

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов. Изучение влияния активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны.

Цель: Определить присутствие в растворе ряда химических соединений, одни из которых повышают активность ферментов (активаторы), другие, напротив, действуют на них угнетающим образом (ингибиторы).

Активность ферментов, помимо температуры и pH, в значительной степени зависит от наличия и концентрации в реакционной среде некоторых ионов и соединений. Одни из них усиливают активность ферментов – активаторы, другие действуют угнетающе – ингибиторы.

Одни из регуляторов – активаторы, присоединяясь к молекуле неактивного или малоактивного фермента, увеличивают активность до максимальной. Эту функцию часто выполняют ионы металлов: калия, кальция, магния, цинка, меди, железа, марганца, кобальта и анион хлора. Ряд протеиназ (папаин) и аргиназа активируются молекулами цистеина, восстановленного глутатиона, имеющими свободную HS-группу. Нарастание активности ферментов под действием металлов объясняется тем, что в одних случаях ионы металлов выполняют роль кофакторов, в других – облегчают образование фермент-субстратного комплекса, в третьих – способствуют присоединению кофермента к апоферменту, в четвертых обеспечивают стабилизацию третичной и четвертичной структуры фермента.

Вещества, вызывающие частичное или полное торможение ферментных реакций, называют ингибиторами. К таким веществам относятся соли и ионы тяжелых металлов, дубильные вещества и др. Ключевые (регуляторные) ферменты имеют аллостерический центр для присоединения активаторов и ингибиторов, которые, присоединившись, вызывают обратимое изменение в структуре активного центра. Аллостерические ферменты выполняют важную роль в регуляции процессов метаболизма. Установлено, роль активаторов чаще всего в этом случае выполняют молекулы собственного субстрата, но из первых реакций (так называемое ингибирование по типу обратной связи).

Реактивы: Вода дистиллированная; слюна в разведении 1:5; растворы с массовыми долями: крахмала 1 %-го; хлорида натрия 1 %-го; сульфата меди 1 %-го; серной (или соляной) кислоты 10 %-й; раствор йода в йодиде калия.

Ход работы. В качестве источника фермента используют раствор слюны (предварительное разведение 1:5).

В штативе располагают тремя рядами 18 пробирок (6 пробирок в каждом ряду). Пробирки каждого ряда нумеруют и во все вносят по 0,5 мл воды. Затем в первую пробирку добавляют 0,5 мл раствор слюны (предварительное разведение 1:5), тщательно перемешивают и 0,5 мл смеси из пробирки 1 переносят в пробирку 2. Содержимое тщательно перемешивают и 0,5 мл смеси из пробирки 2 переносят в пробирку 3 и т.д. Из последней пробирки 0,5 мл смеси после перемешивания выливают. Таким образом,

получается ряд разведений, в котором содержание слюны в каждой следующей пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей.

После разбавления во все пробирки первого ряда наливают по 0,5 мл воды (контрольный ряд), в пробирки второго ряда – по 0,5 мл раствора с массовой долей хлорида натрия 1 % и в пробирки 3-го ряда – по 0,5 мл раствора с массовой долей сульфата меди 1 %. Затем во все пробирки приливают по 0,5 мл раствора с массовой долей крахмала 1 % в следующем порядке: сначала в первые пробирки всех рядов, после этого во вторые пробирки всех рядов и т.д. Содержимое перемешивают встряхиванием и штатив с пробирками ставят в термостат при 37–38°C на 30 мин. По окончании инкубации в пробирки каждого ряда добавляют по 0,5 мл раствора с массовой долей серной (или соляной) кислоты 10 %-й и по 3 капли раствора йода в том же порядке, в каком приливался раствор крахмала. Содержимое перемешивают и отмечают в каждом ряду номер пробирки, в которой реакция на крахмал отрицательная (желтое окрашивание). Результаты опыта заносят в таблицу, обозначив желтые тона буквой «Ж», красные (красно-коричневые) – «К», фиолетовые – «Ф» и синие – «С».

Таблица 1

Окраска проб с йодом после инкубации

Компоненты	Номера пробирок и разведение содержимого					
	1	2	3	4	5	6
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Вода						
Хлорид натрия						
Сульфат меди						

Определяют активатор и ингибитор. Разделив степень разведения контрольной пробы (первый ряд), в которой реакция с йодом отрицательная, на степень разведения проб, давших отрицательную реакцию с исследуемыми веществами, находят во сколько раз активатор или ингибитор стимулирует или тормозит действие амилазы.

Примечание. При высокой активности амилазы слюны число пробирок в опыте увеличивают до 7–8.