

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тульский государственный университет»

Методические указания
для студентов очной формы обучения
к лабораторным работам
по биологической химии

Тула
Издательство ТулГУ
2016

УДК 581

Составители: В.В. Строителев, О.Н. Понаморева, О.А. Каманина, Е.В. Акатова, Е.Е. Бабкина. Методические указания для студентов очной формы обучения к лабораторным работам по биологической химии. Тула: Изд-во ТулГУ, 2016. 90 с.

ISBN 978-5-7679-3359-4

Приведены 54 лабораторные работы, выполнение которых будет способствовать усвоению студентами теоретического материала по курсу “Биологическая химия” и приобретению навыков работы в биохимической лаборатории. Направление подготовки: 060101 Лечебное дело.

Печатается по решению библиотечно-издательского совета
Тульского государственного университета

© В.В. Строителев, О.Н. Понаморева, О.А. Каманина,
Е.В. Акатова, Е.Е. Бабкина, 2016

ISBN 978-5-7679-3359-4 © Издательство ТулГУ, 2016

Оглавление

Раздел I. Строение и свойства белков	6
Методы выделения и очистки белков	6
Лабораторная работа № 1. Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка методом высаливания	6
Лабораторная работа № 2. Обессоливание раствора яичного альбумина методом диализа.....	7
Физико-химические свойства белков.....	8
Лабораторная работа № 3. Осаждение белков. Денатурация белков	8
Анализ аминокислотного состава белков. Цветные реакции на белки	9
Лабораторная работа № 4. Сравнение аминокислотного состава различных белков.....	10
Количественный анализ белков	17
Лабораторная работа № 5. Количественное определение общего белка сыворотки крови биуретовым методом	18
Лабораторная работа № 6. Количественное определение белка по методу Лоури	19
Лабораторная работа № 7. Количественное определение белка по методу Брэдфорда.....	21
Раздел II. Строение и свойства ферментов	22
Специфичность действия ферментов	23
Лабораторная работа № 8. Абсолютная субстратная специфичность уреазы....	23
Лабораторная работа № 9. Специфичность действия амилазы и сахаразы	24
Лабораторная работа №10. Влияние температуры на активность ферментов ...	25
Лабораторная работа №11. Влияние ингибиторов на активность ферментов....	26
Раздел III. Витамины	26
Лабораторная работа № 12. Качественные реакции на витамины.....	27
Лабораторная работа № 13. Количественное определение аскорбиновой кислоты в растительном сырье	30
Лабораторная работа № 14. Количественное определение аскорбиновой кислоты в биологических жидкостях.....	32
Раздел IV. Энергетический обмен и общий путь катаболизма	33
Окислительное фосфорилирование как основной механизм синтеза АТФ.....	33
Лабораторная работа № 15. Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной активности	33
Лабораторная работа № 16. Количественное определение макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфата)	34
Общий путь катаболизма. Биологическое окисление.	36
Лабораторная работа № 17. Обнаружение тирозиназы в картофеле.....	36
Лабораторная работа № 18. Открытие каталазы крови.....	37
Лабораторная работа № 19. Открытие альдегидоксидазы в сыром молоке	38
Лабораторная работа № 20. Открытие пероксидазы в хрене, картофеле, молоке	38

Лабораторная работа № 21. Обнаружение цитохромоксидазы в мышечной ткани	39
Раздел V. Метаболизм углеводов	40
Строение, свойства, функции углеводов	40
Лабораторная работа № 22. Выделение гликогена из печени	40
Лабораторная работа № 23. Определение активности α -амилазы в сыворотке крови амилаклатическим методом	41
Лабораторная работа № 24. Энзиматический метод количественного определения глюкозы в крови	42
Лабораторная работа № 25. Экспресс-определение глюкозы в крови с использованием глюкометра	44
Лабораторная работа № 26. Количественное определение пировиноградной кислоты в крови	47
Лабораторная работа № 27. Выявление гликолиза в мышечной ткани	49
Раздел VI. Обмен липидов	50
Основные классы липидов и их функции	51
Лабораторная работа № 28. Исследование кинетики действия липазы поджелудочной железы	51
Обмен холестерина	51
Лабораторная работа № 29. Определение общего холестерина в сыворотке крови энзиматическим колориметрическим методом	51
Липопротеины. Патология и регуляция липидного обмена	53
Лабораторная работа № 30. Определение содержания β - и пре- β -липопротеинов сыворотки крови турбодиметрическим методом по Бурштейну и Самой	53
Лабораторная работа № 31. Определение холестерина в α -липопротеинах	54
Лабораторная работа № 32. Измерение диеновых конъюгатов (ДК) в плазме крови по УФ-поглощению гептановых экстрактов	55
Лабораторная работа № 33. Определение перекисей в липидах плазмы крови в реакции с тиобарбитуровой кислотой по Э.Н. Коробейниковой	55
Лабораторная работа № 34. Определение общей антиокислительной активности сыворотки крови по Г.И.Клебанову, И.Б.Бабенковой, Ю.О.Теселкину, О.С.Комарову, Ю.А.Владимирову	56
Раздел VII. Обмен белков	58
Источники и пути использования аминокислот в тканях. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте	58
Лабораторная работа № 35. Исследование кислотных компонентов желудочного сока	58
Лабораторная работа № 36. Определение активности катепсинов в сыворотке крови по методу А.А.Покровского, А.И.Арчакова и О.Н.Любимцевой	60
Обмен аминокислот. Образование и обезвреживание аммиака	61
Лабораторная работа № 37. Определение мочевины в сыворотке крови	61
Преобразование аминокислот. Образование и функции биогенных аминов	64
Лабораторная работа № 38. Количественное определение креатинина в сыворотке крови и моче по цветной реакции Яффе (методом Поппера и др.) ...	64

Лабораторная работа № 39. Определение гистамина в крови с диазотированным п-нитроанилином.....	66
Раздел VIII. Обмен нуклеотидов и нуклеиновых кислот	67
Лабораторная работа № 40. Определение содержания мочевой кислоты в сыворотке крови по методу Мюллера и Зейфerta.....	67
Лабораторная работа № 41. Определение активности кислой дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) в сыворотке крови по А.А.Покровскому, А.И.Арчакову и О.Н.Любимцевой	69
Биосинтез белка. Регуляция экспрессии генов. Генные мутации	70
Лабораторная работа № 42. Основы метода полимеразной цепной реакции.....	70
Раздел IX. Биохимия гормонов	71
Общая характеристика гормонов, их структура и функции	71
Лабораторная работа № 43. Качественные реакции на гормоны.....	71
Лабораторная работа № 44. Изучение влияния гормонов (адреналина и инсулина) на содержание глюкозы в крови.....	74
Нарушение обмена веществ при сахарном диабете. Диагностика сахарного диабета.....	76
Лабораторная работа № 45. Определение содержания гликированного гемоглобина в крови фотоколориметрическим методом.....	76
Лабораторная работа № 46. Качественное определение кетоновых тел в моче.....	77
Раздел X. Биохимия органов и тканей	78
Биохимия крови	79
Лабораторная работа № 47. Определение гемоглобина в крови.....	79
Лабораторная работа № 48. Определение “средних” молекул (СМ) в сыворотке крови по методу Н.И.Габриэлян и В.И.Липатовой.....	81
Лабораторная работа № 49. Определение веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ) по М.Я.Малаховой	81
Биохимическое исследование функций печени	82
Лабораторная работа № 50. Определение активности аспартат- и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови.....	83
Лабораторная работа № 51. Количественное определение общего билирубина в сыворотке крови	84
Лабораторная работа № 52. Тимоловaя проба	85
Биохимия соединительной ткани	86
Лабораторная работа № 53. Определение содержания свободного гидроксипролина в моче по Нейману и Логану в модификации П.Н.Шараева	86
Лабораторная работа № 54. Определение сиаловых кислот в сыворотке крови методом Гесса	87
Литература	89

Раздел I. Строение и свойства белков

Задачи раздела:

- 1) изучение физико-химических свойств белков и знакомство с некоторыми методическими приемами, используемыми при выделении и очистке белков (центрифугирование, высаливание, обессоливание), основанными на физико-химических свойствах белков;
- 2) овладение методами анализа аминокислотного состава белков с помощью цветных реакций и методом хроматографии;
- 3) знакомство с основными методами количественного определения белка в растворе для использования их на практике;
- 4) научиться использовать знания о структурном и функциональном многообразии белков, об изменениях белкового состава органов и тканей в норме и при болезнях для объяснения нормальных функций организма и их нарушений при патологии.

Методы выделения и очистки белков

Лабораторная работа № 1. Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка методом высаливания

Белки как вещества высокомолекулярные образуют коллоидные растворы. Растворимость белков в воде определяется наличием гидрофильных остатков аминокислот, входящих в состав белков. Важную роль играет форма белковых молекул (соотношение длинной и короткой осей). Поскольку гидрофильные остатки могут быть заряженными, большое значение имеет также наличие у молекул величины одноименного заряда. Воздействия, влияющие на гидратацию, заряд или форму белковых молекул, изменяют и растворимость. К числу таких воздействий относится, в частности, добавление в раствор солей, которые являются сильными электролитами. При добавлении сильных электролитов в раствор белков очень часто наблюдается осаждение некоторых белковых фракций. Это связано с тем, что заряженные коллоидные частицы белка адсорбируют ионы противоположного заряда. В результате частицы теряют свои заряды и электростатическое отталкивание, коллоидные частицы белка слипаются и выпадают в осадок. Такое осаждение белка из раствора называется **высаливанием**. Поскольку разные белки имеют разный суммарный заряд и форму, то и осаждаются при разной концентрации соли. Этот метод используется для фракционирования белков. Для высаливания чаще всего используют сульфат аммония, отличающийся очень высокой ионной силой, а также сульфат натрия, хлорид натрия и другие соли.

Метод высаливания белков широко используется в научно-исследовательских лабораториях при выделении, очистке различных белков (ферментов, гормонов и др.) и в производственных условиях для получения белковых препаратов.

Материал исследования: 3%-ный раствор яичного белка в 1%-ном растворе NaCl.

Реактивы и оборудование: дистиллированная вода, уксусная кислота (1%-ный раствор), хлорид натрия (сухой порошок), сульфат аммония (насыщенный раствор), сульфат аммония (сухой порошок), штативы с пробирками, воронки, пипетки, бумажные фильтры, спиртовки.

Ход работы: 1. К 1 мл раствора яичного белка добавляют 9 мл дистиллированной воды. Наблюдают помутнение раствора вследствие выпадения осадка глобулинов.

2. К 1 мл яичного белка добавляют NaCl до насыщения. Выпадает белый аморфный осадок глобулинов. Через 10 мин осадок отфильтровывают. Пробирку с фильтратом кипятят. Наблюдают выпадение альбумина.

3. К 1 мл раствора яичного белка добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, наблюдают выпадение осадка глобулинов. Осадок отфильтровывают и к фильтрату добавляют порошок сульфата аммония. Образуется осадок яичного альбумина, который всплывает вверх вследствие высокой плотности водного раствора.

Оформление работы:

№ опыта	Название белка	Степень насыщения, другие условия опыта	Результат опыта

Лабораторная работа № 2. **Обессоливание раствора яичного альбумина методом диализа**

Осадки белка, полученного при высаливании, обычно очищают от примесей солей методом **диализа** или **гель-фильтрации**. В основе этих методов лежит различие в молекулярной массе белка и соли.

Диализом называется процесс разделения высокомолекулярных веществ и низкомолекулярных веществ с помощью полупроницаемых мембран (целлофана, пергамента и др.). Обладая большим диаметром, белковые молекулы не способны проникать через такие мембраны, в то время как частицы низкомолекулярных веществ легко проходят через них. Способ диализа положен в основу аппарата «искусственная почка», которая применяется для очищения крови от шлаков и токсических веществ.

Материал исследования: яичный альбумин, 3%-ный раствор.

Реактивы и оборудование: сульфат аммония, хлорид натрия, раствор нитрата серебра, раствор хлорида бария, нингидрин, водяная баня, стакан вместимостью 300 мл, целлофан, стеклянная трубочка диаметром 10 мм, стеклянные палочки, нитки, ножницы, пипетки, пробирки.

Ход работы. 1. Из целлофана вырезать круг диаметром 20 см и сделать диализный мешочек, собрав края вырезанной фигуры вокруг стеклянной трубочки и обвязав их ниткой.

2. Диализный мешочек привязывают к палочке и опускают в стакан с дистиллированной водой (рис 1).

3. Через трубочку заполняют мешочек раствором белка, так чтобы уровень жидкости в мешочке был ниже уровня воды в стакане. К раствору белка в мешочке добавляют немного соли NaCl (или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

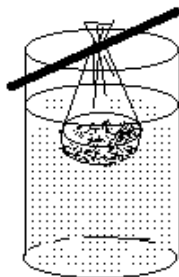


Рис.1 Диализатор в рабочем состоянии

4. Через 1 час от начала диализа берут в две пробирки по 1 мл жидкости из стакана и проделывают две реакции:

а) на присутствие ионов Cl^- (или SO_4^{2-}): добавляют в первую пробирку раствор AgNO_3 (или соответственно BaCl_2). Наблюдают образование белого осадка.

б) на присутствие белка: добавляют во вторую пробирку кристаллик нингидрина, нагревают на водяной бане при 70°C , отмечают результат.

5. Жидкость из мешочка сливают в пробирку, отбирают 1 мл и проделывают нингидриновую реакцию.

Оформление работы. Кратко записывают ход выполнения работы и результаты, зарисовывают диализатор, записывают проделанные реакции, делают вывод.

Физико-химические свойства белков

Белки – полимерные молекулы, поэтому они имеют определенную форму и размеры и обладают различными физическими свойствами, основанными на ионизации и гидратации белков. К таким свойствам можно отнести растворимость белков, их поведение в электрическом или гравитационном полях, различную плотность в гидратированном состоянии. Многие методы выделения и очистки белка, рассмотренные выше, основаны на этих физико-химических свойствах.

Лабораторная работа № 3. Осаждение белков. Денатурация белков

Белки могут быть высажены из раствора не только под действием сильных электролитов, но и с помощью других методов, например: добавлением к раствору белка солей тяжелых металлов, минеральных кислот, а также при нагревании.

Осадочные реакции на белки применяются для обнаружения и количественного определения белков в различных субстратах.

Опыт 1. Осаждение белков солями тяжелых металлов.

Материал исследования: 1% раствор яичного альбумина.

Реактивы и оборудование: 10 % раствор сульфата меди, штатив с пробирками.

Ход работы. В пробирку к 5 каплям раствора белка прибавить 1 каплю раствора сульфата меди. Избыток раствора соли приведет к растворению белка.

Опыт 2. Осаждение белков при нагревании.

Материал исследования: 1% раствор яичного альбумина.

Реактивы и оборудование: 1% и 10% растворы уксусной кислоты, 10% раствор гидроксида натрия, насыщенный раствор хлорида натрия, штатив с пробирками, спиртовки.

Ход работы. В пять пробирок наливают по 0,5 мл раствора яичного альбумина.

1. Содержимое первой пробирки нагревают до помутнения раствора.

2. К раствору белка во второй пробирке добавляют одну каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Выпадает хлопьевидный осадок. Это объясняется тем, что при добавлении к коллоидному раствору белка кислоты мицеллы теряют заряд, белок при этом находится в изоэлектрическом состоянии.

3. В третью пробирку добавляют 1-3 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок при этом не образуется.

4. В четвертую пробирку добавляют 1-2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия, нагревают. Выпадает осадок белка.

5. В пятую пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида и нагревают. Осадок не образуется. Объясните эти факты. *Оформление работы.* Результаты опытов заносят в таблицу. Делают выводы.

№ пробирки	Среда	Наблюдаемые изменения
1	CuSO_4	
2	Нейтральная	
3	Слабокислая (1% раствор CH_3COOH)	
4	Кислая (10% раствор CH_3COOH)	
5	Кислая (10% раствор $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NaCl}$)	
6	Щелочная (10% раствор NaOH)	

Анализ аминокислотного состава белков. Цветные реакции на белки

Качественные реакции (или цветные реакции) используются в клинико-биохимических лабораториях, фармацевтической практике и биохимических исследованиях для обнаружения присутствия белка и аминокислот в биологических средах, качественного анализа белковых лекарственных

средств. Многие качественные реакции положены в основу методов количественного определения белков и аминокислот.

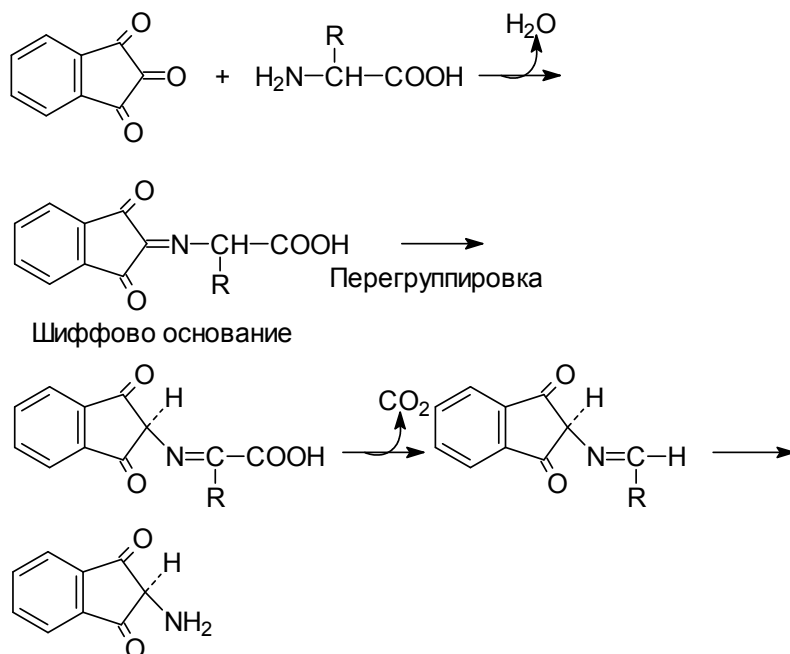
Лабораторная работа № 4. Сравнение аминокислотного состава различных белков

Состав аминокислот определяет не только свойства белка, но и его питательную ценность. Биологически полноценными считаются белки, содержащие все незаменимые аминокислоты

Материал исследования: раствор яичного белка (яичный альбумин), раствор желатина (коллаген), сыворотка молока (альбумины, глобулины и др.), растворы аминокислот.

Опыт 1. Нингидриновая реакция.

