

**Всероссийская олимпиада студентов «Я - профессионал»**

Направление: «Химия»

Категория участия: Магистратура/Специалитет

**Финал заключительного этапа**

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ СМЕСИ ВЕЩЕСТВ В  
БИОХИМИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АКТИВНОГО  
ФЕРМЕНТА АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

**Практическая задача по препаративной и аналитической биохимии**

**Задания, решение и критерии оценивания**



## Инструкция. Общие положения

- Правила техники безопасности: следуйте общепринятым правилам проведения химического эксперимента; в лаборатории запрещается принимать пищу и пить. Подробный инструктаж будет проведен непосредственно перед началом эксперимента.
- Нарушение правил техники безопасности: Вам будет сделано лишь одно предупреждение, в случае повторного нарушения Вы будете дисквалифицированы.
- Практический тур включает в себя практическую задачу по биохимии, состоящую из экспериментальной части и теоретических вопросов по проделанной работе. Ответы на блок теоретических вопросов выполняются только после завершения экспериментальной части.
- Время: на выполнение практического тура отводится 4 астрономических часа без перерыва. В начале Вам дается 15 минут на изучение настоящего буклета. На экспериментальную часть отводится до 180 минут (3 часа). После завершения экспериментальной части Вам даётся 60 минут для записи окончательных результатов анализа, выводов и ответов на теоретические вопросы. Длительность отдельных этапов работы допустимо менять по своему желанию, однако на суммарное время выполнения всей работы отводится не более 4 часов (240 мин).
- Этот буклет используется как бланк для ответов. Записывайте ответы в специально отведенные места, предназначенные для ответов, выделенные рамкой. Ответы на вопросы должны быть краткими и исчерпывающими, приводите химические формулы веществ и уравнения химических реакций при необходимости. Обратную сторону листов можно использовать в качестве черновика.
- Обратитесь к дежурному члену жюри, если у Вас возникли вопросы по проведению тура или технике безопасности, Вам необходима замена посуды или реактивов, или Вам нужно выйти в туалет.
- Аккуратно сливайте жидкие отходы в раковину, расположенную рядом с Вашим рабочим местом.
- Вы можете использовать некоторую посуду в течение тура несколько раз. Мойте ее тщательно! По завершении эксперимента оставьте всю посуду на своем рабочем месте, не следует ее мыть.
- Данный буклет состоит из 19 страниц (включая 2 титульных листа). **На каждом листе впишите номер своего рабочего места!**



## Введение

В анализе сложных смесей веществ биологического происхождения важную роль занимает жидкостная хроматография различного типа. Хроматография применяется для препаративных целей выделения и очистки различных компонентов, а также как метод анализа состава смеси или как вспомогательный метод пробоподготовки образцов для последующего анализа различными другими методами. Аналитами могут выступать различные низкомолекулярные метаболиты и высокомолекулярные вещества – биополимеры, например, ферменты. В зависимости от цели исследования измеряют или статическую концентрацию вещества или её изменение во времени, например, при измерении ферментативной активности. Различные методы определения активности ферментов применяются как в фундаментальных исследованиях, так и в медицинской диагностике, в анализе препаратов, применяемых в фармацевтической и пищевой промышленности.

### Основные практические задания в работе.

1. Провести хроматографическое разделение смеси веществ. Выделить две интенсивно окрашенные фракции, имеющий разный цвет.
2. Зарегистрировать спектры поглощения каждой из двух фракций после разделения и исходного раствора.
3. Измерить активность алкогольдегидрогеназы в двух окрашенных фракциях разного цвета после разделения смеси и в исходном растворе. Определить концентрацию фермента.
4. Сделать выводы о принципе разделения веществ и установить какие вещества оказались в каждой из двух фракций после хроматографии.



## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы, посуда и основные инструменты

Наименование	Количество
Стакан на 50 мл	2
Дозатор (автоматическая пипетка) на 0.1-1.0 мл, наконечники	1/20
Дозатор (автоматическая пипетка) на 0.02-0.2 мл, наконечники	1/20
Спектрофотометрические кюветы из полистирола, объёмом 1 мл, длина оптического пути 1 см	10
Пластиковые пробирки объёмом 1.5 мл	25
Маркер по стеклу и пластику	1
Готовая хроматографическая колонка с хроматографическим материалом Sephadex G-25 (эксклюзионная хроматография). Высота 5 см, диаметр 1.5 см.	1
Препарат, содержащий: 0.05 мг/мл триптофана, 0.05 мг/мл пищевой добавки “Е133” (триарилметановый краситель, 3(N-этил-N-(4-((4-(N-этил-N-(3-сульфонатобензил)-амино)фенил)(2-сульфонато-фенил)метил)-2,5-циклогексадиен-1-илиден)аммонийметил)-бензосульфат динатриевая соль, $\text{Na}_2\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_3$ ), 0.15 мг/мл цитохром С из сердца быка, неизвестное количество алкогольдегидрогеназы (АДГ) из печени лошади. Всего препарата 1.0 мл в пластиковой пробирке	1
Буферная смесь для хроматографии 50 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.15М $\text{NaCl}$ pH 7.4, 50 мл в стеклянном стакане	1
Реакционная смесь для определения активности 50 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.15М $\text{NaCl}$ pH 7.4, содержащая 1.0% этилового спирта и 25 мкМ $\text{НАД}^+$ (никотинамидадениндинуклеотид). 10 мл в пластиковой пробирке	1
Стандартный раствор алкогольдегидрогеназы из печени лошади 1.0 мг/мл, 1.0 мл в пластиковой пробирке	1
Дистиллированная вода в промывалке на 250 мл	1
Штатив для пробирок объёма 1.5 мл	1
Фарфоровая ёмкость на 400-800 мл для сброса использованных наконечников от пипеток	1

