CH}^5)^1_{7}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$   |
| <i>С тремя двойными связями (триеновые)</i>      |                    |   |
| γ-Линоленовая                                    | 18:3, 6, 9, 12     | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)^4_{13}-\overset{12}{\text{C}}\text{H}=\overset{12}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2--\overset{10}{\text{C}}\text{H}=\overset{9}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2-\overset{7}{\text{C}}\text{H}=\overset{6}{\text{C}}\text{H}-(\text{CH}_2)^4_{4}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$  |
| α-Линоленовая                                    | 18:3, 9, 12, 15    | $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\overset{16}{\text{C}}\text{H}=\overset{15}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2--\overset{13}{\text{C}}\text{H}=\overset{12}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2-\overset{10}{\text{C}}\text{H}=\overset{9}{\text{C}}\text{H}-(\text{CH}_2)^7_{7}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$   |
| <i>С четырьмя двойными связями (тетраеновые)</i> |                    |   |
| Арахидоновая                                     | 20:4, 5, 8, 11, 14 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)^4_{15}-\overset{15}{\text{C}}\text{H}=\overset{14}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2-\overset{12}{\text{C}}\text{H}=\overset{11}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2--\overset{9}{\text{C}}\text{H}=\overset{8}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2-\overset{6}{\text{C}}\text{H}=\overset{5}{\text{C}}\text{H}-(\text{CH}_2)^3_{3}-\overset{1}{\text{C}}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$ |

\*) – 16:1, 9 – расшифровывается как – 16 атомов углерода : 1 двойная связь, двойная связь в 9-ом положении.

**СТРУКТУРА КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

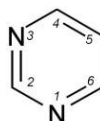
***АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ***

***Пуриновые***

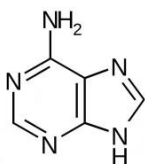


*Пурин*

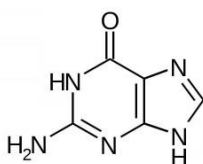
***Пиримидиновые***



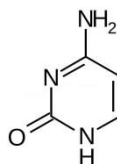
*Пиримидин*



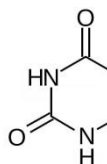
*Аденин*



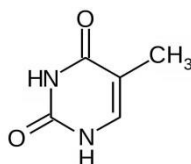
*Гуанин*



*Цитозин*

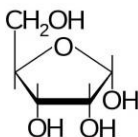


*Урацил*

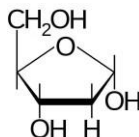


*Тимин*

***ПЕНТОЗЫ***



*Рибоза*

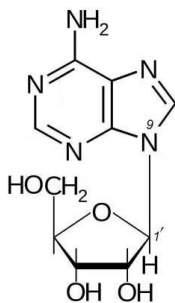


*Дезоксирибоза*

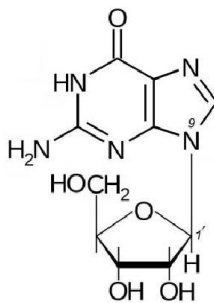
***НУКЛЕОЗИДЫ***

***(нуклеозиды риборяда)***

***Пуриновые нуклеозиды***

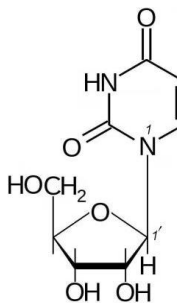


*Аденозин*

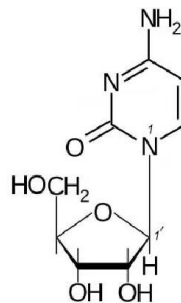


*Гуанозин*

***Пиримидиновые нуклеозиды***



*Уридин*



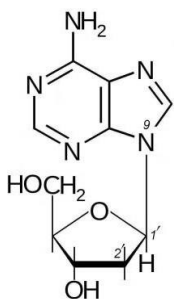
*Цитидин*

## НУКЛЕОЗИДЫ

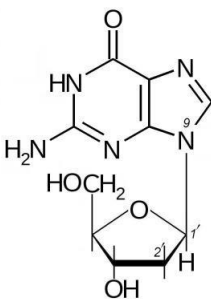
(нуклеозиды дезоксириборяда)