В результате взаимодействия аминокислоты с нингидрином образуется окрашенное соединение. При нагревании до 70°C аминокислоты окисляются нингидрином и подвергаются окислительному деаминарованию с



образованием аммиака и декарбоксилированию с образованием CO₂:

Восстановленный нингидрин, конденсируясь с аммиаком и окисленным нингидрином и образует соединение, которое переходит в окрашенную енольную форму, имеющую сине-фиолетовую окраску.

Реактивы и оборудование: 1% раствор нингидрина в 95% ацетоне, термостат (t=70°C), пробирки, пипетки.

Ход работы. В одну пробирку вносят 0,5 мл раствора аминокислоты, во вторую 1 мл раствора яичного альбумина, в третью 1 мл 1% раствора желатина, в четвертую – молочную сыворотку. Во все пробирки добавляют по 2 капли раствора нингидрина, содержимое пробирок тщательно перемешивают и нагревают на водяной бане при 70°C в течение 5 минут.

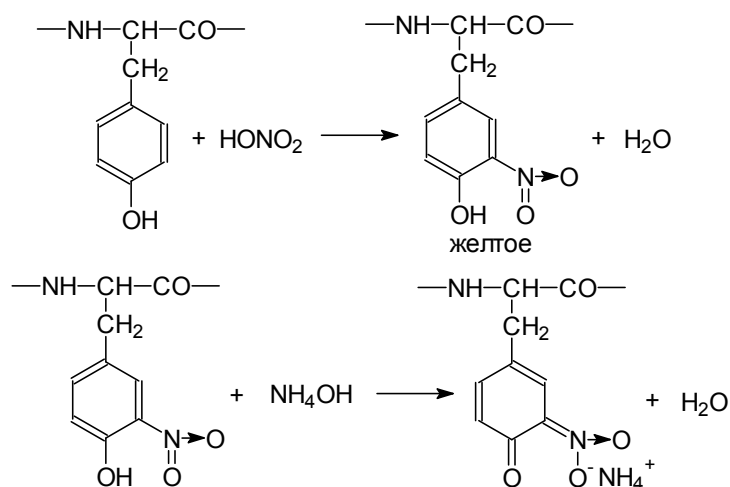
Оформление работы. В журнале отмечают цвет раствора после проведения реакции во всех пробирках.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

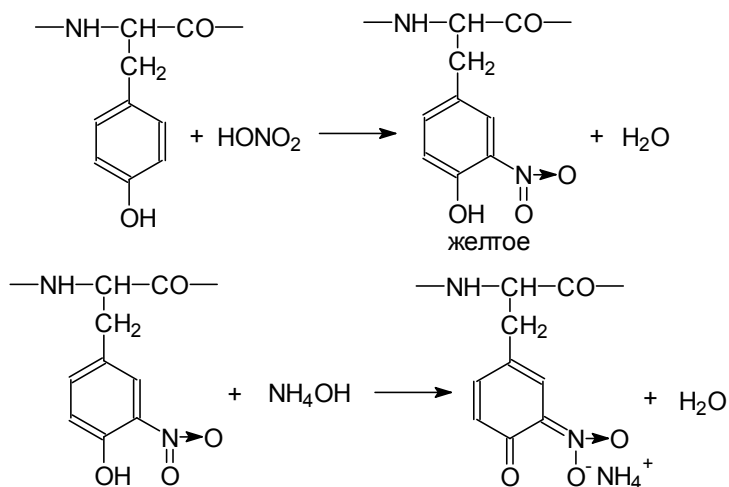
Опыт 2. Ксантопротеиновая реакция.

Ксантопротеиновая реакция происходит только при наличии ароматических аминокислот в белках (фенилаланина, триптофана, тирозина), поэтому она является качественной на **ароматические аминокислоты**.

При нагревании с концентрированной азотной кислотой белки дают желтое окрашивание за счет образования нитропроизводных ароматических аминокислот. При подщелачивании раствором



аммиака желтое окрашивание переходит в оранжевое (образуются аммонийные соли хиноидной структуры).



Реактивы и оборудование: концентрированная азотная кислота, концентрированный раствор аммиака, кипящая водяная баня, пробирки, пипетки.

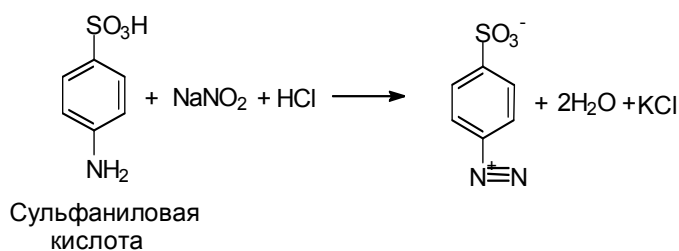
Ход работы. В одну пробирку наливают 5 капель раствора яичного белка, во вторую – раствора желатина, в третью – молочной сыворотки, в четвертую – 0,01% раствора тирозина. Во все пробирки добавляют по 3-5 капель концентрированной азотной кислоты и нагревают. В первой и третьей пробирках образуется белый осадок, который при нагревании окрашивается в желтый цвет и постепенно растворяется (происходит гидролиз белка). Пробирки охлаждают, к охлажденным растворам осторожно прибавляют по 10 капель концентрированного раствора аммиака.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

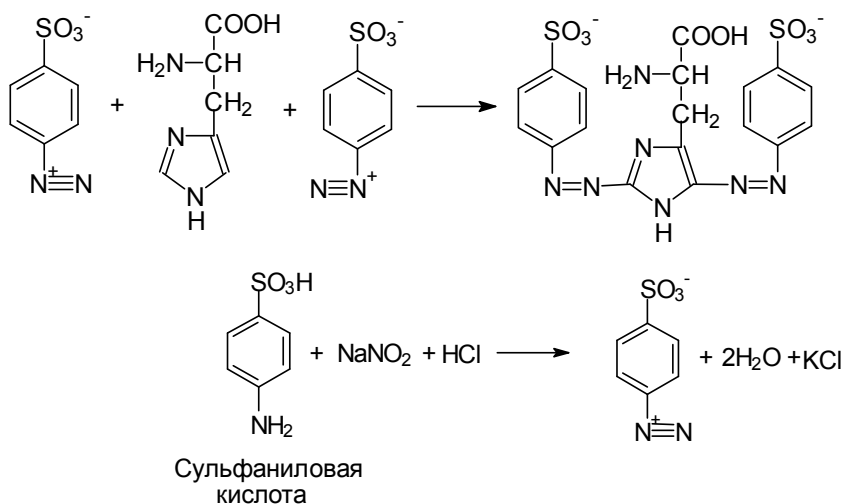
Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании ароматических кислот в анализируемых белках.

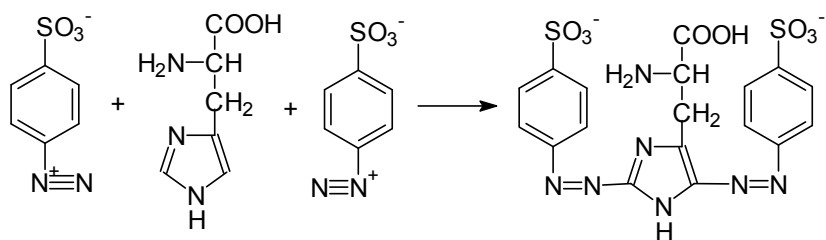
Опыт 3. Реакция на гистидин (реакция Паули)



При взаимодействии сульфаниловой кислоты в кислой среде с нитритом натрия происходит реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоновая кислота.



При реакции последней с гистидином образуется соединение вишнево-красного цвета:



Реактивы и оборудование: 1% раствор сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты, 0,5% раствор нитрита натрия, 10% раствор карбоната натрия, пробирки, пипетки.

Ход работы.

К 1 мл раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 2 мл раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают. Затем в одну пробирку добавляют 2 мл раствора желатина, во вторую 2 мл раствора яичного белка, в третью – молочную сыворотку, в четвертую – 0,01% раствор гистидина и во все пробирки по 6 мл раствора соды.

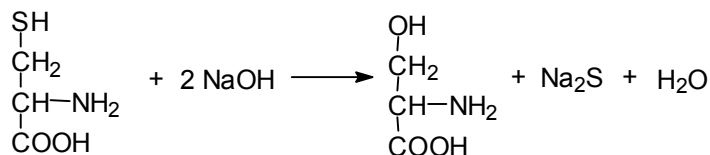
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании гистидина в анализируемых белках.

Опыт 4. Реакция на цистеин и цистин в белке (реакция Фоля).

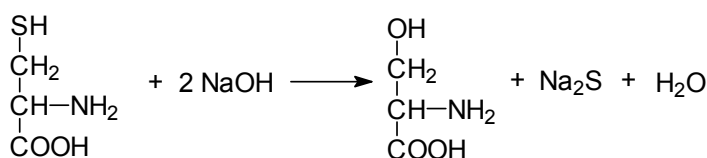
При кипячении цистеина и цистина в щелочной среде от них легко отщепляется сера в виде сероводорода, образующего сульфид натрия.



Цистеин

Серин

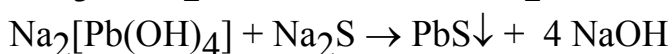
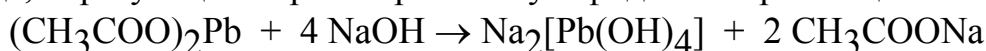
Образование сульфид-ионов можно обнаружить с помощью ионов



Цистеин

Серин

свинца, образующих нерастворимый сульфид PbS черного цвета.



Реактивы и оборудование: 30% раствор гидроксида натрия, 1% раствор ацетата свинца, кипящая водяная баня, пробирки, пипетки.

Ход работы. В одну пробирку наливают 5 капель раствора яичного белка, во вторую – раствора желатина, в третью – молочной сыворотки, в четвертую – 0,01% раствор цистеина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель раствора гидроксида натрия и по 1 капля раствора ацетата свинца и нагревают пробирки на кипящей водяной бане.

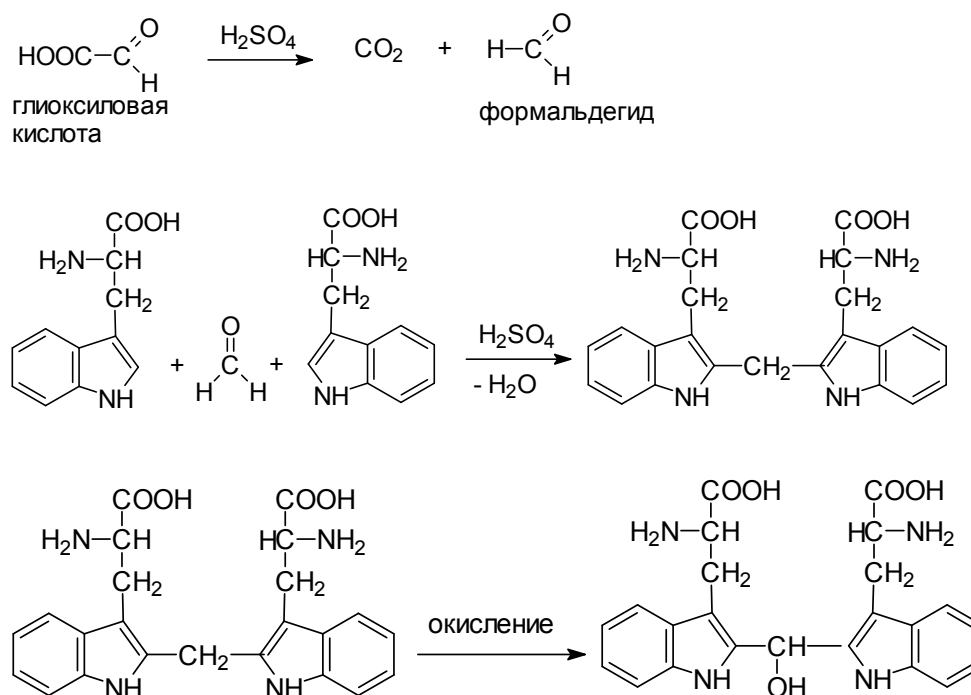
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

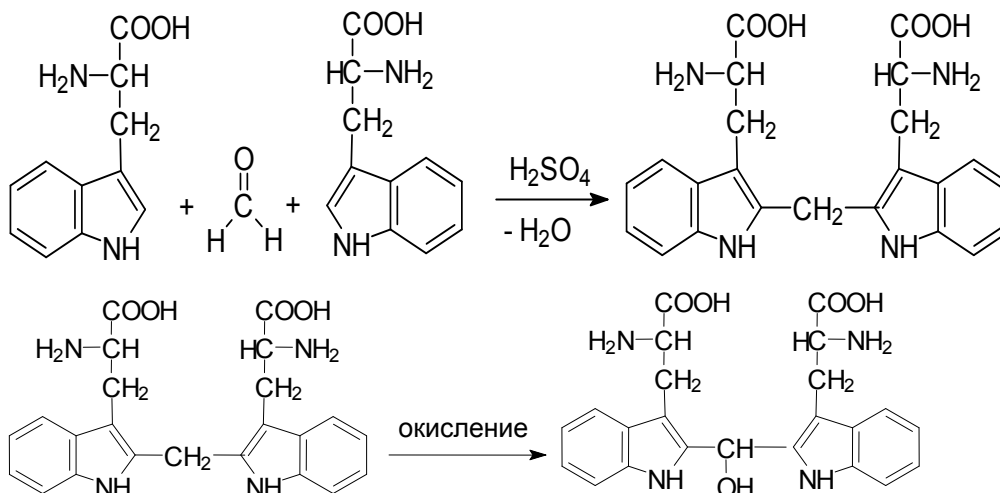
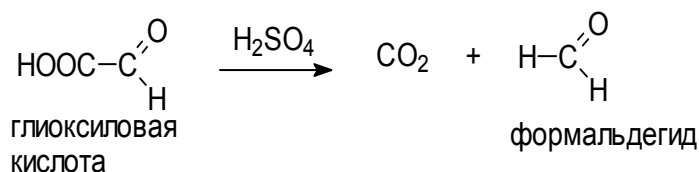
По результатам опыта делают вывод о содержании цистеина в анализируемых белках.

Опыт 5. Реакция на триптофан (Гопкинса-Коле или Адамкевича).

Триптофан в этой реакции конденсируется с формальдегидом, выделяющимся из глиоксиловой кислоты под действием концентрированной серной кислоты.



Продукт конденсации окисляется, в присутствии минеральных кислот образуются окрашенные в сине-фиолетовый цвет соли (явление галохромии).



Реактивы и оборудование: раствор глиоксиловой кислоты, 0,04М раствор сульфата меди(II), концентрированная серная кислота, ванночка со льдом, кипящая водяная баня, пробирки, пипетки.

Ход работы. В одну пробирку наливают 0,5 мл раствора яичного белка, во вторую – раствора желатина, в третью – молочной сыворотки, в четвертую – 0,01% раствора триптофана. В каждую пробирку добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты и 1 мл раствора глиоксиловой кислоты и по 10 капель раствора сульфата меди, перемешивают, и нагревают до растворения образующегося осадка. Осторожно приливают небольшими порциями по стенкам пробирок 2-3 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы жидкости не смешались. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании триптофана в анализируемых белках.

Опыт 6. Реакция на триптофан (Вуазена)

Белки, содержащие триптофан, дают в кислой среде в присутствии нитрита натрия и формальдегида сине-фиолетовое окрашивание. В этой реакции триптофан взаимодействует с формальдегидом с образованием продукта конденсации (бис-2-триптофанилметана), который окисляется нитритом натрия до бис-2-триптофанилкарбинола. Последний в присутствии минеральных кислот образует соли сине-фиолетового цвета.

Реактивы и оборудование: 2,5% раствор формальдегида; соляная кислота (плотность не менее 1,175); 0,5% раствор нитрита натрия; пробирки; пипетки.

Ход работы. К 2 мл раствора исследуемого белка добавляют 1 каплю 2,5% раствора формальдегида. К полученной смеси, тщательно перемешивая, добавляют осторожно по каплям 6 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку в ванночке со льдом. Через 10 минут добавляют, перемешивая, 10 капель 0,5% раствора нитрита натрия. Появляется сине-фиолетовая окраска.

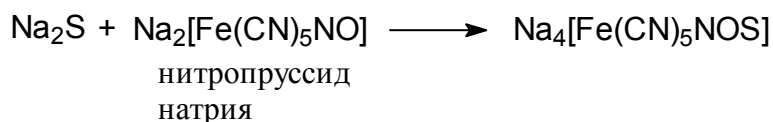
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании триптофана в анализируемых белках.

Опыт 7. Нитропруссидная реакция

Если раствор белка обработать щелочью и после охлаждения добавить свежеприготовленный раствор нитропруссид натрия, жидкость окрашивается в красный цвет. Реакция обусловлена присутствием в белке серусодержащих аминокислот, которые при кипячении со щелочью разрушаются с образованием сульфида натрия. Нитропруссид взаимодействует с сульфидом с образованием окрашенного комплекса:



Реактивы и оборудование: 5% раствор нитропруссид натрия; насыщенный раствор сульфата аммония; концентрированный раствор аммиака; пробирки; пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 5 капель растворов белков, 0,01% раствор цистеина, приливают равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и 2–3 капли нитропруссид натрия. Затем раствор подщелачивают несколькими каплями крепкого раствора аммиака.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

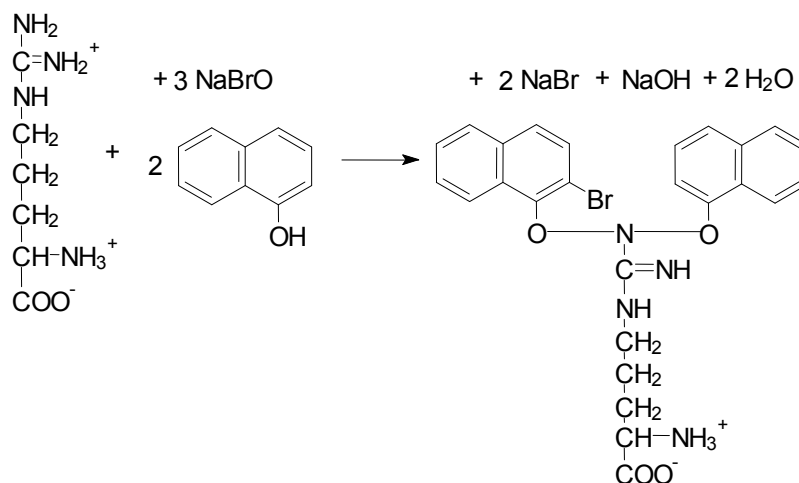
Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании цистеина в анализируемых белках.

Опыт 8. Реакция на аргинин (Сакагучи)

При добавлении к раствору белка щелочи, гипобромита и α -нафтола жидкость окрашивается в красный цвет.

Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислоты аргинина (гуанидиноаминовалериановой кислоты). В результате реакции образуется соединение красного цвета, представляющее собой продукт конденсации окисленного аргинина с α -нафтолом. Гипобромит играет роль окислителя и участвует в образовании промежуточного бромамидного соединения аргинина.



Реакция Сакагучи не является строго специфичной. Ее дают и другие монозамещенные гуанидины.

Реактивы и оборудование: 10% раствор гидроксида натрия; 0,2% спиртовой раствор α -нафтола; 2% раствор гипобромита натрия¹ насыщенный раствор сульфата аммония; концентрированный раствор аммиака; пробирки; пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 5 капель растворов белков и добавляют по 5 капель раствора щелочи, по 3 капли раствора α -нафтола и по каплям раствор гипобромита натрия. Присутствие аммиака и избыток гипобромита мешают реакции.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании аргинина в анализируемых белках

Количественный анализ белков

Для количественного определения белков в биологических жидкостях чаще всего используется спектральные методы исследования: **фотоколориметрия** и **спектрофотометрия**, а также – **рефрактометрический метод**.

¹ Гипобромит натрия имеет желтую окраску, бесцветный раствор не годится для этой реакции. Раствор следует плотно закрывать пробкой.

Фотоколориметрические методы основаны на цветных реакциях. Среди них наибольшее применение нашли биуретовая реакция на пептидные группы и реакция Фолина на аминокислоты тирозин и триптофан.

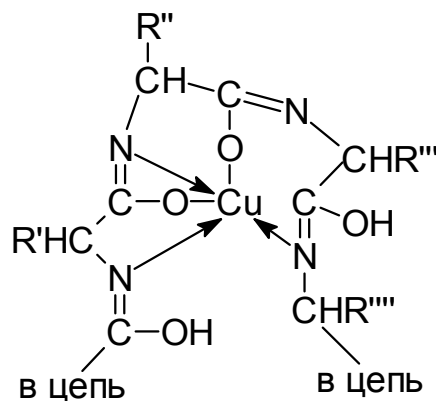
Прямой спектрофотометрический метод состоит в измерении светопоглощения раствора белка в ультрафиолетовой области при 200-220 нм и при 280 нм (зона поглощения ароматических аминокислот).

Лабораторная работа № 5. Количественное определение общего белка сыворотки крови биуретовым методом

Сыворотка крови содержит смесь белков, различных по физиологическому значению, структуре и физико-химическим свойствам (более 80 различных белков плазмы крови). Нормальное содержание белка в сыворотке крови (нормопротеинемия) составляет 65 – 85 г/л. Определение общего белка в сыворотке крови находит широкое применение в практической медицине, так как по изменению его нормального содержания можно судить об изменениях при различных нарушениях в организме. Повышенное содержание белка (гиперпротеинемия) бывает относительно редко: при сгущении крови из-за потери жидкости, при некоторых хронических воспалительных процессах вследствие образования антител (ревматизм, полиартрит). Наиболее часто бывает понижено содержание белка в крови (гипопротеинемия): при недостаточном поступлении белка с пищей, при нарушениях образования белка в органах (при поражении печени химическими веществами, опухолями, микроорганизмами и т.д.), при потере белка организмом (кровотечения, повышенная проницаемость сосудов, заболевания почек, беременность и т.д.).

В щелочной среде раствор белка при добавлении раствора сульфата меди окрашивается в синий цвет. Окраска обусловлена образованием комплексов ионов меди с пептидными группами белка. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию белка в растворе. Биуретовую реакцию дают все белки, а также олигопептиды, содержащие не менее двух пептидных связей.

Биуретовая реакция белков не отличается высокой чувствительностью. Поэтому она применяется в тех случаях, когда содержание белка в исследуемом образце достаточно велико (не ниже нескольких мг/мл).



Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы и оборудование: 10% раствор альбумина, 0,9% раствор хлорида натрия, биуретовый реактив, фотоэлектроколориметр (КФК-2).

Ход работы.

- 1) Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика применяют стандартный раствор белка – альбумина сыворотки крови. Из 10 % стандартного раствора белка готовят в 4 пробирках растворы белка, как показано в таблице.

№ пр.	стандарт. 10% раствор альбумина, мл	0,9% раствор хлорида натрия, мл	концентрация белка, г/л
1	0,4	0,6	40
2	0,6	0,4	60
3	0,8	0,2	80
4	1,0	-	100

Из каждой пробирки берут по 0,1 мл раствора, добавляют к нему 5,0 мл биуретового реактива. Через 20 минут измеряют экстинкцию на фотоэлектроколориметре против контрольного раствора (0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия + 5,0 мл биуретового реактива). Измерение проводят в кювете толщиной 1 см, длина волны 540-560 нм. Калибровочный график строят на миллиметровой бумаге. По оси ординат откладывают полученные экстинкции, а по оси абсцисс – концентрацию белка (в г/л).

2) Определение содержания белка в сыворотке крови. В пробирку отмеряют 0,1 мл сыворотки крови и 5,0 мл биуретового реактива и через 20 минут измеряют экстинкцию раствора на ФЭК относительно контрольного раствора. Содержание белка в сыворотке крови находят по калибровочному графику.

Оформление работы. Занести полученную экстинкцию в тетрадь, рассчитать содержание белка по калибровочному графику и сделать вывод о возможных изменениях содержания белка в крови.

Лабораторная работа № 6. Количественное определение белка по методу Лоури

Среди методов, основанных на количественном определении белков посредством цветных реакций, наибольшей чувствительностью обладает метод Лоури. Метод Лоури основан на измерении интенсивности окраски раствора, в котором одновременно осуществляются, по меньшей мере, две цветные реакции на белок: биуретовая реакция и реакция Фолина с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами белковой молекулы. Последняя состоит в восстановлении смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета. Полагают, что в реакциях восстановления принимают участие комплексные соединения меди, возникшие при взаимодействии белка с щелочным раствором медного купороса. Вторая реакция не очень специфична, но весьма чувствительна. Поэтому метод Лоури позволяет вести определения белков в сильно

разбавленных растворах (всего несколько десятков микрограммов от 10 до 200 мкг/мл).

Метод Лоури менее специфичен, чем биуретовый, поскольку на интенсивность окраски влияют многие вещества, которые могут содержаться в тканях или в буферных системах, применяемых в биохимических исследованиях. Поэтому для получения абсолютных данных калибровочный график следует строить по тому же белку, который необходимо определить в растворе.

Материал исследования: биологические жидкости (в определяемом объеме должно находиться от 10 до 100 мкг белка).

Реактивы и оборудование: стандартный раствор БСА (бычий сывороточный альбумин), реактив А (2% раствор карбоната натрия в 0,1 н растворе гидроксида натрия), реактив В (0,5% раствор сульфата меди в 1% растворе цитрата натрия), реактив Фолина², спектрофотометр (СФ-46) или фотоэлектроколориметр (КФК-3).

Ход работы.

Перед определением смешивают 50 мл реактива А и 1 мл реактива В - (раствор С), реактив Фолина разбавляют в 2 раза.

Для построения калибровочного графика применяют стандартный раствор белка БСА с концентрацией 200 мкг/мл, готовят растворы белка с разной концентрацией, как показано в таблице.

№ пр.	станд. 200 мкг/мл раствор БСА, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация белка, мкг/мл	Содержание белка в пробе, мкг
1	0,05	0,95	10	10
2	0,20	0,80	50	50
3	0,50	0,50	100	100
4	0,80	0,20	160	160
6	1,00	-	200	200

В каждую пробирку добавляют 5 мл реактива С, перемешивают. Через 10 минут добавляют 0,5 мл разведенного в 2 раза реактива Фолина тщательно перемешивают и помещают в термостат при 37° на 30 минут для развития окраски. Фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 750 нм.

По результатам измерений строят калибровочный график и определяют содержание белка в неизвестной пробе.

Оформление работы. Принцип метода Лоури, результаты измерений, калибровочный график и расчеты заносят в рабочую тетрадь.

² Реактив Фолина. В круглодонную колбу на 1,5–2 л вносят 100 г вольфрамата натрия $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ или 25 г молибдата натрия $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и в 700 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 50 мл 80%-ного раствора фосфорной кислоты и 100 мл концентрированной HCl . К колбе присоединяют обратный холодильник и кипятят в течение 10 часов, затем прибавляют 150 г Li_2SO_4 , 50 мл воды и 3–4 капли брома. Кипятят без холодильника 15 мин для удаления избытка брома. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят его объем до 1 л водой и фильтруют. Полученный раствор должен быть ярко-желтого цвета. Его хранят в темной склянке и перед употреблением разбавляют дистиллированной водой 1 : 1.

Лабораторная работа № 7. Количественное определение белка по методу Брэдфорда

Определение концентрации белка методом Брэдфорд – один из наиболее популярных методов, используемый для определения концентрации белка в растворе. Этот метод, так же, как и метод Лоури, требует построения стандартной калибровочной кривой перед измерением концентрации неизвестного белка. Метод Брэдфорд основан на сдвиге спектра поглощения кумасси (Coomassie Blue) в сторону значений 595 нм прямо пропорционально концентрации содержащегося в растворе белка. Кумасси образует комплекс с белком; этот комплекс измеряют при длине волны 595 нм. Абсорбционная фотометрия комплекса кумасси/белок имеет очень высокую чувствительность и эффективна даже в случае следовых концентраций белков. Чувствительность методов Лоури и Брэдфорд сопоставима, но реагенты метода Лоури обладают большим сродством к глобулинам, а метода Брэдфорд – к альбуминам.

Материал исследования: раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) неизвестной концентрации.

Реактивы и оборудование: растворы БСА, реактив Брэдфорд³, спектрофотометр СФ-103.

Ход работы.

Перед определением концентрат реактива Бредфорд разбавляют в 5 раз.

1. Построение калибровочного графика.

Для построения калибровочного графика применяют растворы белка БСА с концентрацией 0,5 мг/мл и 1 мг/мл, для построения графика готовят растворы белка согласно таблице.

№ пр.	Концентрация исходного раствора БСА, мг/мл	Объем раствора БСА, мкл	Дистиллированная вода, мкл	Концентрация белка в пробе, мкг/мл
1	0,5	20	80	100
2	0,5	50	50	250
3	0,5	75	25	375
4	1,0	50	50	500
5	1,0	75	25	750
6	1,0	100	0	1000

Одновременно ставят пробирку с пробой неизвестной концентрации.

В каждую пробирку добавляют по 5 мл реактива Бредфорд. Выдерживают пробирки 15 минут в темном месте и измеряют экстинкцию растворов на спектрофотометре против контрольного раствора (реактив Брэдфорд). Измерение проводят в кювете толщиной 1 см, длина волны 595 нм.

³ Реактив Брэдфорд. 100 мг кумасси G-250 растворить в 50 мл спирта и добавить 100 мл ортофосфорной кислоты, довести до 1 л водой и профильтровать через бумажный фильтр.

Внимание! Реагент очень чувствителен к белку (1–2 мг/мл). Все должно быть абсолютно чистым и посуда, и бумажный фильтр, и кюветы и руки, иначе раствор посинеет и придет в негодность. Чистый реактив Брэдфорд имеет коричневый цвет и синее при наличии белка

2. По построенному калибровочному графику определяют содержание белка в неизвестной пробе.

Оформление работы. Охарактеризовать принцип метода Брэдфорд, результаты измерений, калибровочный график и расчеты заносят в рабочую тетрадь.

Раздел II. Строение и свойства ферментов

Задачи раздела:

- 1) овладение методами анализа ферментативной активности;
- 2) знакомство с методами количественного определения активности ферментов в биологических жидкостях для использования их на практике;
- 3) научиться использовать знания о структурном и функциональном многообразии ферментов, об изменениях ферментного состава органов и тканей в норме и при болезнях для объяснения нормальных функций организма и их нарушений при патологии.

Главное отличие ферментов от катализаторов небиологической природы состоит в исключительно высокой каталитической активности и ярко выраженной специфичности действия, что обусловлено особенностями строения и механизмом их действия.

Ферменты обнаруживают по превращению их субстратов, а количественно измеряют по величине *каталитической активности*, т.е. по скорости реакции, проходящей при участии фермента. Для этого измеряют начальную скорость реакции, когда она линейно зависит от концентрации фермента.

За *единицу активности* (Е) фермента принимают такое его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

Концентрацию фермента в растворе выражают в единицах на 1 мл (Е/мл).

Часто бывает необходимо выражать активность не в расчете на объем раствора, а в расчете на содержание белка. *Удельная активность* выражается в единицах фермента на 1 мг белка (Е/мг).

Для сопоставления каталитической эффективности разных ферментов определяют *молекулярную активность*, которая соответствует числу единиц в 1 мкмоль фермента (Е/мкмоль) или соответствует числу молекул субстрата, превращаемых 1 молекулой фермента за 1 мин. Молекулярную активность можно определить лишь в том случае, если известны молекулярная масса фермента и его молекулярная концентрация в растворе.

Перед разработкой метода определения активности любого фермента всегда изучается кинетика действия ферментов для того, чтобы подобрать стандартные условия (насыщение концентрации субстрата, оптимум температуры, ионный состав среды) для правильного определения активности

определенного фермента. Если эти условия не будут подобраны, то активность фермента не будет соответствовать истинным величинам, что приведет к ошибочному заключению при использовании методов определения ферментов в диагностике заболевания.

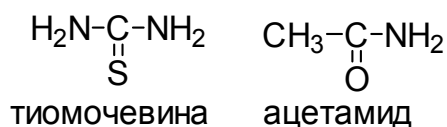
Специфичность действия ферментов

Специфичность действия - одно из важнейших свойств ферментов. Основной причиной специфичности взаимодействия фермента и субстрата является комплиментарность структуры активного центра фермента и структуры субстрата.

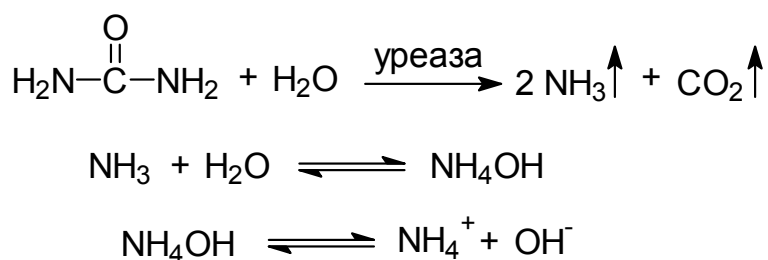
Ферменты с абсолютной субстратной специфичностью катализируют превращение только одного вещества. Эти ферменты используются в клинической биохимии и фармации как аналитические реагенты для определения веществ, к которым они имеют абсолютную специфичность.

Ферменты с относительной групповой субстратной специфичностью обладают меньшей избирательностью действия на субстраты. Часто такие ферменты участвуют в гидролизе питательных веществ и ли превращении чужеродных соединений. В частности, α -амилаза и сахараза проявляют специфичность не к структуре субстрата в целом, а к типу гликозидных связей, находящихся в соответствующих углеводах.

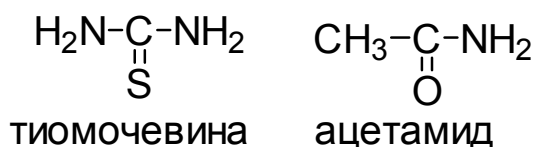
Лабораторная работа № 8. Абсолютная субстратная специфичность уреазы



Метод основан на определении аммиака, образующегося под действием уреазы соевой муки на мочевины¹. Выделение аммиака обнаруживается по запаху и по изменению окраски фенолфталеина или универсальной индикаторной бумажке.



Для подтверждения абсолютной специфичности уреазы сравнивают возможность гидролиза уреазой веществ, сходных по строению с мочевиной:



¹ см. лаб. раб. №13 (оп.2)

Материал исследования: соевая мука.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, 1% раствор тиомочевины, 1% раствор ацетамида, 1% раствор мочевины, 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина или универсальная индикаторная бумажка.

Ход работы.

В одну пробирку помещают 1 мл раствора мочевины, во вторую - тиомочевины, в третью - ацетамида. В каждую добавляют примерно 100 мг соевой муки и 2 капли раствора фенолфталеина, тщательно перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре.

Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов и записывают наблюдения в таблицу и делают вывод.

Фермент	Субстрат	Пробы на аммиак	
		фенолфталеин	запах

Лабораторная работа № 9. Специфичность действия амилазы и сахаразы

Метод основан на сравнительном изучении гидролиза α -амилазой и сахаразой разных субстратов, содержащих гликозидные связи: крахмала и сахарозы.

Ферменты катализируют реакции по схеме:

крахмал + nH_2O $\xrightarrow{\text{амилаза}}$ декстрины + мальтоза

сахароза + H_2O $\xrightarrow{\text{сахараза}}$ глюкоза + фруктоза

крахмал + nH_2O $\xrightarrow{\text{амилаза}}$ декстрины + мальтоза

сахароза + H_2O $\xrightarrow{\text{сахараза}}$ глюкоза + фруктоза

Материал исследования: раствор амилазыⁱ, 1% раствор сахаразы

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметное стекло, термостат, 2% раствор сахарозы, 1% раствор крахмала, раствор Люголя, 1% раствор сульфата меди, 10% раствор гидроксида натрия.

Ход работы.

Нумеруют четыре пробирки. В пробирки 1 и 2 наливают 2 мл раствора крахмала; в пробирки 3 и 4 - по 2 мл раствора сахарозы. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 0,5 мл раствора амилазы, а в пробирки 2 и 4 - по 0,5 мл раствора сахаразы. Перемешивают содержимое и ставят на 10 мин в водяную баню при $t=40^{\circ}C$. После охлаждения проводят реакции с йодом на присутствие крахмала в пробах 1 и 2 и восстанавливающих сахаров - в пробах 3 и 4 (см. лаб.раб. №14, оп.1, лаб.раб. № 15).

Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов, записывают наблюдения в таблицу и делают вывод

ⁱ см. приготовление лаб.раб.№14 (оп.1)

№ пробы	Фермент	Субстрат	Проба на крахмал	Реакция Троммера
1	амилаза	крахмал		
2	сахараза	крахмал		
3	амилаза	сахароза		
4	сахараза	сахароза		

Лабораторная работа №10. Влияние температуры на активность ферментов

Скорость ферментативных реакций увеличивается при увеличении температуры до определенного предела. При высоких температурах наступает тепловая денатурация ферментов и скорость реакций, которые они катализируют, падает до нуля.

Скорость расщепления крахмала амилазой можно контролировать, используя реакцию крахмала с йодом.