### Общие указания. Методы.

При проведении хроматографии необходимо аккуратно добавлять элюент (буфер для хроматографии) в колонку, чтобы не нарушить верхний слой геля (хроматографического) материала. Подвижная фаза в колонке перемещается «самотёком». Спектральные измерения производятся на спектрофотометре Jenway 6310 по поглощению раствора при определённой длине волны в пластиковых спектрофотометрических кюветах. На каждой кювете сверху есть



треугольная метка, указывающая направление луча при установке в прибор. Для работы выдаётся комплект кювет как для записи спектров поглощения, так и для измерения активности. В случае необходимости разведения препаратов предоставляются пластиковые пробирки объёмом 1.5 мл. При исследовании спектров поглощения фракций сначала записывают базовую линию по буферной смеси для хроматографии. При измерении активности фермента выбирают «кинетический режим» и длину волны 340 нм. Реакцию инициируют добавлением фермента.

### **Методика эксперимента.**

#### **Хроматографическое разделение смеси веществ.**

Для работы предоставлена предварительно уравновешенная буфером (промытая) хроматографическая колонка с матрицей Sephadex G-25 (эксклюзионная хроматография). Снимите верхнюю крышку колонки, а затем нижнюю крышку с выходящего отверстия колонки. Снизу под колонкой установите стакан для сбора жидкости, вытекающей из колонки. Перед разделением веществ следует аккуратно отобрать из верхней части колонки буфер так, чтобы над гелем оставался слой жидкости не более 2-3 мм. Далее следите, чтобы жидкость над гелем ушла вниз самотёком. Кратковременное (несколько минут) отсутствие жидкости над гелем в колонке данной геометрии не приводит к пересыханию геля хроматографической матрицы (за счёт сил поверхностного натяжения). Аккуратно дозатором (автоматической пипеткой) внесите в колонку 0.6 мл смеси разделяемых веществ (препарата) так, чтобы по возможности не возмутить поверхность геля и не сместить верхний фильтр. Дождитесь момента, чтобы весь препарат разделяемой смеси проник в гель. Затем аналогично внесите в колонку 0.6 мл буфера для хроматографии. Дождитесь момента, чтобы весь добавленный буфер проник в гель. После чего аккуратно добавьте буферный раствор почти до верха колонки. Соберите фракции в пластиковые пробирки объёмом 1.5 мл. При сборе фракций для удобства можно заранее установить пробирки с открытыми крышками в штатив и передвигать штатив по мере заполнения очередной фракции. Во время сбора фракций периодически добавляйте буфер для хроматографии сверху колонки, чтобы колонка была заполнена буфером почти до верха. Объём каждой фракции 1.2 – 1.5 мл приблизительно (точно отмерять не нужно). В качестве фракции 1 выберите пробирку с наиболее окрашенным розовым элюатом (в случае двух и более одинаково окрашенных фракций можно сделать определённый выбор из них произвольно). В качестве фракции 2 выберите пробирку с наиболее окрашенным голубым элюатом (в случае двух и более одинаково окрашенных фракций можно сделать выбор из них произвольно). Ёмкости с фракциями 1 и 2 закрыть, предварительно перемешав



каждый из растворов пипетированием. После сбора фракций закройте крышки колонки, сначала сверху, затем снизу (для экономии времени можно не дожидаться полного выхода голубого компонента из колонки).

Место для расчётов и заметок

Фракция 1 - пробирка №2  
Фракция 2 – пробирка № 9

### Исследование спектров поглощения препаратов.

#### Выбор пробирки №...для фракций 1 и 2, приблизительный объём и описание параметров спектров ЭЗ.

Здесь и далее **БУКВА** означает категорию вопроса, **цифра** – максимальный технический балл.

Задайте диапазон длин волн 320 – 800 нм. При исследовании спектров поглощения сначала зарегистрируйте базовую линию по буферной смеси для хроматографии. Затем регистрируйте спектры исходного раствора (препарата) и растворов фракций 1 и 2, полученных после разделения веществ. При записи спектра рекомендуется развести исходный раствор в 10 раз буфером для хроматографии (внесите в кювету исходный (до разделения) препарат объемом 0.1 мл и добавьте 0.9 мл буферной смеси для хроматографии, перемешайте раствор в кювете пипетированием). Растворы фракций 1 и 2 при регистрации спектра разводить не нужно. Запишите длины волн для всех основных максимумов поглощения и значения интенсивности пиков для дальнейшей интерпретации. После записи спектров перелейте растворы из кювет в пробирки и подпишите (**эти растворы понадобятся далее для измерения активности!**).