*Пуриновые нуклеозиды*

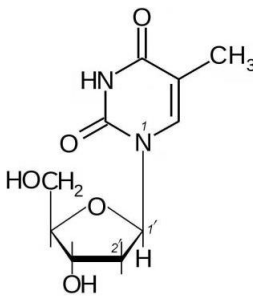
*Пиримидиновые нуклеозиды*



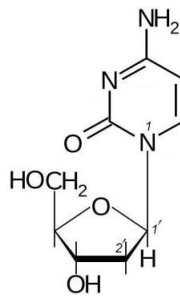
*2-Дезоксиаденозин*



*2-Дезоксигуанозин*



*Тимидин*

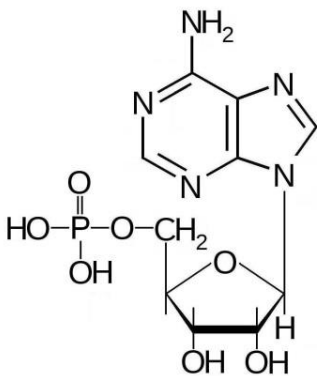


*2-Дезоксицитидин*

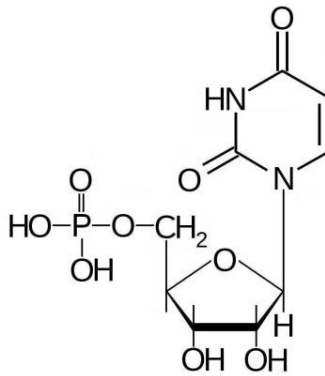
## НУКЛЕОТИДЫ

(на примере рибонуклеотидов)

*Нуклеозидмонофосфаты*

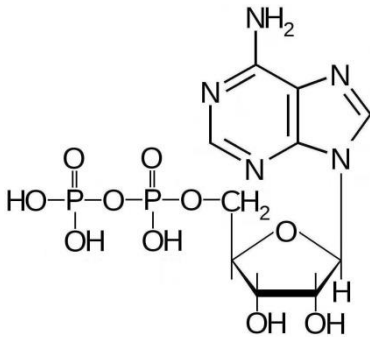


*Аденозин-5'-монофосфат*

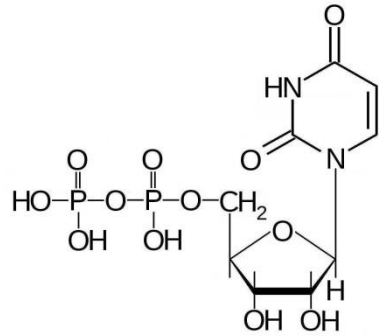


*Уридин-5'-монофосфат*

## *Нуклеозиддифосфаты*

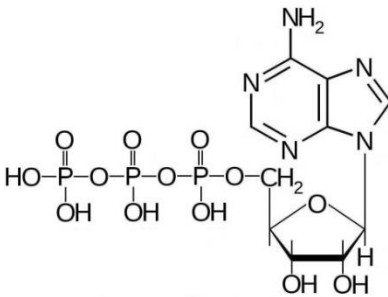


*Аденозин-5'-дифосфат*

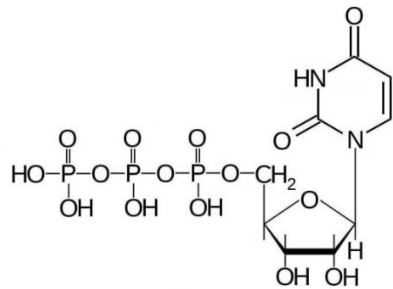


*Уридин-5'-дифосфат*

## *Нуклеозидтрифосфаты*



*Аденозин-5'-трифосфат*



*Уридин-5'-трифосфат*

Учебное издание

**Докучаева** Евгения Александровна,  
**Сяхович** Виталий Эдуардович,  
**Пархимович** Ольга Георгиевна и др.

ОБЩАЯ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ:  
СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ.  
ОБМЕН ЛИПИДОВ.  
НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ.  
КОМПОНЕНТЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Учебно-методическое пособие

Редактор *Л. М. Корневская*  
Компьютерная верстка *Д. В. Головач*  
Техническое редактирование *А. В. Красуцкая*

Подписано в печать 14.06.2018. Формат 60×90 1/16.  
Бумага офсетная. Печать офсетная.  
Усл. печ. л. 4,31. Уч.-изд. л. 2,55.  
Тираж 100 экз. Заказ № 203.

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-  
вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий  
№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014.  
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.