Материал исследования: раствор амилазы

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостат с $t = 40^{\circ}\text{C}$, кипящая водяная баня, баня со льдом, 1% раствор крахмала, реактив Люголя.

Ход работы. 1. Наливают в 4 пробирки по 2 мл раствора крахмала и еще в 4 пробирки по 0,5 мл раствора амилазы. Первую пару пробирок (одна - с ферментом, другая - с крахмалом) помещают в баню со льдом, вторую пару оставляют при комнатной температуре, третью пару пробирок помещают в термостат при 40°C , четвертую - в кипящую водяную баню.

2. Через 5 мин содержимое каждой пары пробирок сливают вместе и оставляют на 5 мин в тех же условиях.

3. Через 3 мин из третьей пробирки отбирают каплю жидкости на предметное стекло и добавляют к ней каплю реактива Люголя⁵. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще на 5 мин и после этого все повторяют. При необходимости увеличивают время инкубации. При изменении окраски в третьей пробирке, проверяют окраску всех растворов после добавления реактива Люголя на предметном стекле.

Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов, записывают наблюдения в таблицу и делают вывод.

№ пробы	Температура инкубации, $^{\circ}\text{C}$	Окраска раствора после взаимодействия с йодом		
		Время τ_1 , мин	Время τ_2 , мин	Время τ_3 , мин
1	0			
2	20			
3	40			
4	100			

⁵ см. приложение I

Лабораторная работа №11. Влияние ингибиторов на активность ферментов

Ионы меди - ингибиторы фермента амилазы. При добавлении Cu^{2+} к реакционной смеси снижается скорость ферментативной реакции. Степень расщепления крахмала амилазой контролируют, используя реакцию крахмала с йодом.

Материал исследования: раствор амилазы

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостат с температурой 40°C , 1% раствор крахмала, 1% раствор сульфата меди, реактив Люголя.

Ход работы.

1. В две пробирки наливают по 1 мл раствора крахмала. В одну пробирку добавляют 5 капель раствора сульфата меди, в другую - 5 капель воды, затем в обе пробирки добавляют по 1 мл раствора амилазы и оставляют на 3 мин в термостате при 40°C .

2. Полноту прохождения гидролиза контролируют по раствору в пробирке без ингибитора. Для этого отбирают пипеткой каплю реакционной массы на предметное стекло и добавляют к ней каплю реактива Люголя. Как только начнет исчезать синее окрашивание в контрольном растворе, проверяют степень прохождения ферментативного гидролиза в пробирке с ингибитором.

Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов, записывают наблюдения в таблицу и делают вывод.

Фермент	Субстрат	Время инкубации, мин	Окраска раствора после добавления йода	
			без ингибитора	с ингибитором
Амилаза	Крахмал	3		
		5		
		10		
		15		

Раздел III. Витамины

Задачи раздела: Конечная цель изучения раздела – уметь использовать знания о роли витаминов в обмене веществ для объяснения гиповитаминозов, их предупреждения и лечения.

Витамины по своим физико-химическим свойствам можно разделить на две группы: водорастворимые и жирорастворимые. Водорастворимые витамины – в большинстве предшественники коферментов. Биологическая роль жирорастворимых витаминов несколько шире. При недостатке поступления того или иного витамина в организм развивается специфическое заболевание, называемое авитаминозом. Знание биологической роли витаминов, клинической картины авитаминозов, умение предотвращать и лечить эти заболевания очень важна.

Лабораторная работа № 12. Качественные реакции на витамины

Качественные реакции используются для выявления витаминов. Эти реакции положены в основу количественного определения витаминов в различных источниках.

Опыт № 1. Реакции на тиамин (витамин В₁).

В витамин В₁ имеется два гетероциклических кольца: пиримидиновое и тиазоловое, которые могут вступать в специфические для ароматических соединений реакции с участием гетероатомов.

1.1.Диазореакция на тиамин – образование сложного окрашенного соединения витамина В₁ с диазобензосульфокислотой.

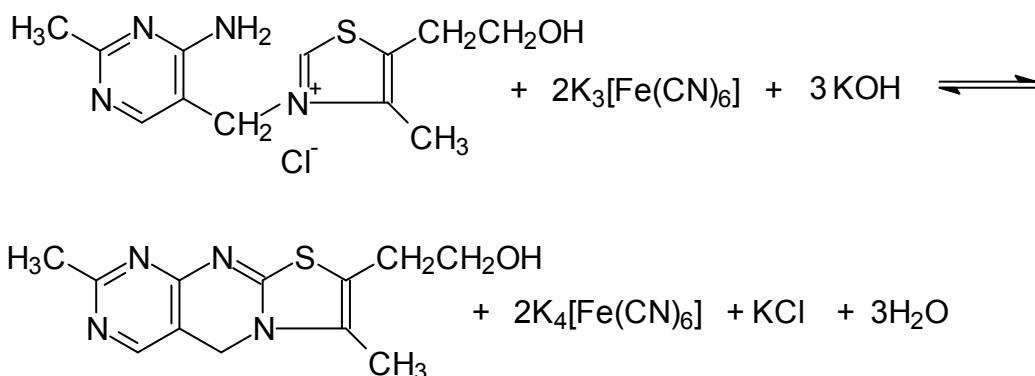
Материал исследования: раствор или порошок тиамина.

Реактивы и оборудование: 1% раствор сульфаниловой кислоты в HCl, 5% раствор нитрита натрия, 10% раствор карбоната натрия, стеклянная посуда, пипетки.

Ход работы. К 5 каплям раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 5 капель раствора нитрита натрия и таким образом получают диазореактив. К диазореактиву прибавляют небольшое количество порошка тиамина (на кончике стеклянной палочки) и осторожно по стенкам пробирки - 5-7 капель раствора карбоната натрия.

1.2.Реакция окисления тиамина в тиохром

При окислении тиамина образуется соединение (тиохром), обладающее голубой флуоресценцией в УФ-лучах.



Материал исследования: раствор или порошок тиамина.

Реактивы и оборудование: 5% раствор гексацианоферрата (III) калия, 30% раствора гидроксида калия.

Ход работы. К 5 каплям раствора тиамина прибавляют 5 капель раствора гексацианоферрата (III) калия, 5 капель раствора гидроксида калия.

Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Химическая структура и название витамина	Кофермент	Биологическая роль	Качественная реакция	Цвет раствора или флуоресценция	
				до реакции	после реакции

Опыт 2. Реакция на рибофлавин (витамин В₂)

Окисленная форма витамина В₂ представляет собой желтое флуоресцирующее в УФ-лучах вещество. Реакция на рибофлавин основана на способности его легко восстанавливаться. При восстановлении его образуется родофлавин красного цвета, а затем бесцветный лейкофлавин, который не флуоресцирует.

Реактивы и оборудование: соляная кислота (конц. раствор), кусочки цинка, УФ-лампа.

Ход работы. К 10 каплям раствора тиамин прибавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и опускают зернышко металлического натрия.

Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Химическая структура и название витамина	Кофермент	Биологическая роль	Цвет и флуоресценция раствора	
			до реакции	после реакции

Опыт № 3. Качественные реакции на витамин С

Качественные реакции на витамин С основаны на его способности легко вступать в окислительно-восстановительные реакции, и восстанавливать метиленовую синь, 2,6-дихлорфенолиндифенол, гексацианоферрат (III) калия, нитрат серебра и др.

Материал исследования: раствор витамина С, фруктовые и овощные соки и др.

3.1. Взаимодействие с метиленовой синью

Реактивы и оборудование: 0,01% раствор метиленовой сини, термостат, пробирка с пробкой.

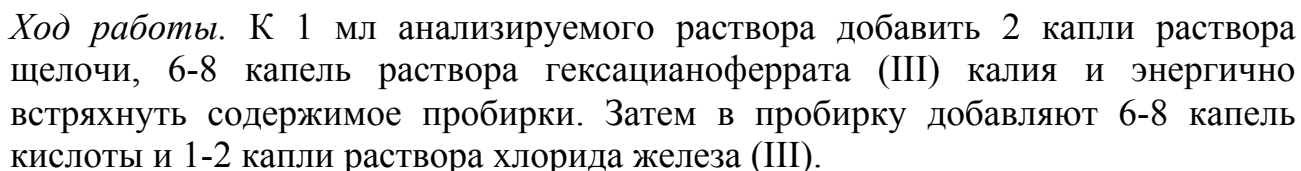
Ход работы. В пробирку наливают 1 мл исследуемого раствора (например, сока) и прибавляют 1 мл раствора метиленовой сини, перемешивают и закрывают пробкой для предохранения от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробирку помещают в термостат при 37-40⁰С. Через некоторое время наблюдают обесцвечивание раствора в пробирке за счет восстановления метиленовой сини в лейкоформу. При этом аскорбиновая кислота превращается в дегидроаскорбиновую. Если затем бесцветный раствор

OC(=O)C(O)C(O)CO + CN(C)c1ccc2nc3ccc(cc3s2)C(=[N+](C)C)[Cl-] >>

L-аскорбиновая кислота + метиленовая синь (окрашенная форма)


$$\begin{array}{c}
 \text{O} \\
 \parallel \\
 \text{HO}-\text{C} \\
 \parallel \\
 \text{HO}-\text{C} \\
 | \\
 \text{H}-\text{C} \\
 | \\
 \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\
 | \\
 \text{CH}_2
 \end{array}
 + 2\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] + 2\text{KOH} \longrightarrow
 \begin{array}{c}
 \text{O} \\
 \parallel \\
 \text{O}=\text{C} \\
 \parallel \\
 \text{O}=\text{C} \\
 | \\
 \text{H}-\text{C} \\
 | \\
 \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\
 | \\
 \text{CH}_2
 \end{array}
 + 2\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] + 2\text{H}_2\text{O}$$

L-аскорбиновая кислота
L-дегидроаскорбиновая кислота



Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

29

Опыт № 4. Реакция на викасол (витамин К)

В щелочной среде викасол способен образовывать с цистеином окрашенное соединение.

Материал исследования: спиртовой раствор викасола.

Реактивы и оборудование: 10% раствор гидроксида натрия, 0,025% раствор цистеина.

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл раствора викасола (или 0,2% раствора метионина), затем прибавляют 2 капли раствора цистеина и 2 капли щелочи.

Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Структура витамина	Биологическая роль	Наблюдения

Опыт № 5. Качественные реакции на витамин А

Материал исследования: растительное масло, рыбий жир, растительный экстракт.

5.1. Реакция с сульфатом железа (II)

Реактивы и оборудование: сульфат железа (II), ледяная уксусная кислота.

Ход работы. К 1-2 каплям растительного масла или рыбьего жира или 1 мл растительного экстракта в гексане или ацетоне добавляют 5-10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II) (в случае ацетонового экстракта добавляют смесь уксусной кислоты и ангидрида) и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Каротины дают зеленоватое окрашивание.

5.2. Реакция с серной кислотой (реакция Друммонда)

В основе данной реакции лежит способность серной кислоты отнимать от витамина А воду с образованием цветных продуктов.

Реактивы и оборудование: концентрированная серная кислота.

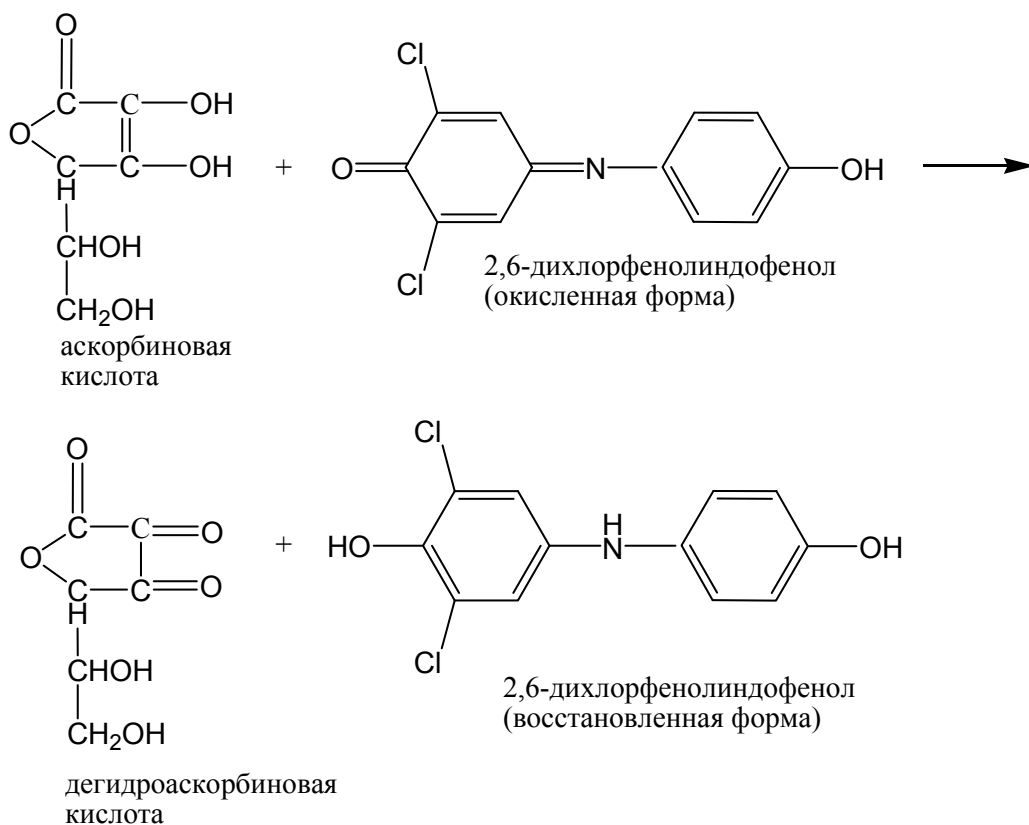
Ход работы. 1 каплю растительного масла растворяют в 4-5 каплях хлороформа и прибавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты.

Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Структура витамина	Биологическая роль	Качественная реакция	Наблюдения

Лабораторная работа № 13. Количественное определение аскорбиновой кислоты в растительном сырье

Принцип метода количественного определения витамина С основан на его способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ):



2,6-дихлорфенолиндофенол в щелочной среде имеет синюю окраску, в кислой – красную, а при восстановлении обесцвечивается.

По данному методу определяют только восстановленную форму аскорбиновой кислоты.

Реактивы и оборудование: 0,001 М раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 5% раствор соляной кислоты, кварцевый песок. Ступка и пестик; мерная колба на 100 мл; коническая колба на 50 мл; микробюретка; воронка; фильтровальная бумага.

Ход работы.

Приготовление экстракта из растительного материала. Нарезают исследуемый материал (картофель, морковь, лимон, шиповник) мелкими кусочками. 10 г материала переносят в ступку и тщательно растирают с небольшим количеством кварцевого песка, добавляя маленькими порциями 5%-ный раствор соляной кислоты до получения жидкой кашицы. Смесь количественно переносят в мерную колбу на 100 мл. Ступку и пестик тщательно обмывают 5%-ным раствором соляной кислоты, которую сливают в ту же мерную колбу, следя за тем, чтобы были затрачены все 50 мл соляной кислоты (конечная концентрация ее должна быть 2,5%) После этого содержимое мерной колбы доводят до метки дистиллированной водой, хорошо перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр. Полученный экстракт должен быть совершенно прозрачным.

Определение содержания аскорбиновой кислоты в экстракте. В коническую колбу на 50 мл берут пипеткой 10 мл полученного экстракта растительного материала. Содержимое колбы титруют 0,001 М раствором 2,6-

дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания не исчезающего в течение 30 с. Работу повторяют с новой порцией того же экстракта.

Оформление работы. Результаты титрования записывают в лабораторный журнал. На основании средней величины титрования, полученной из 2 – 3 определений, вычисляют количество витамина С по формуле:

$$c = 100 \times C_{\text{ДХФИФ}} \times V_{\text{ДХФИФ}} \times M_{\text{аск.к-ты}}$$

где c – содержание аскорбиновой кислоты (в мг на 100 г исследуемого продукта); $C_{\text{ДХФИФ}}$ – концентрация 2,6-дихлорфенолиндофенола (моль/л); V – затраченный при титровании объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (мл); $M_{\text{аск.к-ты}}$ – молярная масса аскорбиновой кислоты (г/моль).

Лабораторная работа № 14. Количественное определение аскорбиновой кислоты в биологических жидкостях

Принцип метода – см. лабораторную работу № 42.

Материал: плазма (оксалат, гепарин, ЭДТА) или сыворотка крови (избегать гемолиза!). Витамин С стабилен 3 ч в охлажденной цельной крови.

Реактивы и оборудование: 0,001 Н раствор 2,6- дихлорфенолиндофенола натриевая соль; 2% раствор соляной кислоты; концентрированная уксусная кислота.

Ход работы: В колбу для титрования вносят 1 мл исследуемой сыворотки крови, 9 мл 2% раствора соляной кислоты и оттитровывают 0,001 Н раствором 2,6- дихлорфенолиндофенола до появления слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд.

Расчет производят по формуле:

$$X = \frac{0,088 \cdot C \cdot A \cdot 1000}{K},$$

где X – количество аскорбиновой кислоты в мг/л;

A – количество индикатора, пошедшего на титрование;

C – фактор-поправка на титр индикатора;

K – количество сыворотки крови, взятой на титрование;

0,088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 Н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола;

1000 – перерасчет на 1 л сыворотки крови.

Оформление протокола: рассчитать содержание аскорбиновой кислоты в сыворотке крови и моче и сопоставить с нормальными величинами.

Практическое значение работы: В норме содержание аскорбиновой кислоты в крови составляет 4-15 мг/л. Определение аскорбиновой кислоты в крови используется для выявления гиповитаминоза С. Уровни аскорбиновой кислоты в крови ниже у мужчин и злостных курильщиков. Снижение содержания аскорбиновой кислоты в крови наблюдается при беременности, стеаторее, алкоголизме, гипертиреозидизме, ревматоидных заболеваниях, раке. Анализы мочи имеют ограниченную диагностическую ценность.

Раздел IV. Энергетический обмен и общий путь катаболизма

Задачи раздела:

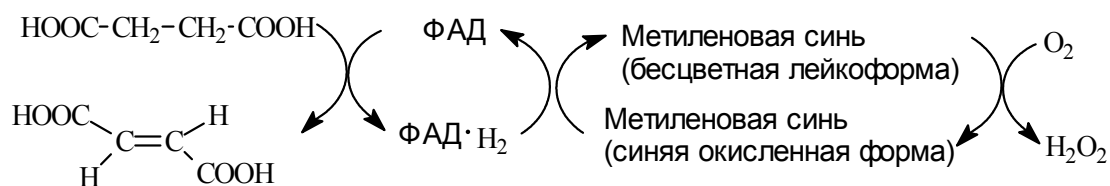
- 1) в процессе исследования ферментативного действия некоторых окислительно-восстановительных комплексов закрепить знания о локализации ферментов в клетке и молекулярном механизме действия цепи переноса электронов;
- 2) обобщить знания о строении и роли макроэргических соединений организма;
- 3) исследовать значение пирувата и ацетил-КоА как основных субстратов общего пути катаболизма.