Место для расчётов и заметок Исходный разведённый 1/10 **406 нм** (интенсивность (поглощение) 0,489) вероятно цитохром С, **638 нм** (0,971) вероятно это краситель E133

Фракция 1 (розовый раствор) пробирка №2 **358 нм** (интенсивность 0,438, левое плечо пика цитохрома, которое прибор посчитал как отдельный пик), **406 нм** (1,067 относительно много по концентрации, основной пик цитохрома, комплекс гема с ионом железа), **522 нм** (0,177, относительно мало, возможно примесь изоформы цитохрома или отдельного гемового комплекса или часть правого плеча широкого пика цитохрома, которое прибор посчитал как отдельный пик)

Фракция 2 (голубой раствор) пробирка №9 **404 нм** (0,048, относительно мало по концентрации, вероятно цитохром или комплекс какого либо производного гема с ионом железа без белковой части цитохрома) **628 нм** (0,417, сравнительно много по концентрации, вероятно E133)



**Измерение активности и определение концентрации алкогольдегидрогеназы (АДГ).**

**Построение калибровочной зависимости. Данные для калибровочной зависимости и калибровочная зависимость Э8, Определение концентраций АДГ во фракциях Э8.**

Для измерения активности стандартного раствора алкогольдегидрогеназы внесите в кювету реакционную смесь для измерения активности в объёме 970-880 мкл, закройте на время измерений пластиковую пробирку с реакционной смесью крышкой, затем запустите реакцию в кювете внесением 30-120 мкл стандартного раствора фермента АДГ (аналита). Суммарно объём смеси в кювете должен составлять 1000 мкл. После внесения фермента раствор перемешайте пипетированием (старайтесь сделать это в течение не более 2-3 с), затем регистрируйте изменение аналитического сигнала (поглощение при длине волны 340 нм (прибор предварительно должен быть «занулён» по кювете с реакционной смесью, что можно сделать перед первым измерением после добавления 970-880 мкл реакционной смеси). За скоростью реакции наблюдайте по возрастанию поглощения в течение 2 минут. Рекомендуется добавлять стандартный раствор фермента с шагом увеличения объёма приблизительно на 20-40 мкл, например, 30, 50, 80, 120 мкл, таким образом получится 5 точек измерения, включая точку 0, когда нет фермента и не идёт реакция. Температуру смеси считать условно постоянной, равной 20 °С. Результаты внесите в Таблицу 1. Постройте калибровочную зависимость на листе 10.

**Таблица 1.** Данные для построения калибровочной зависимости.

Объём реакционной смеси, мкл	1000	950	900	850	800
Объём станд. раствора АДГ, мкл	0	50	100	150	200
Масса АДГ в пробе, мг	0	0,05	0,1	0,15	0,2
Аналитический сигнал ( $dA_{340\text{нм}}/dt$ ), $\text{мин}^{-1}$	0	0,007	0,014	0,02	0,26

**Определение концентрации фермента.** Проведите измерение аналитического сигнала для исходной смеси (препарата) и фракций 1 и 2. Рекомендуемый объём добавляемого препарата аналита 50-100 мкл для исходной смеси, 200-300 мкл для фракции 1 и 300 мкл для фракции 2. Суммарный объём реакционной смеси и аналита должен составлять 1000 мкл. Рекомендуется сделать по два измерения для исходного раствора и фракции 1, для фракции 2 достаточно одного измерения. Результаты измерений внесите в Таблицу 2.



**Таблица 2.** Результаты измерения концентрации АДГ в анализируемых образцах

	Исх.	Исх.	1	1	2
Объем реакционной смеси, мкл	980	950	900	800	700
Объем анализируемого раствора, мкл	20	50	100	200	300
Аналитический сигнал ( $dA_{340\text{нм}}/dt$ ), мин <sup>-1</sup>	0,002	0,005	0,003	0,006	0
Масса АДГ по калибровке, мг	0,015	0,035	0,04	0,08	0
Концентрация АДГ, мг/мл	0,75	0,70	0,4	0,4	0
Усреднённая концентрация АДГ, мг/мл	0,725		0,4		0

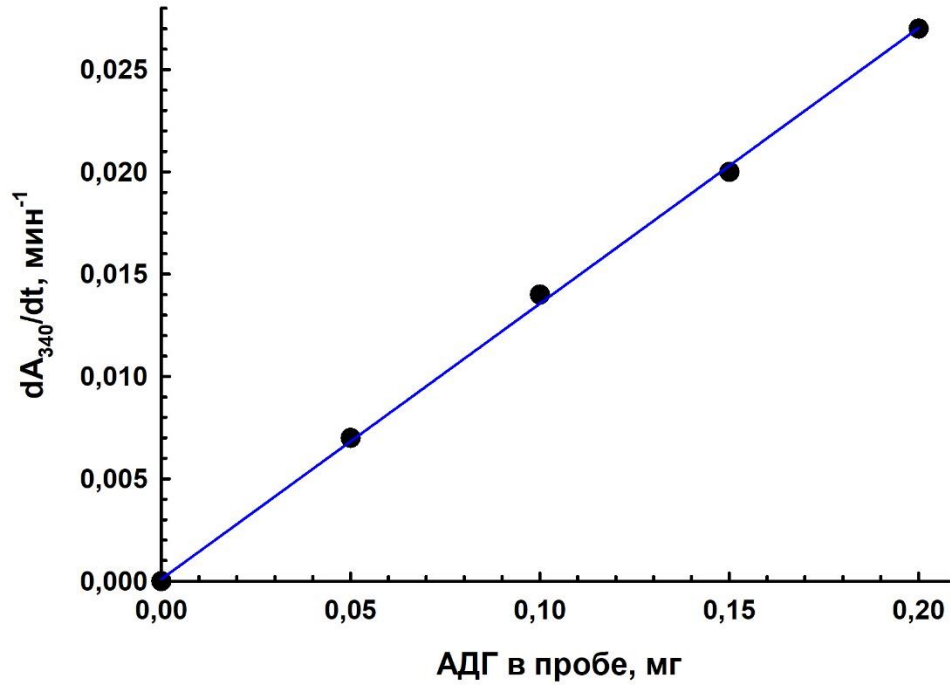
### Место для расчётов

Значения определенной средней концентрации АДГ в исходной смеси в диапазоне 0.425 – 1.025 мг/мл, во фракции 1 0.1 – 0.4 мг/мл оценивались в 8 баллов. Если в диапазон не попадало значение концентрации АДГ в исходной смеси, то результат оценивался в 7 баллов. Также учитывалась аккуратность и корректность при построении калибровочной зависимости и оформлении расчётов в таблице. Если в диапазон не попадали оба значения, однако они были больше 0.2 и 0.05 мг/мл соответственно, то результат оценивался в 4 балла. В других случаях результат оценивался в 0 баллов.





Калибровочная зависимость (скорость реакции от количества фермента АДГ в пробе (кювете))





## ВЫВОДЫ ПО ПРАКТИЧЕСКОЙ ЧАСТИ

1. При каких длинах волн наблюдаются максимумы на спектрах поглощения, каким компонентам смеси эти максимумы, вероятно, соответствуют? Предположите какие из компонентов оказались после разделения во фракциях 1 и 2? Эб

Ответ: Исходный раствор разведённый 1/10, спектр: **Максимум 406 нм**, интенсивность (поглощение) 0,489 (по закону Бугера - Ламберта – Бера поглощение связано с концентрацией компонентов) -вероятно это цитохром С. **Максимум 638 нм** (0,971) вероятно это краситель E133. В неразведённом исходном препарате концентрация АДГ по активности 0,725 мг/мл.  $0,6 \text{ мл} * 0,725 \text{ мг/мл} = 0,435 \text{ мг АДГ}$

Фракция 1 (розовый раствор) пробирка №2. 358 нм (0,438 вероятно левое плечо пика цитохрома, которое прибор посчитал как отдельный пик), **406 нм** (1,067 относительно много по концентрации, вероятно основной пик цитохрома, белка с комплексом гема с ионом железа) 522 нм (0,177, относительно мало, возможно изоформа цитохрома С или часть правого плеча широкого пика цитохрома, которое прибор посчитал как отдельный пик)

Фракция содержит 0,4 мг/мл АДГ (произошло разведение по сравнению с исходным раствором), объём приблизительно 1,3 мл  $1,3 \text{ мл} * 0,4 \text{ мг/мл} = 0,52 \text{ мг}$

Практически вся исходная АДГ оказалась в этой фракции с учётом возможной погрешности получилось даже немного больше, чем было (**0,435 мг**)

По цитохрому С баланс по спектру хуже сходится: исходно  $0,6 \text{ мл} * 0,489 * 10 \sim 2,9$ ; во «фракции 1»  $1,3 \text{ мл} * 1,017 \sim 1,4$ . Разница в 2 раза либо из-за того, что часть пика 406 нм в исходной смеси приходится на низкомолекулярное вещество (например, производное гема с железом без белка) либо пик цитохрома несколько более широкий ввиду меньшей молекулярной массы, соответственно больше потери цитохрома при сборе одной «фракции 1».