Основная часть энергии в тканях человека и животных образуется аэробным путем в ходе окислительного фосфорилирования в митохондриях. Источником энергии для этого синтеза являются органические соединения, при биологическом окислении которых электроны переносятся на молекулу кислорода. Этот перенос совершается цепью ферментов. Все ферменты биологического окисления, или тканевого дыхания относятся к классу оксидоредуктаз. По химической структуре все эти ферменты являются сложными белками. Присутствие окислительно-восстановительных ферментов в тканях и биологических жидкостях может быть обнаружено по их действию на соответствующие субстраты.

Окислительное фосфорилирование как основной механизм синтеза АТФ

Лабораторная работа № 15. Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной активности

Сукцинатдегидрогеназа мышц является железофлавопротеином, одним из компонентов цепи переноса электронов. Этот фермент локализован в митохондриях. Субстратом сукцинатдегидрогеназы является янтарная кислота, которая окисляется до фумаровой кислоты. В роли промежуточного акцептора водорода выступает метиленовая синь. Окисленная форма метиленового синего окрашена в синий цвет, а восстановленная лейкоформа бесцветна. Малоновая кислота является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы. При добавлении к реакционной смеси ингибитора, синяя окраска исчезает медленнее.



Материал исследования: мышечная ткань.

Реактивы и оборудование: дистиллированная вода, 0,01н раствор янтарной кислоты, 0,01н раствор малоновой кислоты, 0,05% раствор метиленового синего, вазелиновое масло, фосфатный буфер (рН 6,8), ножницы, ступка, пробирки, пипетки, термостат.

Ход работы. 1. Для получения ферментного препарата 1-2 г свежей мышцы, измельченной ножницами, растирают в ступке с небольшим количеством воды. Полученную суспензию равномерно распределяют в пять пробирок.

2. Содержимое пробирки кипятят в течение 1-2 мин для инактивации фермента. Затем в пробирки приливают реактивы по схеме, приведенной в таблице:

№ пробы	Буферный раствор (V, мл)	Янтарная кислота (V, мл)	H ₂ O (V, мл)	Малоновая кислота (V, мл)	Краситель (V, мл)
1(субстрат)	1	1	1	-	2 капли
2(субстрат + ингибитор)	1	1	-	1	2 капли
3 (без субстрата и без ингибитора)	1	-	2	-	2 капли

Практическое значение работы:

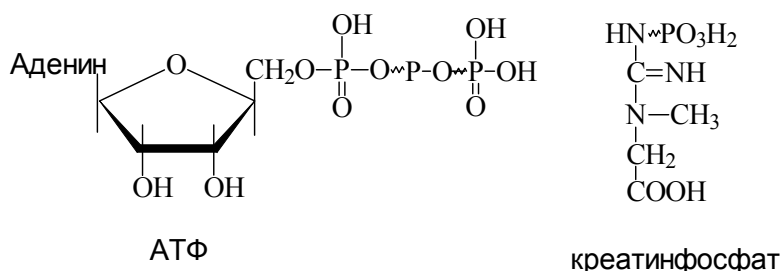
Конкурентные ингибиторы различных ферментов широко применяются в биохимических исследованиях и в практической медицине как лекарственные препараты. В частности, малоновая кислота как конкурентный ингибитор сукцинатдегидрогеназы используется в экспериментах на животных при изучении обмена веществ в организме.

Оформление работы:

При оформлении указывают фермент, кофермент, донор и акцептор электронов в ткани, донор и акцептор электронов в опыте, а также заносят в тетрадь таблицу, добавив графу с наблюдениями.

Лабораторная работа № 16. Количественное определение макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфата)

В мышечной ткани содержится два макроэргических соединения – АТФ и креатинфосфат, которые обеспечивают по мере надобности мышцу большим количеством энергии:



Основным путем образования АТФ в тканях является окислительное фосфорилирование в процессе тканевого дыхания. Креатинфосфат образуется в мышце при участии АТФ в состоянии покоя и служит резервом

высокоэнергетического фосфата для синтеза АТФ из АДФ при активной мышечной работе.

Метод основан на том, что два последних остатка фосфорной кислоты в АТФ, богатые энергией, так же как и фосфатный остаток в креатинфосфате, легко отщепляются при непродолжительном гидролизе в кислой среде – так называемый лабильно связанный фосфор. Сравнение содержания неорганического фосфата в пробах до гидролиза и после гидролиза дает представление о количестве лабильно связанного фосфора, которое приходится на долю макроэргических соединений мышечной ткани. Количество фосфора определяют по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты.

Материал исследования: мышечная ткань животного, забитого перед занятием.

Реактивы и оборудование: 2,5% раствор трихлоруксусной, 1М раствор соляной кислоты, 1М раствор гидроксида натрия, 1% раствор молибдата аммония, 1% раствор аскорбиновой кислоты, пробирки, пипетки, воронки, фильтры, цилиндры, ледяная и кипящая водяные бани, ФЭК, кюветы с толщиной слоя 1 см.

Ход работы.

1. 0,5 г мышечной кашицы помещают в пробирку, стоящую в ледяной бане, и добавляют в нее 5 мл охлажденного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирки перемешивают стеклянной палочкой для экстрагирования АТФ и креатинфосфата в течение 5 мин. Экстракт фильтруют в мерную пробирку, стоящую в ледяной бане. Остаток мышечной кашицы в пробирке заливают 5 мл дистиллированной воды и продолжают экстракцию 5 мин на холоду. Полученный экстракт фильтруют в ту же мерную пробирку и доводят общий объем до 10 мл дистиллированной водой.

2. В две пробирки отбирают по 0,5 мл безбелкового фильтрата. Первая – контрольная, вторая – опытная.

В опытную пробирку добавляют 1 мл 1М раствора соляной кислоты, закрывают фольгой и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин для гидролиза фосфорных связей. Затем раствор охлаждают и добавляют 1 мл 1М раствора гидроксида натрия.

В контрольную пробирку (без предварительного кипячения) добавляют 1 мл 1М раствора соляной кислоты и 1 мл 1М раствора гидроксида натрия.

В опытную и контрольную пробирки добавляют из бюретки по 7,5 мл дистиллированной воды для получения объема 10 мл.

3. Дальнейшие процедуры обязательно проводят с опытной и контрольной пробами. Из обеих пробирок отбирают по 5 мл жидкости, переносят в две другие пробирки и добавляют в каждую из них по 0,5 мл раствора молибдата аммония, 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты и по 2 мл дистиллированной воды. Смесь в каждой пробирке быстро перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре точно 10 мин.

4. Контрольную и опытную пробы колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром (длина волны 670 нм) против воды. В опытной пробе

(после гидролиза) определяемый неорганический фосфор представляет собой сумму лабильно связанного фосфора и фосфатных солей, присутствующих в ткани. В контрольной пробе - только фосфатные соли.

5. Вычитают из оптической плотности, найденной для опытной пробы, оптическую плотность, полученную для контрольной пробы. Концентрацию лабильно связанного неорганического фосфора в пробе находят по калибровочному графику.

Практическое значение работы. По содержанию лабильно связанного фосфора можно судить об энергетическом состоянии ткани.

Оформление работы. Заносят в тетрадь принцип метода и рассчитывают количество лабильно связанного фосфора в ммоль на 100 г сырой ткани, учитывая разведение:

$$x = A \cdot 3,3 \cdot 400 \cdot 100, \text{ где}$$

x – содержание макроэргических связей в ммоль в 100 г сырой ткани, ммоль/100г;

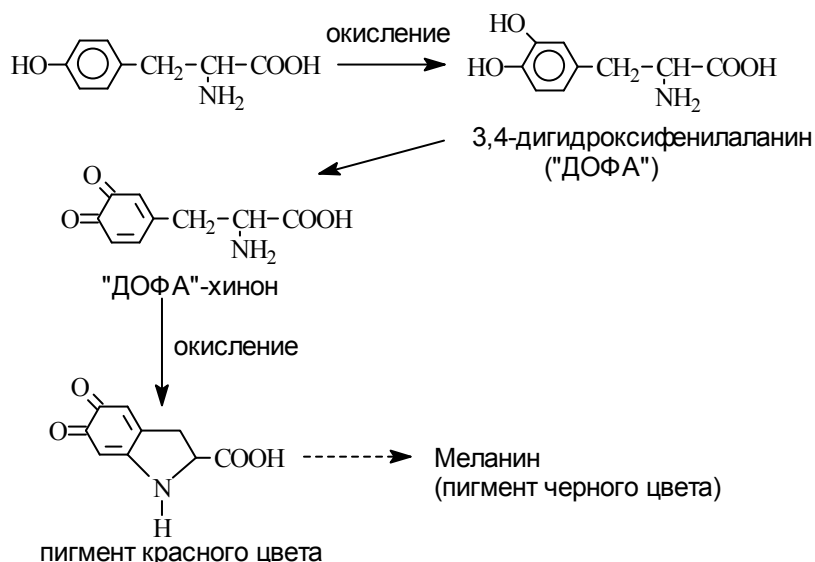
A – содержание макроэргических связей в пробе, ммоль;

3,3·400 – коэффициент пересчета на 1 г ткани с учетом разведения.

Общий путь катаболизма. Биологическое окисление

Лабораторная работа № 17. Обнаружение тирозиназы в картофеле

Фермент **тирозилаза** (монофенолоксидаза) катализирует окисление многих фенолов кислородом воздуха. При окислении тирозина образуются продукты красного цвета, которые затем превращаются в черный пигмент – меланин:



Материал исследования: картофель (сырой и вареный).

Реактивы и оборудование: 1% раствор тирозина, пробирки, пипетки.

Ход работы. 1. На поверхность среза сырого и вареного картофеля нанести 1-2 капли раствора тирозина.

Практическое значение работы:

Качественные реакции на окислительно-восстановительные ферменты позволяют определить участие этих ферментов в окислительно-восстановительных процессах. Тирозиназа является металлопорфирином, содержащим медь в активном центре. Фермент обладает групповой специфичностью и катализирует окисление некоторых фенолов: тирозина, адреналина и др. кислородом воздуха.

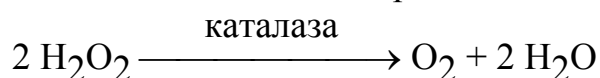
Оформление работы:

При оформлении указывают фермент, кофермент, донор и акцептор электронов в ткани, донор и акцептор электронов в опыте, а также заносят наблюдения в таблицу.

Исследуемый материал	Наблюдения
Сырой картофель	
Вареный картофель	

Лабораторная работа № 18. Открытие каталазы крови

Каталаза крови способна катализировать реакции разложения перекиси водорода с выделением кислорода.



Объект исследования: кровь цельная.

Реактивы и оборудование: 1% раствор перекиси водорода, пробирки, пипетки.

Ход работы. В одну пробирку налить 1 –2 мл 1% раствора перекиси водорода и добавить 1 каплю крови. Происходит бурное пенообразование в результате выделения кислорода.

В другую пробирку к 1-2 мл 1% раствора перекиси водорода добавить 1-2 капли предварительно прокипяченной крови. Пенообразование при этом будет отсутствовать.

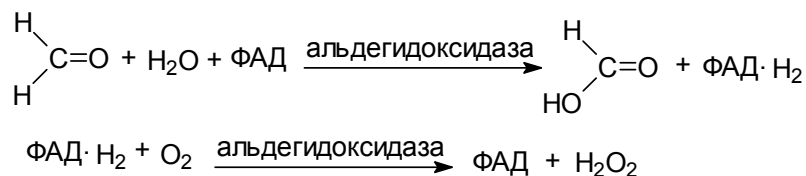
Практическое значение работы. Каталаза по своей химической природе является двукомпонентным геминным ферментом и в основном содержится в эритроцитах крови. Физиологическая роль каталазы выражается в защите клеток организма от токсического действия перекиси водорода, образующейся в процессе биологического окисления. Недостаток каталазы ведет к снижению защитных реакций организма и наблюдается при ряде заболеваний, таких как - рак, анемия, туберкулез и др.

Оформление работы. При оформлении указывают фермент, кофермент, донор и акцептор электронов, а также заносят наблюдения в таблицу.

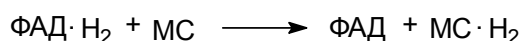
Исследуемый материал	Наблюдения
Цельная свежая кровь	
Прокипяченная кровь	

Лабораторная работа № 19. Открытие альдегидоксидазы в сыром молоке

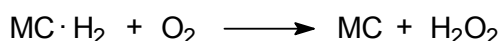
Альдегидоксидаза катализирует реакцию дегидрирования различных альдегидов, например формальдегида. Водород переносится на ФАД, являющийся коферментом данного фермента, а затем на конечный акцептор – кислород:



При добавлении метиленового синего (МС) – искусственного акцептора водорода – в бескислородных условиях образуется его бесцветная восстановленная форма (лейкоформа) $\text{МС} \cdot \text{H}_2$:



Если бесцветный раствор встряхнуть, то он опять приобретает голубую окраску:



Материал исследования: свежее коровье молоко.

Реактивы и оборудование: термостат, пипетки, пробирки, 0,4% раствор формальдегида, дистиллированная вода, 0,01% раствор метиленового синего.

Ход работы.

В три пробирки наливают по 5 мл свежего коровьего молока. Одну пробирку кипятят в течение 2–3 мин и остужают. В прокипяченную пробу и в одну из некипяченных проб добавляют по 1 мл 0,4% раствора формальдегида, а в другую некипяченную – 1 мл воды. Затем во все три пробирки приливают по 1 мл 0,01% раствора метиленового синего. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и заливают в каждую по 3–4 капли вазелинового масла для предохранения жидкости от соприкосновения с кислородом воздуха. Все пробирки помещают в водяную баню, нагретую до 40°C.

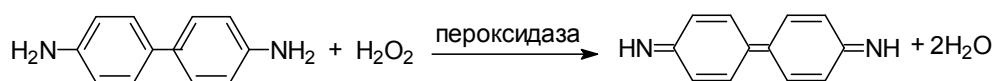
Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов и записывают наблюдения в таблицу.

Молоко	Раствор формальдегида	H ₂ O	Наблюдения
Кипяченое	1 мл	-	
Свежее	1 мл	-	
Свежее	-	1 мл	

Лабораторная работа № 20. Открытие пероксидазы в хрене, картофеле, молоке

Пероксидаза катализирует окислительно-восстановительные реакции и использует H₂O₂ в качестве акцептора атомов водорода. Метод обнаружения основан на появлении темно-синего окрашивания вследствие окисления

бензидина под действием фермента пероксидазы до n,n' -дииминодифенилхинона:



Материал исследования: свежее коровье молоко, сырой картофель, хрен.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, спиртовой раствор бензидина, 0,5% раствор пероксида водорода.

Ход работы.

В одну пробирку помещают 1 мл раствора экстракта хрена²⁴, во вторую - свежего молока, в третью – тертого картофеля. Добавляют во все пробирки по 5 капель спиртового раствора бензидина и затем 2 капли раствора пероксида водорода.

Оформление работы. Наблюдения записывают в таблицу.

Материал исследования	Наблюдения
Экстракт хрена	
Молоко	
Сырой картофель	

Лабораторная работа № 21. Обнаружение цитохромоксидазы в мышечной ткани

Цитохромоксидаза, или комплекс цитохромов $a + a_3$, является терминальным компонентом дыхательной цепи. Этот ферментативный комплекс переносит электроны на кислород. Он прочно связан с внутренней мембраной митохондрий и извлекается только при ее разрушении.

Принцип метода основан на способности цитохромоксидазы окислять ряд синтетических субстратов, в частности, α -нафтола и N,N -диметилпарафенилендиамина (реактив НАДИ) с образованием индофенолового голубого, что используется для обнаружения этого фермента в тканях.

Материал исследования: мышечная кашица.

Реактивы и оборудование: реактив НАДИ, ножницы, ступка с пестиком, воронка для фильтрования, фильтровальная бумага, марля или бинт, мерный цилиндр, водяная баня, пипетки, пробирки.

Ход работы. 5 г мышечной ткани измельчают ножницами и тщательно растирают в ступке, добавляя порциями десятикратный объем дистиллированной воды. Мышечную кашицу фильтруют через двойной слой марли и многократно промывают дистиллированной водой. Оставшийся на марле осадок промывают дистиллированной водой до тех пор, пока промывные воды не станут прозрачными.

Для выявления цитохромоксидазной активности в две пробирки помещают небольшое количество мышечной кашицы и содержимое одной из них кипятят. После охлаждения в обе пробирки добавляют по 2-3 капли реактива НАДИ. В пробирке с некипяченой мышечной кашицей наблюдают

²⁴ корень хрена натирают на мелкой терке и настаивают с небольшим количеством воды в течение 1 ч, после чего фильтруют.

появление ярко-синей окраски, обусловленной образованием индофенолового синего.

Оформление работы:

Результаты наблюдения заносят в таблицу.

Пробирка	материал	фермент	кипячение	Окраска пробы
1				
2				

Раздел V. Метаболизм углеводов

Задачи раздела:

- 1) изучение метаболизма углеводов;
- 2) знакомство с основными методами количественного определения глюкозы в крови для использования их на практике;
- 3) научиться использовать знания о регуляции и нарушениях углеводного обмена для своевременной диагностики эндокринной патологии у человека, для выработки лечебной тактики с целью коррекции нарушений углеводного обмена.

Строение, свойства, функции углеводов

Лабораторная работа № 22. **Выделение гликогена из печени**

Реактивы и оборудование: ТХУ, 5% раствор; хлорид натрия, 0,9% раствор; раствор Люголя; ацетат свинца, 10% раствор; сульфат аммония; этанол. Ступка с пестиком; кипящая водяная баня; бумажные фильтры; штатив с пробирками.

Материал: печень сытого и голодавшего в течение 12 часов животных.

Метод основан на том, что гликоген хорошо растворим в воде и достаточно устойчив в слабокислой среде. Поэтому выделение гликогена сводится к механическому разрушению ткани и экстракции гликогена 5% раствором ТХУ. Основная масса белков при этом денатурирует и их легко удалить из раствора фильтрованием.

Ход работы.