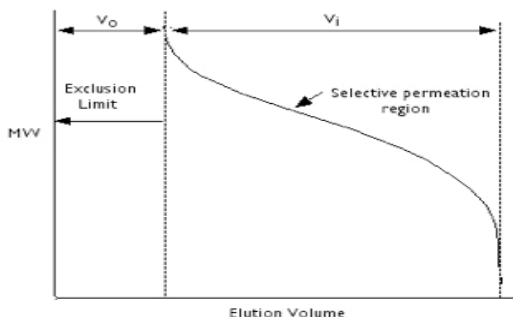
Фракция 1 содержит компоненты с большими молекулярными: белок цитохрома С (~12кДа) и белок АДГ (~80 кДа, димер двух субъединиц по 40кДа)

Фракция 2 (голубой раствор) пробирка №9 404 нм (0,048 (более 20 раз ниже поглощения во фракции 1), относительно мало по концентрации, вероятно небольшая примесь цитохрома или какого-либо комплекса производного гема с железом без белковой части). **628 нм** (0,417, много по концентрации, вероятно E133, эта фракция содержит в основном компоненты с относительно низкими молекулярными массами (менее 1 кДа). E133 молекулярная масса 793 Да [https://en.wikipedia.org/wiki/Brilliant\\_blue\\_FCF](https://en.wikipedia.org/wiki/Brilliant_blue_FCF)

Также в этой фракции вероятно должна быть часть низкомолекулярного триптофана (204 Да), который поглощает при 280 нм и на спектрах в данной работе никак не проявляется

Sephadex G25 является очень популярным в биохимии хроматографическим материалом, который часто используют для отделения высокомолекулярных компонентов смеси (белки с молекулярной массой более 5 кДа) от низкомолекулярных (например, пептиды с молекулярной массой менее 1 кДа). Высокомолекулярные компоненты выходят в мёртвом объёме ( $V_0$ ) с умеренным разведением по концентрации.

Низкомолекулярные компоненты с молекулярными массами менее 1 Да выходят из колонки широким пиком



значительно позже. Компоненты раствора с молекулярными массами 2-4 кДа могут быть разделены на такой колонке, однако ввиду особенностей данной хроматографии при различии молекулярных масс менее, чем в 2 раза, хроматографические пики будут частично перекрываться и разделение будет неполное, для меньших по массе белков размывание хроматографического пика будет сильнее. При определении молекулярной массы неизвестного белка используют линейную среднюю часть зависимости объёма элюции от десятичного логарифма молекулярной массы.

[https://en.wikipedia.org/wiki/Gel\\_permeation\\_chromatography](https://en.wikipedia.org/wiki/Gel_permeation_chromatography)

[https://www.cytivalifesciences.co.jp/tech\\_support/manual/pdf/17000001.pdf](https://www.cytivalifesciences.co.jp/tech_support/manual/pdf/17000001.pdf)



2. Что можно сказать о характере зависимости скорости реакции от концентрации фермента? (Ответ поясните). Какова концентрация алкогольдегидрогеназы в исходном растворе и во фракциях 1 и 2? Что можно сказать о концентрации фермента до и после разделения? В какую сторону она изменилась во фракциях и почему? ЭЗ

Ответ

Согласно уравнению Михаэлиса-Ментен зависимость начальной скорости реакции от концентрации фермента должна быть линейной, поэтому калибровка в практической части работы будет линейная

В неразведённом исходном препарате концентрация АДГ 0,725 мг/мл

Фракция 1 содержит 0,44 мг/мл АДГ

Концентрация фермента снизилась из-за разведения во время хроматографии. Фермент на колонке не связывается, его концентрация в процессе разделения с помощью эксклюзионной хроматографии может уменьшаться за счёт разведения.

Во фракции 2 фермента нет, так как вероятно произошло полное отделение высокомолекулярных компонентов



### Теоретические вопросы

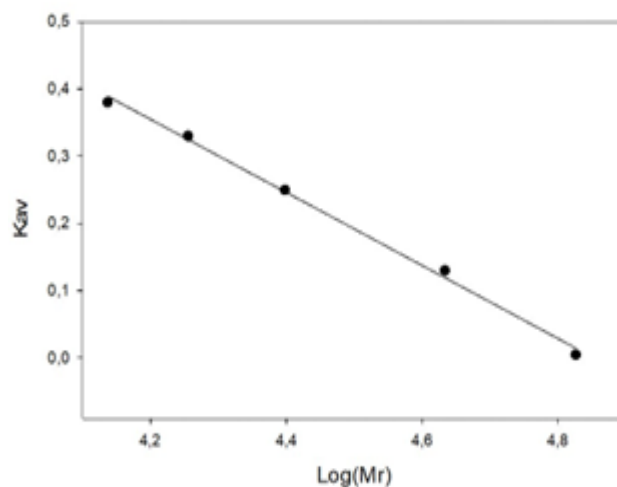
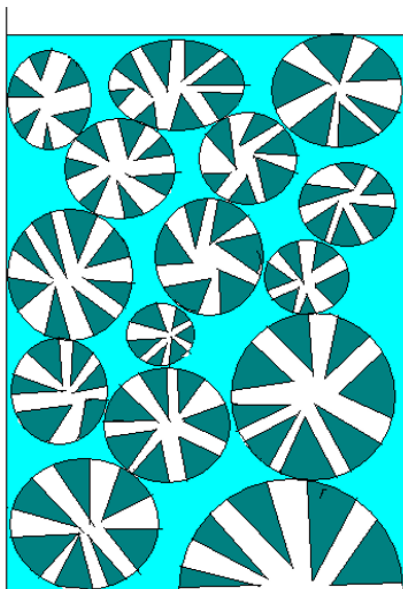
**(задание выполняется только после окончания практической части)**

1. На чём основан принцип разделения в данном виде хроматографии? Каковы требования к элюенту, к хроматографическому материалу, к разделяемым компонентам? **T2**

Ответ: Эксклюзионная хроматография (гельфилтрация) основана на разделении молекул по размерам (Стоксову радиусу). Хроматографическая матрица представляет собой пористые гранулы. Более мелкие молекулы разделяемых веществ способны проникать (диффундировать) в большее число пор, более крупные молекулы проникают в меньшую долю пор гранул. Наиболее крупные молекулы вообще не проникают в поры (выходят в мёртвом объёме). Существуют хроматографические матрицы с разным диапазоном размеров пор для разных диапазонов размеров разделяемых молекул. Правильное сочетание элюента, разделяемых веществ, типа хроматографической матрицы должно обеспечивать условие отсутствие адсорбции молекул на матрице. Неправильный выбор ионной силы раствора элюента, например, как слишком высокой так и слишком низкой может приводить к адсорбции молекул либо за счёт гидрофобных взаимодействий либо за счёт кулоновских взаимодействий между зарядами молекул в растворе и полярными группами полимера гидрофильной матрицы.

2. Как связана некая характеристика (указать, что это за характеристика) компонентов разделяемой смеси с объёмом элюирования каждого компонента (или временем элюирования) в данном виде хроматографии? Приведите зависимость (формулу). Как выглядят градуировочные зависимости в данном методе при определении характеристик неизвестного компонента разделяемой смеси, например, неизвестного белка? **T2**

Ответ: Расчёт коэффициента доступности  $K_{av}$ :  $V_c$  общий объём колонки,  $V_0$  мёртвый объём (объём элюции вещества, которое не проникает в гранулы, бирюзовый цвет на схеме)  $V_i$  объём элюции исследуемого вещества (суммарно: бирюзовый и зелёный цвета на схеме, белым цветом обозначена внутренняя часть гранулы, которая недоступна для любых компонентов раствора)  $K_{av} = (V_i - V_0) / (V_c - V_0)$ . Пример градуировочного графика для Sephadex G75 (Зависимость  $K_{av}$  от десятичного логарифма молекулярной массы)





3. Какая реакция лежит в основе метода измерения активности? Какое вещество определяется по поглощению при длине волны 340 нм? **T1**

Ответ

$$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{Алкогольдегидрогеназа}} \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH}$$

Алкогольдегидрогеназа

NAD <sup>+</sup>	NADH

[https://www.bioserendipity.com/anti-aging-supplements-ii/nad\\_nadh/](https://www.bioserendipity.com/anti-aging-supplements-ii/nad_nadh/)

4. Можно ли, измеряя активность данного фермента, определять концентрацию этанола в неизвестном растворе? Если можно, то как должна быть построена схема эксперимента? Если вариантов несколько, то это также описать. **T1**

Ответ

Два варианта:

- По начальной скорости реакции для разных концентраций этанола при фиксированной концентрации АДГ и фиксированной (желательно насыщающей) концентрации НАД
- По количеству НАДН при полном превращении этанола в присутствии АДГ при избытке НАД



5. Можно ли, измеряя активность данного фермента, определять концентрацию НАД<sup>+</sup> в неизвестном растворе? Если можно, то как должна быть построена схема эксперимента? Если вариантов несколько, то это также описать. **T1**

Ответ

Два варианта:

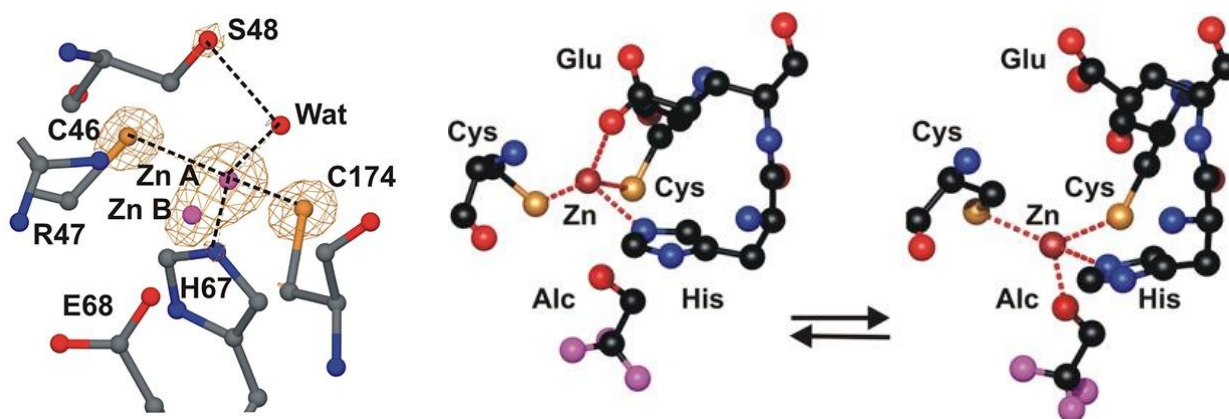
1. По начальной скорости реакции для разных концентраций НАД при фиксированной концентрации АДГ и фиксированной (желательно насыщающей) концентрации этанола
2. По количеству НАДН при полном превращении этанола в присутствии АДГ при избытке этанола