1. В опыте используют печень сытого и голодавшего животных. Печень забитых животных быстро извлекают, разрезают на тонкие пласты и немедленно опускают в стакан с кипящим изотоническим раствором хлорида натрия для инактивации фермента гликогенфосфорилазы, очень активно разрушающего гликоген. Через 10-15 мин печень извлекают из раствора. Дальнейшее исследование печени сытого и голодавшего животных проводят параллельно.

2. Отвешивают на весах 0,5 г печени, помещают в ступку, заливают 3 мл 5% раствора ТХУ и растирают пестиком в течение 10 минут. Затем к экстракту

добавляют 3 мл дистиллированной воды, суспензию перемешивают и фильтруют через смоченный водой бумажный фильтр в чистую пробирку.

3. С полученными фильтрами выполняют качественные реакции на гликоген:

а) в 1-ую пробирку наливают 1 мл дистиллированной воды, во 2-ую и 3-ью – по 1 мл фильтратов. Затем в каждую пробирку добавляют по 1-2 капли раствора Люголя и сравнивают окраску;

б) в три пробирки наливают по 10 капель фильтрата, полученного из печени сытого животного, и выполняют реакции осаждения. Для этого в 1-ую пробирку добавляют 10 капель этилового спирта, во 2-ую – 10 капель 10% раствора ацетата свинца, а в 3-ью – насыпают порошок сульфата аммония до полного насыщения. Наблюдают, выпадет ли осадок. Те же реакции выполняют с фильтратом, полученным из печени голодавшего животного.

Оформление работы. Результаты заносят в таблицу; сравнивают данные, полученные в опытах с печенью сытого и голодавшего животных, и делают выводы относительно содержания гликогена в печени сытого и голодавшего животных.

Исследуемый препарат	Реактивы		
	спирт	ацетат свинца	сульфат аммония
Печень сытого животного			
Печень голодавшего животного			

Практическое значение работы: Гликоген представляет собой белый порошок, хорошо растворяющийся в воде с образованием коллоидного раствора. Подобно белкам, гликоген обладает резко выраженными гидрофильными свойствами, поэтому его можно легко выделить из растворов при высаливании солями щелочных и щелочно-земельных металлов и спиртом. В печени человека при нормальном питании создается депо из 80-120 г гликогена. При голодании в течение суток почти весь запас гликогена расходуется и его не удастся обнаружить при помощи обычных качественных реакций.

Лабораторная работа № 23. Определение активности α -амилазы в сыворотке крови амилокластическим методом

Реактивы и оборудование: крахмал, 20 г/л раствор; фосфатный буфер, 0,1 М раствор с pH 7,2; натрия хлорид, 30 г/л раствор; соляная кислота, 1 М раствор; йод, 0,1 М раствор в 30 г/л растворе йодида калия. Водяная баня; штатив с пробирками; пипетки вместимостью 1 мл; мерные колбы вместимостью 50 мл; ФЭК.

Материал: сыворотка крови.

Метод основан на фотометрическом определении убыли крахмала в ходе реакции гидролиза его α -амилазой сыворотки крови. Разница концентраций крахмала до и после гидролиза пропорциональна активности фермента.

Ход работы. В две пробирки (опытную и контрольную) вносят по 0,5 мл раствора крахмала, по 0,3 мл фосфатного буфера и по 0,1 мл раствора хлорида натрия. Содержимое перемешивают и встряхиванием и помещают пробирки на 10 мин в водяную баню при 37°C.

В опытную пробу добавляют 0,1 мл сыворотки крови, а в контрольную - 0,1 мл раствора соляной кислоты и затем 0,1 мл сыворотки крови. Перемешивают смесь в пробирках и ставят пробы на 30 минут в термостат при 37°C.

По окончании инкубации в опытную пробирку прибавляют 0,1 мл раствора соляной кислоты и быстро перемешивают содержимое встряхиванием – реакция останавливается.

Отбирают по 0,2 мл содержимого обеих пробирок и переносят в две мерные колбы на 50 мл. Приливают в них по 40 мл дистиллированной воды и по 0,5 мл раствора йода в йодиде калия. Перемешивают и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Полученные растворы тотчас фотометрируют на ФЭКе против воды при 630-690 нм (красный светофильтр) в кювете толщиной слоя 1 см.

Расчеты проводят по формуле

$$X = \frac{(E_k - E_{оп}) \cdot 0,01 \cdot 2 \cdot 1000}{E_k \cdot 0,1}$$

где x – активность амилазы сыворотки крови, г/(ч·л); E_k – экстинкция контрольной пробы; $E_{оп}$ – экстинкция опытной пробы; 0,01 – масса крахмала в пробе, г; 2 – пересчет на 1 ч инкубации; 1000 – коэффициент пересчета на 1 л сыворотки крови; 0,1 – объем сыворотки, взятой на исследование, мл.

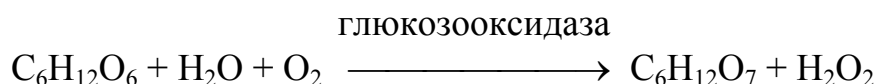
Оформление работы. Рассчитать активность фермента, сравнить ее с нормой и сделать вывод.

Практическое значение работы. В норме активность амилазы сыворотки крови, определенная амилокластическим методом, составляет 15-30 г/(ч·л). Источником сывороточной амилазы служат поджелудочная железа и околоушная слюнная железа. У здорового человека количество слюной и панкреатической амилазы примерно одинаково. Возрастание активности амилазы крови (гиперамилаземия) наблюдается при остром панкреатите, когда она повышается в 10-30 раз, достигая максимума через сутки после начала заболевания, и затем постепенно приходит к норме на 2-6 день. При хронических панкреатитах гиперамилаземия умеренная. Она встречается также при поражениях слюнных желез.

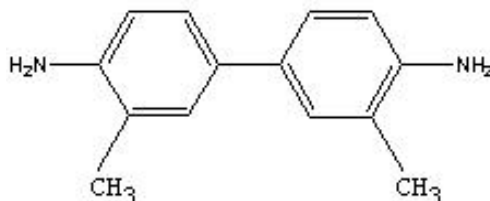
Лабораторная работа № 24. **Энзиматический метод количественного определения глюкозы в крови**

Метод предназначен для специфического определения содержания глюкозы в биологических жидкостях после удаления белков в присутствии других сахаров и редуцирующих веществ неуглеводной природы. Метод основан на каталитическом действии глюкозооксидазы (1.1.3.4), ускоряющей окисление β -D-глюкозы кислородом воздуха до глюконовой кислоты.

Глюкозооксидаза (M=152 000) относится к флавопротеинам. При окислении глюкозы в ее присутствии образуется пероксид водорода в эквимольном количестве:



Пероксид водорода разлагается ферментом пероксидазой, а выделившийся атомарный кислород окисляет добавленный к реакционной смеси хромогенный кислородный акцептор. В качестве такового применяют *o*-толидин:



Количественное определение глюкозы сводится к измерению экстинкции образовавшегося в опыте красителя и сравнению ее с таковой при использовании стандартного раствора глюкозы. Прямая зависимость между содержанием глюкозы и интенсивностью окраски сохраняется в пределах от 50 до 400 мг/л.

Реактивы и оборудование: спектрофотометр; секундомер; пипетки; пробирки; 1%-ный раствор перекристаллизованного в абсолютном этаноле *o*-толидина; 0,25 н ацетатный буфер pH=4,8 (4 части 0,25 н уксусной кислоты смешивают с 6 частями 0,25 н ацетата натрия); стандартные растворы глюкозы (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мкг/мл), приготовленные на насыщенном водном растворе бензойной кислоты; рабочий реактив для определения глюкозы энзиматическим методом⁴.

К пробе, содержащей 1 мл исследуемого образца, приливают 3 мл рабочего реактива для определения глюкозы. Одновременно в аналогичные пробирки, содержащие по 1 мл раствора глюкозы (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мкг/мл), и в контрольную пробирку, содержащую 1 мл воды, также приливают 3 мл рабочего реактива. Прибавление рабочего реактива в каждую пробирку проводят в определенной последовательности с точным интервалом в 2 мин. Эту последовательность следует соблюдать и при измерении оптической плотности растворов.

В ходе реакции развивается окраска, интенсивность которой постепенно возрастает и достигает своего максимума при комнатной температуре через несколько минут после прибавления рабочего реактива (в зависимости от активности препарата глюкозооксидазы). Поэтому предварительно определяют

⁴ *Рабочий реактив для определения глюкозы энзиматическим методом.* К 70-80 мл 0,25 н. ацетатного буфера (pH=4,8) добавляют 2 мг глюкозооксидазы и 1 мг сухой кристаллической пероксидазы. Смесь перемешивают, приливают 1 мл 1%-ного раствора *o*-толидина и доводят объем пробы до 100 мл ацетатным буфером. Реактив готовят за 1 – 2 ч до употребления. Он может храниться в холодильнике в темных закрытых склянках в течении 1–1,5 месяцев.

время, необходимое для развития максимальной синей окраски по стандартным растворам глюкозы с концентрациями 50 и 400 мкг/мл. Для этого измеряют изменение интенсивности окраски стандартного раствора глюкозы после добавления рабочего реактива на фотоэлектроколориметре с длиной волны 670 нм (кювета шириной 10 мм). Сначала интенсивность окраски увеличивается, далее остается неизменной в течение нескольких минут, а затем начинает медленно уменьшаться. В соответствии с полученными данными принимают время развития окраски во всех остальных пробах.

На основании полученных величин оптической плотности (экстинкции) для всех стандартных растворов глюкозы строят градуировочную зависимость. По построенной градуировочной зависимости рассчитывают количество глюкозы в исследуемых пробах.

№	Стандартный (400 мкг/мл) раствор глюкозы, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация глюкозы, мкг/мл
1	0,125	0,875	50
2	0,250	0,750	100
3	0,375	0,625	150
4	0,500	0,500	200
5	0,625	0,375	250
6	0,750	0,250	300
7	0,875	0,125	350
8	1,000	-	400

Оформление работы. Описать принцип метода. Результаты измерений и найденное содержание глюкозы в испытуемом растворе занести в рабочую тетрадь.

Практическое значение работы: В норме содержание глюкозы в крови составляет 3,5-6,7 ммоль/л. Увеличение уровня глюкозы в крови (гипергликемия) наблюдается при сахарном диабете, при стрессовых состояниях, приеме глюкокортикоидов и т.д. Низкое содержание глюкозы в крови (гипогликемия) имеет место при голодании, нарушении всасывания глюкозы в тонком кишечнике (малосорбция), передозировке инсулина, гликогенозах и т.д.

Лабораторная работа № 25. Экспресс-определение глюкозы в крови с использованием глюкометра

Глюкометры применяются для количественного определения содержания глюкозы в крови людьми, страдающими сахарным диабетом, в домашних условиях, а также медицинским персоналом в медучреждениях в качестве средства отслеживания уровня глюкозы в крови. Для людей, страдающих сахарным диабетом, определение содержания глюкозы в крови – необходимый ежедневный анализ.

В России наибольшее распространение получили глюкометры «One Touch» (Johnson and Johnson, USA), «Accu-Chec» (Roche, Франция), «Elite» (Байер, Германия), «Сателлит» (ЭЛТА, Россия).

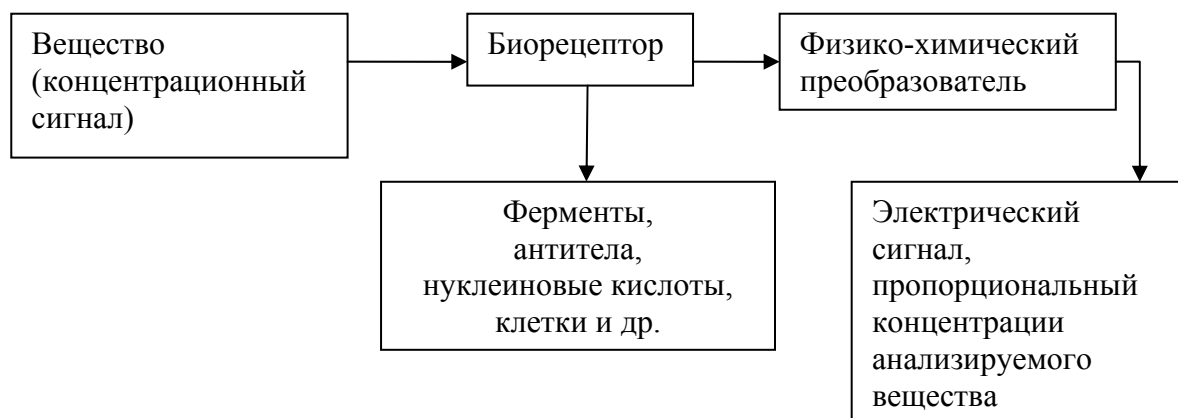


Рисунок. Глюкометр «One Touch Select»

Глюкометр «One Touch» по принципу функционирования представляют собой биосенсор.

Биосенсоры – это аналитические устройства, использующие биологический материал для «узнавания» определенных молекул и выдающие информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала. Большинство биосенсоров ориентированы на анализ биологических жидкостей, например крови.

Принципиальная схема биосенсора:

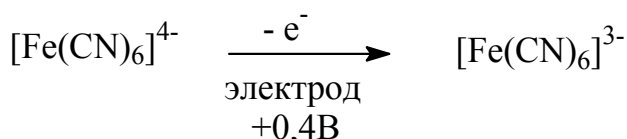
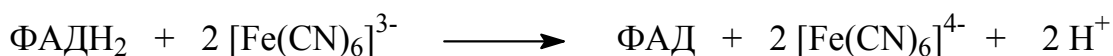
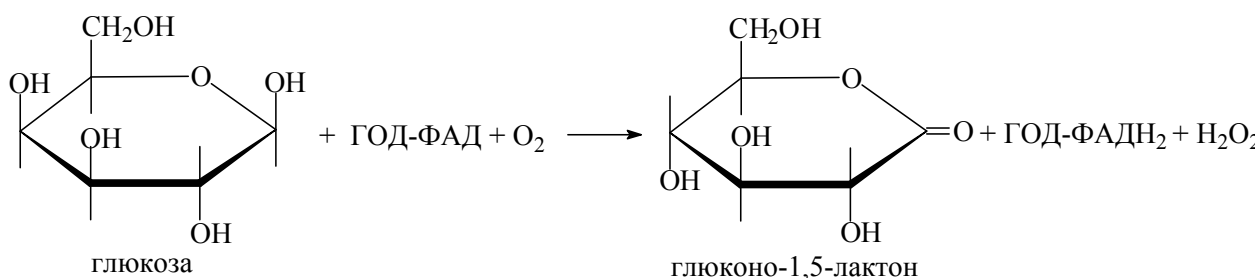


Амперометрические медиаторные ферментные биосенсоры нашли широкое применение в клинической биохимии. Так, самые распространенные глюкометры для домашнего использования представляют собой миниатюрные амперометрические биосенсоры с одноразовыми электродами (тест-полосками), изготовленными печатным методом. На полимерной подложке тест-полоски расположены три электрода: электрод сравнения в виде

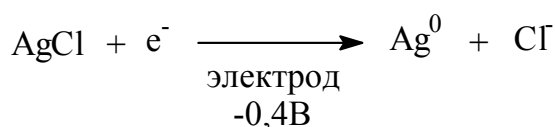
серебряной нити с добавлением хлорида калия на поверхности нити (хлорсеребряный электрод), вспомогательный графитовый электрод и рабочий графитовый электрод. На поверхности рабочего графитового электрода иммобилизован фермент глюкозооксидаза, гексацианоферрат (III) калия (феррицианид) – медиатор электронного транспорта и соли для создания буферной системы. Полупроницаемая полимерная мембрана ограничивает доступ форменных элементов крови и белков плазмы к поверхности электрода, что позволяет проводить анализ без пробоподготовки. Высокая чувствительность метода позволила минимизировать объем пробы крови до 1-2 мкл (капля).

Принцип биосенсорного определения глюкозы в крови с помощью медиаторного глюкозооксидазного электрода представлен на схеме:

Анод (подается потенциал +0,4 В относительно электрода сравнения):



Катод:



Ток окисления медиатора пропорционален содержанию глюкозы в анализируемом образце крови.

Материалы: глюкометр, инструкция по пользованию, ручка для прокалывания, новый стерильный ланцет.

Ход работы (для глюкометра «One Touch Ultra»:

Для глюкометров других производителей и моделей ход анализа может отличаться! Смотрите инструкцию!

1) *Взятие пробы крови.* Каплю крови можно получить как из кончика пальца, так и из предплечья. Вымойте руки и место прокола теплой водой с мылом и тщательно просушите. Проколите палец или предплечье ланцетом.

Плотно прижмите ручку для прокалывания к месту прокола. Нажмите кнопку спуска. Слегка помассируйте поверхность, пока не образуется капля

крови достаточного размера. Объем полученной крови должен составлять не менее 1 мкл, иначе получится неправильный результат.

2) *Введение тест-полоски.* Возьмите тест-полоску из флакона. Прежде, чем вводить тест-полоску в прибор, проверьте номер кода на флаконе с тест-полосками. Немедленно закройте флакон крышкой. Введите тест-полоску контактными полосами и лицевой стороной вверх. Тест полоска должна войти до упора. Прибор включится, и на короткий промежуток времени возникнет изображение контрольного экрана. Убедитесь, что номер кода на экране прибора **соответствует** номеру кода на флаконе с тест-полосками.

3) *Нанесение капли крови.* Когда на экране глюкометра появится мигающий символ капли крови к узкому каналу у верхнего края тест-полоски и удерживайте тест-полоску у края капли крови, пока контрольное поле не заполнится целиком и прибор начнет обратный отсчет.

4) *Получение результата.* Результат определения глюкозы в крови появится по окончании отсчета прибором секунд от 5 до 1.

Выключите прибор, вынув тест-полоску.

Глюкометры «One Touch» имеют диапазон измерений 1,1 – 33,3 ммоль/л.

Оформление работы. Опишите принцип метода, ход работы и занесите полученные значения содержания глюкозы в крови в лабораторную тетрадь. Сделайте выводы об уровне глюкозы в крови у испытуемого.