6. Какие аминокислотные остатки участвуют в катализе в активном центре этого фермента? **T2**

Ответ

Цистеин, гистидин, глутаминовая кислота

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5518280/>

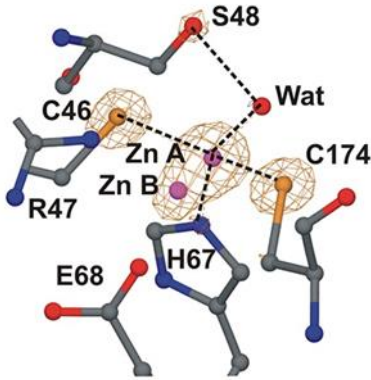




7. Есть ли какие-либо ионы металлов, которые участвуют в катализе в активном центре данного фермента? **T1**

Ответ

Два иона  $Zn^{2+}$



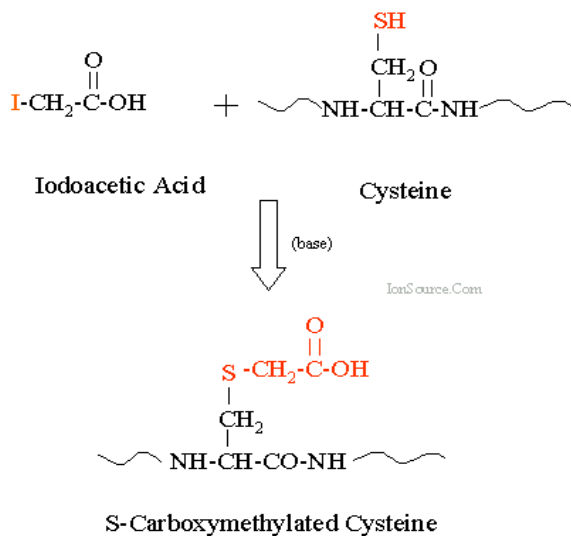
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5518280/>

8. Какие вещества могут быть обратимыми ингибиторами или же каталитическими ядами для данного фермента и почему? **T2**

Ответ Например, иодацетат, иодацетамид

Собственно иодацетатом часто титруют (определяют число) активные центры в ферментах с остатком цистеина, который участвует в катализе

Также хелатирующие агенты могут влиять на активность, связывая  $Zn^{2+}$ , однако их концентрацию и условия воздействия на фермент нужно внимательно подбирать ввиду прочности комплекса фермента с  $Zn^{2+}$



<https://www.ionsource.com/Card/cmc/cmc.htm>



9. Что Вам известно о субстратной специфичности данного фермента? **T1**

Ответ

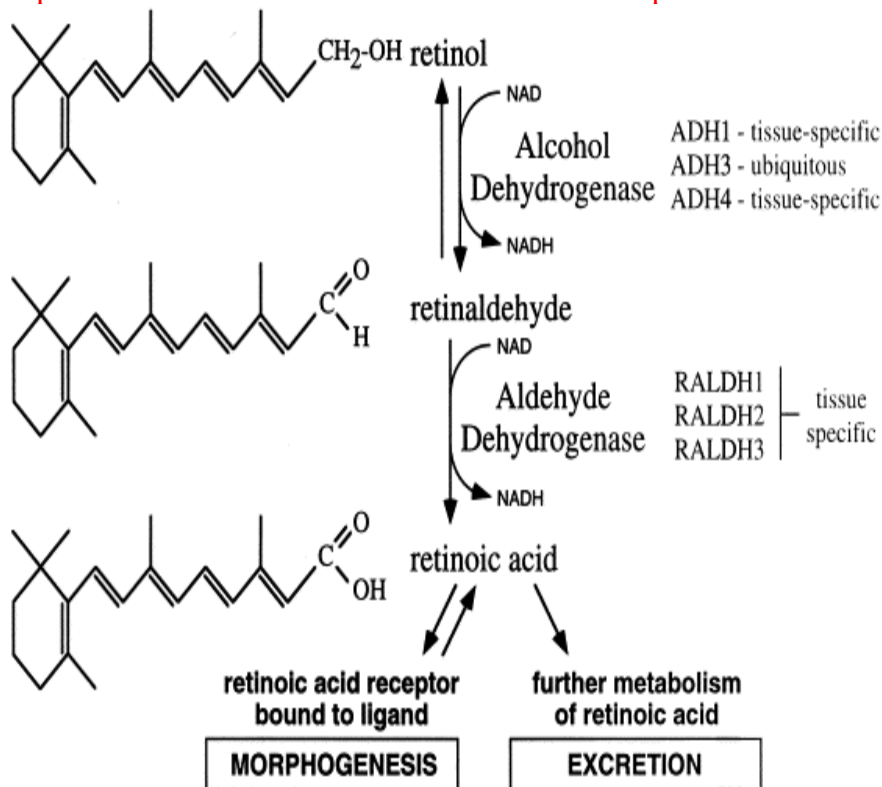
Имеется широкая специфичность по спиртам (этанол, метанол, пропанол, изопропанол итд)  
 По второму субстрату (коферменту) НАД<sup>+</sup> строгая специфичность, с НАДФ<sup>+</sup> фермент не работает.