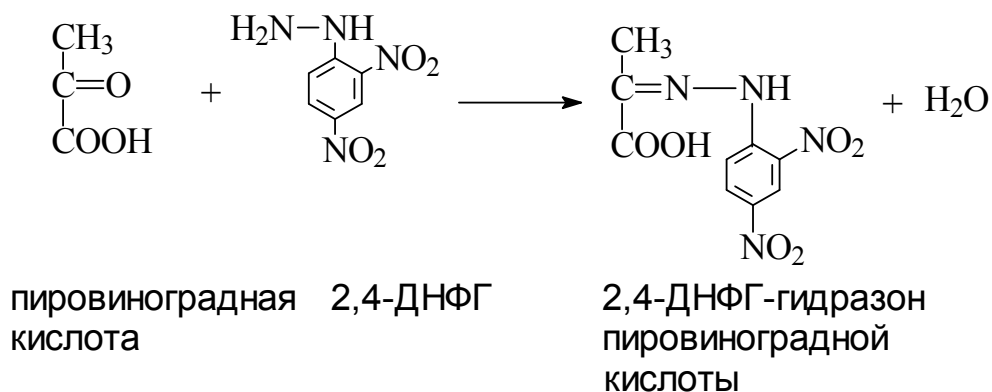
Практическое значение работы. Содержание глюкозы в крови для людей, не страдающих сахарным диабетом, зависит от времени прошедшего после последнего приема пищи:

<i>Время суток</i>	<i>Диапазон, ммоль/л</i>
До завтрака	3,9-5,8
До обеда или ужина	3,9-6,1
Через 1 час после приема пищи	Менее 8,9
Через 2 часа после приема пищи	Менее 6,7
Между 2.00 и 4.00 часами утра	Более 3,9

Сравните полученный результат с соответствующим результатом из таблицы. Сделайте вывод о соответствии полученного результата нормальному уровню глюкозы в крови.

Лабораторная работа № 26. **Количественное определение пировиноградной кислоты в крови**

Пировиноградная кислота взаимодействует с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием гидразона пировиноградной кислоты, который в щелочной среде имеет красный цвет. Интенсивность окраски раствора пропорциональна содержанию пирувата.



Объект исследования: кровь цельная

Реактивы и оборудование: центрифуга, фотоэлектроколориметр (КФК-2), пробирки, пипетки, 5% раствор трихлоруксусной кислоты, 0,1% раствор 2,4-динитрофенилгидразина, толуол, 10% раствор карбоната натрия, 1,5М раствор гидроксида натрия, дистиллированная вода.

Ход работы.

1. В центрифужную пробирку к 1 мл крови прилить 4 мл раствора трихлоруксусной кислоты, перемешать и центрифугировать. Осторожно отобрать 2,5 мл надосадочной жидкости, добавить 0,5 мл воды и 1 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Перемешать, закрыть пробкой и оставить в темном месте на 20 мин.

2. Добавить 5 мл толуола, закрыть и интенсивно встряхнуть в течение 3 мин. Нижний слой после 3-х минутного отстаивания отсосать пипеткой и отбросить.

3. К оставшемуся толуольному слою прилить 4 мл 10% раствора карбоната натрия. Встряхивать 3 минуты.

4. Через 3 мин стояния в простые пробирки отобрать из нижнего слоя по 3 мл 1,5 М раствора гидроксида натрия. Развивается красное окрашивание. Колориметрировать в кювете на 1 см ($\lambda = 415$ нм) против воды.

Расчет произвести по калибровочному графику.

Содержание пировиноградной кислоты рассчитывается по формуле:

$$X = A \cdot 2 \cdot 1000, \quad \text{где}$$

X - количество пирувата в мг/л;

A - количество пирувата в мг в пробе, найденное по калибровочному графику;

2 - расчет на 1 моль крови;

1000 - расчет на 1 л крови

Содержание пировиноградной кислоты в ммоль/л рассчитывается по формуле:

$$C = \frac{X}{88}, \quad \text{где}$$

X - количество пирувата в мг/л;

88 - молярная масса пировиноградной кислоты, мг/ммоль;

C - содержание пирувата в ммоль/л.

Практическое значение работы.

В норме содержание пирувата в крови составляет 8 - 12 мг/л (0,10 - 0,14 ммоль/л). Его уровень повышается при авитаминозе В₁, поскольку тиаминдифосфат участвует в окислительном декарбоксилировании пирувата. Содержание пирувата в крови может увеличиваться при токсическом воздействии некоторых соединений, ингибирующих ферменты окисления пирувата (арсенаты, люизит).

Оформление работы. Заносят в тетрадь принцип метода, рассчитывают содержание пирувата в крови и делают вывод.

Лабораторная работа № 27. **Выявление гликолиза в мышечной ткани**

Метод основан на выявлении убыли глюкозы и накопления молочной кислоты в среде под действием ферментов гликолиза мышечной ткани в присутствии и в отсутствие фторида натрия, являющегося ингибитором гликолиза. Глюкоза обнаруживается по реакции с о-толуидином, в результате чего образуется окрашенное соединение зеленого цвета при нагревании в среде с уксусной кислотой. Молочная кислота при нагревании с концентрированной серной кислотой превращается в ацетальдегид, дающий с гваяколом характерное красное окрашивание.

Материал исследования: мышечная ткань (свежая) забитого животного.

Реактивы и оборудование: фосфатный буфер, 0,1 М раствор с рН 8,0; глюкоза, 10 г/л раствор, свежеприготовленный; трихлоруксусная кислота (ТХУ), 100 г/л раствор; сульфат меди (II), 100 г/л раствор; серная кислота, конц.; гваякол, 1,0 г/л раствор в 70%-ном растворе; вазелиновое масло; оксид кальция, порошок, навески по 0,25 г в бумажных пакетиках. Водяная баня с термометром; штатив с пробирками; пипетки вместимостью 1 и 2 мл; глазные пипетки; воронки со складчатыми бумажными фильтрами; стеклянные палочки; аптечные весы с разновесами.

Ход работы. В три пробирки отмеривают по 2 мл фосфатного буфера и по 1 мл раствора глюкозы. Затем в первую пробу добавляют 1 мл раствора ТХУ, а во вторую – 0,2 мл раствора фторида натрия.

Мышечную ткань мелко измельчают ножницами и вносят во все пробирки по 1 г мышечной кашицы, содержимое тщательно перемешивают стеклянной палочкой и приливают 10 капель вазелинового масла (для защиты от кислорода воздуха). Пробирки выдерживают на водяной бане при 37°C с течение 30 минут. После инкубации во вторую и третью пробы добавляют по 1 мл раствора ТХУ и перемешивают.

Содержимое всех пробирок фильтруют через бумажный фильтр в чистые пробирки. С фильтратом проводят реакции на глюкозу и молочную кислоту.

Для проведения реакции на глюкозу берут по 0,1 мл фильтрата, переносят его в чистые пробирки и добавляют в них по 0,4 мл воды и по 2,0 мл о-толуидинового реактива. Помещают пробирки на кипящую водяную баню на 8 минут, после чего охлаждают под струей холодной воды. Сравнивают интенсивность окраски исследуемых проб.

Для проведения реакции на молочную кислоту к оставшемуся фильтрату в обеих пробах добавляют по 5 капель раствора сульфата меди и по 0,25 мл оксида кальция (для осаждения углеводов, которые мешают обнаружению молочной кислоты). Пробы оставляют стоять 10 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая их. Затем содержимое пробирок фильтруют через бумажный фильтр в две чистые пробирки, помещенные в лед или снег, отбирают по 10 капель фильтрата и осторожно добавляют в каждую из них по 30 капель концентрированной серной кислоты. Все пробирки помещают на 5 минут в кипящую водяную баню (для превращения молочной кислоты в ацетальдегид). Затем пробирки охлаждают и добавляют по 2 капли спиртового раствора гваякола. Через 20 минут сравнивают интенсивность окрашивания в пробах.

Оформление работы. Результаты оформить в виде таблицы.

Исследуемая проба	Субстрат	Ингибитор	Реакция на глюкозу	Реакция на молочную кислоту

Сделать вывод о наличии гликолиза в мышечной ткани и о методических подходах к его изучению.

Практическое значение работы. При анаэробном расщеплении углеводов образуется две молекулы АТФ на одну молекулу расщепленной глюкозы, что является важным дополнительным источником образования энергии. В эритроцитах гликолиз является способом производства энергии. В анаэробных условиях, когда организм испытывает недостаток кислорода, этот путь образования энергии является основным для сохранения жизнедеятельности тканей. В эксперименте и клинике определение скорости гликолиза в клетках крови и биоптатах широко используется для оценки образования энергии анаэробным путем.

Раздел VI. Обмен липидов

Задачи раздела:

- 1) изучение физико-химических свойств липидов и их метаболизма, а также роли перекисного окисления липидов в развитии патологии;
- 2) знакомство с основными методами количественного определения различных представителей липидов в биологических жидкостях для использования их на практике;
- 3) научиться использовать знания об изменениях липидного состава органов и биологических жидкостей в норме и при болезнях для объяснения нормальных функций организма и их нарушений при патологии.

Основные классы липидов и их функции

Лабораторная работа № 28. Исследование кинетики действия липазы поджелудочной железы

Об активности панкреатической липазы судят по количеству освободившихся под действием фермента жирных кислот, которые оттитровывают щелочью.

Материал исследования: растительное масло.

Реактивы и оборудование: препарат панкреатической липазы, желчь медицинская, 0,1%-й спиртовой раствор фенолфталеина, 0,01 М раствор гидроксида натрия, термостат, химические стаканы, колбы для титрования, бюретки.

Ход работы.

В 3 химических стакана наливают по 5 мл растительного масла и 5 мл воды. Во 2-й стакан добавляют 1 мл препарата липазы, в 3-й – 1 мл препарата липазы и 1 мл желчи.

Содержимое стаканов инкубируют в термостате при 37°C. Через 15, 30, 45 и 60 мин инкубации отбирают пробы по 2 мл, которые титруют 0,01 М раствором гидроксида натрия в присутствии 1-2 капель фенолфталеина до слабо-розового окрашивания.

Оформление работы. Результаты работы записывают в тетрадь в виде таблицы.

Время инкубации, мин	Объем 0,01 М NaOH, пошедшего на титрование, мл		
	контроль	липаза	липаза + желчь
0			
15			
30			
45			
60			

На основании полученных результатов стоят график, откладывая по оси абсцисс время (в минутах), а по оси ординат – количество мл 0,01 М раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование жирных кислот, образовавшихся за данный промежуток времени.

Обмен холестерина

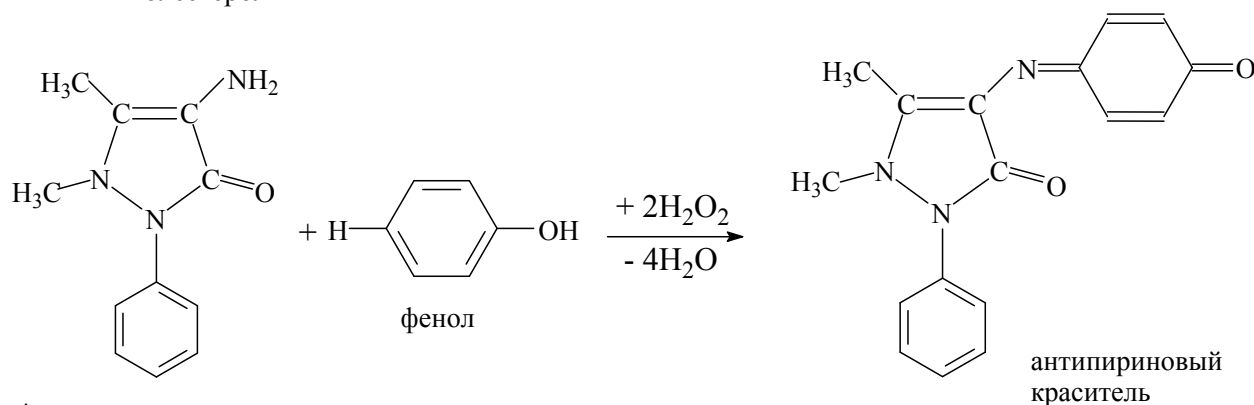
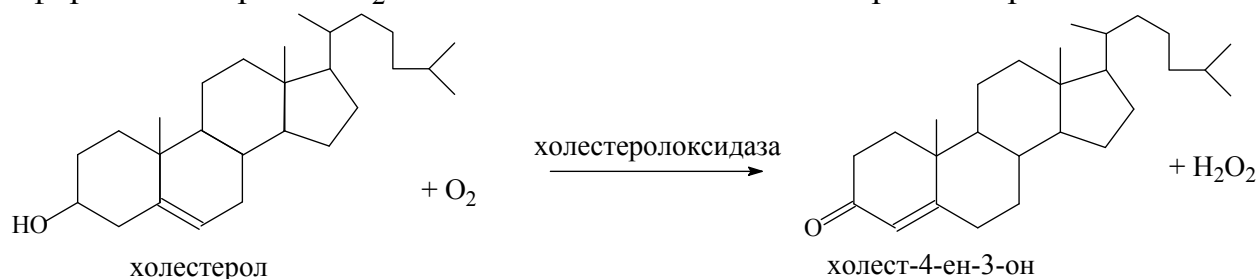
Лабораторная работа № 29. Определение общего холестерина в сыворотке крови энзиматическим колориметрическим методом

Принцип метода

Метод основан на реакциях гидролиза эфиров холестерина под действием холестеролэстеразы и окисления холестерина под действием холестеролоксидазы с образованием перекиси водорода. Фенол с 4-

аминоантипирином (1-фенил-2,3-диметил-4-аминопиразолон) в присутствии перекиси водорода образует окрашенное в красный цвет соединение – хинониминный краситель.

эфиры холестерина + H₂O $\xrightarrow{\text{холестеролэстераза}}$ холестерол + жирные кислоты



4-аминоантипирин

Концентрация хинонимина, определяемая фотометрически, пропорциональна концентрации холестерина в пробе.

Реактивы и оборудование

Спектрофотометр, автоматические пипетки, пробирки.

Рабочий реагент: раствор, содержащий 0,1 М фосфатный буфер, pH=7,5, фенол 20 мМ, холестеролэстеразу 400 Ед/л, холестеролоксидазу 250 Ед/л, пероксидазу 400 Ед/л, 4-аминоантипирин 0,4 мМ (стабилен не менее 60 суток при хранении при 2-8°С в темноте)

Калибратор: раствор холестерина 5,17 ммоль/л (200 мг/100 мл).

Ход работы

Подготовьте пробы следующего состава:

Отмерить	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Сыворотка (плазма), мл	0,03	-	-
Калибратор, мл	-	0,03	-
Дистиллированная вода, мл	-	-	0,03
Рабочий реагент, мл	3,0	3,0	3,0

Пробы перемешайте и инкубируйте не менее 15 минут при температуре 20-25°С или 10 минут при 37°С. Измерьте оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 500 нм (490-

520 нм). Окраска стабильна не менее 2 часов после окончания инкубации при предохранении от прямого света.

Линейность метода до 25,8 ммоль/л (1000 мг/100 мл).

Расчет концентрации (С) холестерина проведите по формуле:

$$C = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \times 200 \text{ (мг/100 мл)} \quad \text{или} \quad C = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \times 5,17 \text{ (ммоль/л)}$$

где $E_{\text{пробы}}$ – оптическая плотность опытной пробы, $E_{\text{калибратора}}$ – оптическая плотность калибровочной пробы.

Практическое значение работы. Одним из показателей, характеризующих состояние обмена ХС, является его количественное содержание в плазме крови. У взрослых здоровых людей оно равно 3,9-6,5 ммоль/л (1,5-2,5 г/л, 150-250 мг/100 мл).

Оценивая уровень холестерина, нужно учитывать, что в связи с проблемами атеросклероза и ишемической болезни сердца в последние годы нормой считается содержание не выше 5,17 ммоль/л (200 мг/100 мл), умеренным повышением – в пределах 5,17-6,47 ммоль/л (200-250 мг/100 мл), что при сочетании с другими неблагоприятными факторами (повышенное артериальное давление, курение, ожирение, гормональные нарушения и т. д.) может привести к раннему проявлению ишемической болезни сердца.

Оформление работы. Опишите принцип метода, ход работы и занесите полученные значения содержания холестерина в лабораторную тетрадь. Сделайте выводы о содержании холестерина в крови у испытуемого.

Липопротеины. Патология и регуляция липидного обмена

Лабораторная работа № 30. **Определение содержания β - и пре- β -липопротеинов сыворотки крови турбодиметрическим методом по Бурштейну и Самай**

Принцип метода основан на способности гепарина образовывать с β - и пре- β -липопротеинами сыворотки крови комплекс, который под действием хлористого кальция выпадает в осадок. Степень помутнения раствора прямо пропорциональна концентрации этих липопротеинов сыворотки крови.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы и оборудование: 0,025 М раствора хлористого кальция, гепарин, фотоэлектроколориметр, штатив с пробирками, пипетки.

Ход работы. В пробирку налить 2,0 мл раствора хлористого кальция, микропипеткой набрать 0,2 мл сыворотки и внести в пробирку с хлористым кальцием, несколько раз промыть пипетку содержимым пробирки. Определить исходную оптическую плотность (D_1) на фотоэлектроколориметре (кювета 0,5 см, красный светофильтр). Перенести содержимое кюветы опять в пробирку и добавить 0,04 мл гепарина, несколько раз промыв пипетку содержимым пробирки. Ровно через 4 минуты измерить оптическую плотность (D_2) в тех же условиях.

Содержание β - и пре- β -липопротеинов в сыворотке крови рассчитать по формуле:

$$X = (D_2 - D_1) \cdot 11,65;$$

где X – содержание β - и пре- β -липопротеинов в г/л;

D_2 и D_1 – оптические плотности после и до добавления гепарина;

11,65 – эмпирический коэффициент перерасчета для выражения β - и пре- β -липопротеинов в г/л (на определенном колориметре).

Практическое значение работы. В норме содержание липопротеинов в сыворотке крови составляет 3,6-6,4 г/л. Наиболее часто наблюдается увеличение содержания β -липопротеинов. Повышение их количества тесно связано с повышенным содержанием холестерина в крови, так как холестерин входит в состав, главным образом β -липопротеинов. Повышение β -липопротеинов имеет место при заболеваниях, связанных с нарушением липидного обмена (атеросклерозе, сахарном диабете и др.) Определение их содержания имеет значение не только для выявления нарушений липидного обмена, но и как показатель функции печени (гепатиты).

Оформление работы. По полученным значениям оптической плотности рассчитать содержание β -липопротеинов в сыворотке крови и сделать вывод о возможных нарушениях липидного обмена.

Лабораторная работа № 31. Определение холестерина в α -липопротеинах

Принцип метода основан на том, что фракции β - и пре- β -липопротеинов осаждаются гепарином в присутствии ионов марганца. При этом α -липопротеины остаются в супернатанте, в котором и определяют содержание холестерина.

Исследуемый материал: сыворотка или плазма крови.

Реактивы и оборудование: 1 М раствор хлорида марганца, раствор гепарина, 5000 МЕ/мл, фотоэлектроколориметр, штатив с пробирками, пипетки.