10. Что Вам известно о физиологической роли данного фермента? **M1**

Ответ Витамин А, этанол (некоторые другие спирты, которые могут попасть в организм и их химические превращения в присутствии АДГ могут приводить к тяжёлым отравлением, например с метанолом до летального исхода или изопропанолом с большим вредом для организма)

<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0009279702002041-gr1.gif>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279702002041>



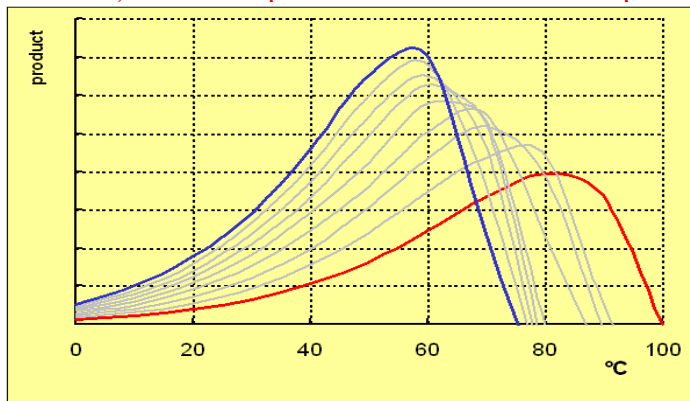




11. Какой характер зависимости от температуры для скорости реакции в присутствии данного фермента можно ожидать и почему? **M1**

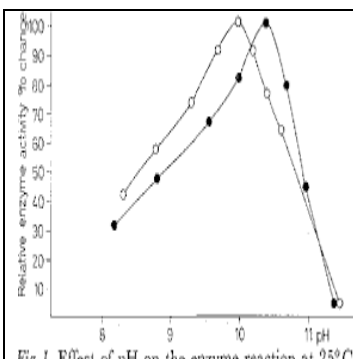
**Ответ** Как и другими химическими реакциями можно приближённо сказать, что сначала рост 2-4 раза на каждые 10°C. Затем при определённой температуре фермент начинает инактивироваться и денатурировать. Для разных ферментов различается температура, при которой идёт сравнительно быстрая инактивация и денатурация. Большинство ферментов относительно стабильны при температурах ниже 50°C, некоторые из них выдерживают десятки минут инкубации при температурах 60-70°C. С сети «интернет» имеется много ошибочных выдуманных иллюстраций, где ферменты быстро инактивируются в физиологических условиях (рН, ионная сила итд) при температурах, близких температуре тела, уже начиная с 37-40°C.

Если регистрировать количество продукта ферментативной реакции за единицу времени при разных температурах, то можно наблюдать зависимость с максимумом (температурным оптимумом). Положение оптимума будет зависеть от условий эксперимента, так как, например при инкубации 10 мин большая доля фермента перейдёт в неактивное состояние по сравнению с 1 минутой. Для 1 минуты фермент будет иметь большую «кажущуюся термостабильность». «Температурный оптимум» не является корректным понятием в физхимии. Истинную температуру фазовых переходов в белках (плавление в структурах доменов) можно определить с помощью калориметрии.



<https://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzass/temperature.htm>

12. Какой характер зависимости от рН для скорости реакции в присутствии данного фермента можно ожидать и почему? **T1**



**Ответ**

Если в активном центре фермента имеется несколько ионогенных групп, некоторое из которых для осуществления катализа должны быть протонированном состоянии, а другие в депротонированном состоянии, то наблюдается зависимость активности от рН с максимумом (рН оптимумом активности)

<https://www.nature.com/articles/pr196716.pdf>



**Оценивание соблюдения правил техники безопасности и аккуратности при выполнении экспериментальной работы.**

Максимум 2 технических балла. (1 балл в случае незначительных нарушений или неаккуратности при выполнении работы, 0 баллов – в случае грубых нарушений техники безопасности).

Оценка ТБ:		
------------	--	--

**Общая схема оценивания**

**Вопросы категории Э** – оценивание эксперимента. Суммарно 28 первичных баллов, умножается на коэффициент 2 – итого максимум **56 баллов**.

**Вопросы категории Т** – теоретические вопросы. Суммарно 14 первичных баллов, умножается на коэффициент 2 – итого максимум **28 баллов**.

**Вопросы категории М** – творческие вопросы. Суммарно 2 первичных баллов, умножается на коэффициент 3 – итого максимум **6 баллов**.

**Оценивание ТБ** – техника безопасности и аккуратность выполнения работ.

Суммарно 2 балла, умножается на коэффициент 5 – итого максимум **10 баллов**.

**ИТОГО за финал максимум 100 баллов.**