Ход работы. В центрифужную пробирку, стоящую в штативе со льдом, вносят 1 мл сыворотки или плазмы крови и добавляют микропипеткой 0,04 мл гепарина. Смесь перемешивают, добавляют 0,05 мл хлорида марганца (1 моль/л) и встряхивают. Помутневшую сыворотку оставляют на льду на 30 мин. Затем пробы центрифугируют при 2500 об/мин в течение 30 минут при 4-6°C. Осторожно, чтобы не взмутить осадок, вынимают пробирки из центрифуги и переносят верхний слой в другую пробирку для определения содержания холестерина методом Илька.

Практическое значение работы. В норме содержание холестерина в α -липопротеинах составляет 0,9 – 1 ммоль/л или 35-75 мг/дл. Данная фракция липопротеинов рассматривается как антиатерогенная. Поэтому ее значение учитывается в различных коэффициентах, оценивающих риск развития ишемической болезни сердца, например, холестериновом коэффициенте атерогенности, предложенным акад. РАМН Климовым:

$$K_{\text{ХС}} = \frac{XС_{\text{общий}} \div XС_{\text{ЛВП}}}{XС_{\text{ЛНП}}},$$

где $K_{\text{ХС}}$ – холестериновый коэффициент атерогенности, $XС_{\text{ЛВП}}$ – холестерин липопротеинов низкой плотности.

У здоровых лиц $K_{\text{ХС}}$ не превышает 3-3,5. У больных ИБС величина коэффициента нередко достигает 5-6 и более единиц.

Свободно-радикальное (перекисное) окисление липидов, являющееся неспецифическим механизмом патологии клеточных мембран, составляет основу стрессорного повреждения внутренних органов. Поэтому изучение свободно-радикальных процессов может служить источником ценной информации о ходе адаптивных реакций и их “цене”.

Лабораторная работа № 32. Измерение диеновых конъюгатов (ДК) в плазме крови по УФ-поглощению гептановых экстрактов

Принцип метода основан на измерении интенсивности поглощения при 232 нм гептановых экстрактов из плазмы крови, обусловленной конъюгированными диеновыми структурами, возникающими при образовании гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот.

Исследуемый материал: плазма крови.

Реактивы и оборудование: спектрофотометр; флаконы с пробками; свежеприготовленная гептан-изопропанольная смесь (2:1); НСІ с рН 2,0.

Техника выполнения работ. Во флаконы к 0,2 мл плазмы крови добавьте 6 мл гептан-изопропанольной смеси, приготовленной перед опытом, плотно закройте флакон пробкой и встряхивайте в течение 15 минут. Добавьте 1 мл раствора НСІ с рН 2,0, быстро встряхните и после отстаивания отберите верхнюю гептановую фазу. Оптическую плотность гептановых экстрактов измерьте на спектрофотометре при 232 нм, используя в качестве контрольных образцов гептановые экстракты, полученные после замены плазмы на 0,2 мл дистиллированной воды.

Лабораторная работа № 33. Определение перекисей в липидах плазмы крови в реакции с тиобарбитуровой кислотой по Э.Н. Коробейниковой

Принцип метода. При нагревании в кислой среде часть продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), относящихся к классу эндоперекисей, разлагается с образованием малонового диальдегида (МДА), при взаимодействии которого с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) образуется комплекс розово-красного цвета.

Материалы: плазма крови.

Реактивы и оборудование: водяная баня; центрифуга; ФЭК КФК-3; штатив с пробирками; 17 %-ный раствор ТХУ; 0,8 %-ный раствор ТБК, приготовленный перед реакцией.

Техника выполнения работы. К 0,5 мл плазмы крови добавьте 5 мл 17 %-ного раствора ТХУ и после перемешивания оставьте стоять на холоде в течение 15 минут. После этого центрифугируйте при 6000 об/мин в течение 5 минут.

Надосадочную жидкость слейте, а к осадку добавьте 2 мл дистиллированной воды, 1 мл 0,8 %-ного раствора ТБК, тщательно перемешайте, закройте пробками и поставьте на водяную баню при 99-100°C. Через 1 час пробирки достаньте, охладите под струей холодной воды и центрифугируйте при 6000 об/мин в течение 10 минут. Определите величину оптической плотности центрифугата на ФЭКе КФК-3 при 535 нм и 580 нм, чтобы исключить поглощение окрашенных комплексов ТБК с веществами нелипидной природы (сахарами, сиаловыми кислотами, некоторыми аминокислотами). Концентрацию ТБК-активных продуктов рассчитайте по уравнению:

$$C = 0,21 + 26,5 \Delta D$$

где С - концентрация ТБК-активных продуктов (в наномолях МДА на 1 мл плазмы; ΔD - показатель $D_{535} - D_{580}$ в центрифугате (в ед. опт. пл.).

Практическое значение работы. Перекисное окисление липидов является нормальным метаболическим процессом, протекающим во всех органах и тканях организма. В норме образование перекисей липидов контролируется на разных стадиях развития свободнорадикального окисления (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, токоферол). Чрезмерное ПОЛ имеет место при многих патологических процессах воспалительного и деструктивного характера, действии токсических веществ, снижении антиоксидантной защиты организма (авитаминоз Е). Образующиеся при ПОЛ свободные радикалы изменяют химический состав, физические свойства, проницаемость и структуру биологических мембран. Поэтому избыточное ПОЛ считается одной из основных причин нарушения структуры и функции биологических мембран. Перекиси липидов способствуют образованию сшивок белок - липид, развитию и накоплению повреждений в коллагеновых фибриллах и мукополисахаридных комплексах.

Лабораторная работа № 34. Определение общей антиокислительной активности сыворотки крови по Г.И.Клебанову, И.Б.Бабенковой, Ю.О.Теселкину, О.С.Комарову, Ю.А.Владимирову

Принцип метода: общая антиокислительная активность (АОА) сыворотки крови определяется по величине торможения перекисного окисления липидов какой-либо модели. В настоящей работе для исследования АОА была использована модельная система, представляющая собой суспензию липопротеинов желтка куриного яйца. Таким образом, об общей антиокислительной активности судят по степени торможения сывороткой крови накопления в инкубационной среде ТБК-позитивных продуктов.

Материалы: плазма крови.

Реактивы и оборудование: водяная баня; центрифуга; ФЭК КФК-3; штатив с пробирками; 20 %-ный раствор ТХУ; 0,8 %-ный раствор ТБК, приготовленный перед реакцией; суспензия желточных липопротеинов; фосфатный буфер, pH 7,45; 25 мМ р-р $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; хлороформ.

Техника выполнения работы. Берут две пробирки. В первую (опыт) и вторую (контроль) вносят по 0,5 мл суспензии желточных липопротеинов

(ЖЛП). Затем в первую пробирку добавляют 0,5 мл плазмы крови, а во вторую – 0,5 мл дист. воды. После этого в обе пробирки вносят по 4 мл фосфатного буфера. Во всех пробах ПОЛ инициируют добавлением 1 мл 25 мМ р-ра $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, который готовят перед употреблением. Готовят третью (нулевую) пробу, которая содержит только фосфатный буфер и р-р $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Пробы инкубируют при 37°C в течение 30 минут при интенсивном перемешивании. Скорость ПОЛ определяли по количеству накопленных в образце продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. После инкубации отбирали по 2 мл из каждой пробы, приливали по 1 мл 20% р-ра ТХУ и 0,1 мл 10-2М раствора ионола в этаноле. Затем содержимое пробирок перемешивали и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин на центрифуге ОПН-3. К 2 мл полученного супернатанта добавляли 1,8 мл ТБК-реагента (0,5% ТБК в 0,3% растворе додецилсульфата натрия). Смесь инкубировали в кипящей водяной бане в течение 15 минут. Далее пробирки охлаждали, добавляли по 2 мл хлороформа и после интенсивного встряхивания вновь центрифугировали при тех же условиях. В водной фазе измеряли оптическую плотность опытной и контрольной проб против нулевой пробы при длине волны 532 нм. АОА плазмы крови рассчитывали по формуле:

$$\text{АОА} = [(\Delta D_k - \Delta D_{\text{пл}}) / \Delta D_k] \times 100\%,$$

$$\text{где } \Delta D_k = D_k^t - D_k^0, \Delta D_{\text{пл}} = \Delta D_{\text{пл}}^t - \Delta D_{\text{пл}}^0,$$

D_k^0 и $\Delta D_{\text{пл}}^0$ – оптическая плотность, измеренная в суспензии ЖЛП и суспензии ЖЛП с плазмой крови до инкубации; D_k^t и $\Delta D_{\text{пл}}^t$ – оптическая плотность, измеренная в тех же образцах в момент времени t (через 30 минут инкубации). Измерение ΔD_k и $\Delta D_{\text{пл}}$ необходимо для того, чтобы учесть исходную степень окисленности суспензии ЖЛП и плазмы крови.

Практическое значение работы. Уровень ПОЛ, например, липидов плазмы крови, определяется с одной стороны, процессами радикало- и перекисеобразования, а с другой – состоянием эндогенных систем антиоксидантной защиты, поэтому оценка АОА этих систем имеет практическое значение.

АОА плазмы крови обусловлена наличием в ней антиоксидантов; ферментных систем обезвреживания перекисей и свободных радикалов, SH-соединений, стероидных гормонов, α -токоферола, церулоплазмينا, трансферрина и др. Механизм действия присутствующих в плазме ингибиторов перекисидации липидов и их вклад в общий антиоксидантный потенциал плазмы различны. Однако для клинической практики важно не столько учесть вклад того или иного эндогенного антиоксиданта, сколько оценить резервы антиоксидантной защиты крови в целом.

Раздел VII. Обмен белков.

- 1) изучение метаболизма белков;
- 2) овладение методами анализа аминокислотного состава биологических жидкостей с помощью хроматографии;
- 3) знакомство с основными методами количественного определения метаболитов белкового обмена в биологических жидкостях для использования их на практике;
- 4) научиться использовать знания о структурном и функциональном многообразии белков, об изменениях белкового состава органов и тканей, а также метаболитов белкового обмена в норме и при болезнях для объяснения нормальных функций организма и их нарушений при патологии.

Источники и пути использования аминокислот в тканях. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте

Лабораторная работа № 35. **Исследование кислотных компонентов желудочного сока**

А. Анализ желудочного сока. Определение общей кислотности желудочного содержимого, а также свободной и связанной НСІ в одной пробе.

Желудочный представляет собой бесцветную жидкость с сильнокислой реакцией (рН 1,5 – 2,5). За сутки у человека выделяется около 1,5 л желудочного сока. В его состав входят вода, белки, ферменты, муцин, соляная кислота, кислореагирующие фосфаты и ряд других веществ.

Принцип метода основан на определении кислотных веществ желудочного сока путем титрования их раствором гидроксида натрия с использованием двух индикаторов: фенолфталеина (в кислой среде остается бесцветным, а в щелочном растворе окрашивается в розовый цвет, изменение окраски в интервале рН = 8,2 – 10,0) и п-диметиламиноазобензола (при наличии свободной НСІ окрашивается в ярко-красный цвет, при отсутствии – дает желтую или оранжевую окраску, переход окраски при рН = 2,9 – 4,0). По изменению окраски (от красной к оранжевой) индикатора п-диметиламиноазобензола определяется свободная НСІ, а по переходу окраски фенолфталеина (от бесцветной к розовой) – общая кислотность желудочного сока.

Материал: желудочное содержимое.

Реактивы и оборудование: бюретки, колбы для титрования, пипетки; 0,1 М раствор NaOH, 1%-ный раствор фенолфталеина в 70%-ном этаноле, 0,5%-ный раствор п-диметиламиноазобензола в 36%-ном этаноле, 1%-ный раствор фенола, 1%-ный раствор хлорида железа (III).

Ход определения.

Для титрования берут 5 мл профильтрованного желудочного содержимого, прибавляют 1-2 капли раствора фенолфталеина и 1-2 капли раствора п-диметиламиноазобензола.

Пробы оттитровывают раствором гидроксида натрия до появления оранжево-красной окраски и отмечают объем щелочи (в мл), пошедшей на титрование свободной соляной кислоты (I пункт титрования).

Продолжают титрование до появления лимонно-желтой окраски (II пункт титрования) и снова отмечают объем щелочи, израсходованной с начала титрования до II пункта.

Затем титрование продолжают до появления розовой окраски (III пункт титрования) и отмечают количество щелочи, пошедшее на титрование от начала до III пункта.

Расчет. Кислотность желудочного содержимого выражают в титрационных единицах. За единицу кислотности желудочного сока принимается объем 0,1 М раствора гидроксида натрия (в мл), пошедший на титрование 100 мл желудочного сока. Поэтому расчеты ведутся на 100 мл. Например, на титрование 5 мл желудочного содержимого потрачено следующее количество 0,1 М раствора NaOH:

1) Появление розово-красного цвета (I пункт титрования) – 2,0 мл;

2) Лимонно-желтого цвета (II пункт титрования) – 2,3 мл;

3) Появление розового цвета (III пункт титрования) – 3,5 мл.

Следовательно:

Свободная соляная кислота составляет: $2,0 \cdot 20 = 40$;

Общая соляная кислота: $\frac{3,5 \times 2,3}{2}$;

Связанная соляная кислота: $58 - 40 = 18$;

Общая кислотность равна: $3,5 \cdot 20 = 70$ (титрационных единиц или моль/л).

Б. Качественная реакция на молочную кислоту в желудочном соке (проба Уфельмана)

Принцип метода. Смешивание хлорида железа (III) с фенолом приводит к образованию фенолята железа, имеющего аметисто-фиолетовую окраску. При наличии молочной кислоты образуется малодиссоциирующая соль лактата железа желто-зеленого цвета.

Ход определения:

Для приготовления фенолята железа в пробирку вносят 10 мл раствора фенола и добавляют к нему 3 капли раствора хлорида железа FeCl_3 . Содержимое перемешивают (развивается аметисто-фиолетовое окрашивание). В пробирку с исследуемым желудочным содержимым вносят 2-3 мл приготовленного раствора. В присутствии молочной кислоты фиолетовая окраска переходит в зелено-желтую.

Оформление работы: Выполнить расчеты общей кислотности желудочного сока, свободной и связанной соляной кислоты. Результаты оформить в виде таблицы. Сделать вывод о характере изменений кислотности желудочного сока.

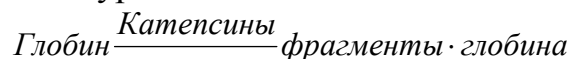
Образцы желудочного сока	Индикатор	Кол-во NaOH, пошедшей на титрование	Пункты титрования	окрашивание	соляная кислота			Общая кислотность	Проба на молочную кислоту
					свободна я	общая	связанная		
Нормальный									
Патологический									

Практическое значение работы. Переваривание белков во многом зависит от кислотности желудочного сока. В норме общая кислотность желудочного содержимого равна 40 – 60 ед., содержание свободной соляной кислоты – 20 – 40 ед., связанной – 5 – 20 ед. При патологии кислотность желудочного сока может быть нулевой, повышенной или пониженной. Отсутствие соляной кислоты и пепсина (ахилия) часто наблюдается при злокачественных новообразованиях желудка. Пониженная кислотность (гипохлоргидрия) встречается при гипоацидном гастрите, иногда при язвенной болезни желудка. Повышенная кислотность (гиперхлоргидрия) имеет место при гиперацидном гастрите и часто сопровождается язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. Присутствие молочной кислоты указывает обычно на гипоацидный гастрит или рак желудка. В связи с этим определение кислотности желудочного сока и наличие в нем молочной кислоты имеет важное значение для диагностики желудочно-кишечных заболеваний.

Лабораторная работа № 36. **Определение активности катепсинов в сыворотке крови по методу А.А.Покровского, А.И.Арчакова и О.Н.Любимцевой**

Метод основан на спектрофотометрическом определении при 280 нм кислоторастворимых продуктов гидролиза гемоглобина, образующихся под действием катепсинов сыворотки крови.

Реакция протекает по уравнению



Экстинкцию кислоторастворимых продуктов гидролиза глобина измеряют при 280 нм на спектрофотометре. В этой области спектра в основном поглощает тирозин и в меньшей степени триптофан и фенилаланин.

Материал: сыворотка крови

Реактивы и оборудование:

Спектрофотометр, центрифуга, автоматические пипетки, штатив с пробирками. 0,1 М раствор (рН 4,0) ацетатного буфера; 4%-ный раствор гемоглобина на ацетатном буфере с рН 4,0; 8%-ный раствор ТХУ.

Ход определения.

В опытную пробирку вносят 1 мл раствора гемоглобина и 0,5 мл сыворотки крови, а в контрольную – те же вещества в том же объеме и 2 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы перемешивают встряхиванием.

Пробирки ставят на 60 минут в водяную баню при 37°C, после этого приливают к опытной пробе 2 мл раствора ТХУ и перемешивают содержимое встряхиванием. Центрифугируют пробы 10 минут при 3000 об/мин, надосадочную жидкость сливают в чистые пробирки.

Измеряют экстинкцию опытной пробы против контрольной на спектрофотометре при 280 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Расчет проводят с использованием калибровочного графика на тирозин или молярного коэффициента экстинкции тирозина:

$$X = \frac{E \cdot 5000}{0,436},$$

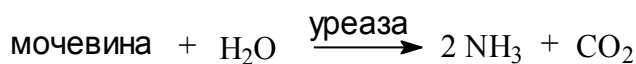
где X – активность катепсинов, ммоль тирозина/(ч·л); E – экстинкция опытной пробы против контрольной; 5000 – коэффициент пересчета на 1 л сыворотки крови; 0,436 – коэффициент экстинкции 1 ммоль тирозина.

Оформление результатов: По калибровочному графику рассчитать активность катепсинов в сыворотке крови; сделать вывод о возможном отклонении от нормы.

Практическое значение работы. Катепсины, гидролизующие белки в кислой среде, специфичны для лизосом тканей, поэтому в научных исследованиях их определяют как индикаторы чистоты лизосомальной фракции. При поражении органов, особенно при некрозах, активность катепсинов в сыворотке крови возрастает. Это характерно для инфаркта миокарда, причем степень повышения ферментативной активности сыворотки крови зависит от глубины и распространенности очага некроза в миокарде.

Обмен аминокислот. Образование и обезвреживание аммиака

Лабораторная работа № 37. **Определение мочевины в сыворотке крови**



Принцип метода. Метод основан на следующей реакции:

Салицилат и гипохлорит реагируют с ионами аммония и образуют комплекс зеленого цвета.

Материал: сыворотка крови

Реактивы и оборудование:

	Фермент уреаза	>5000 ЕД/л
Работающий реагент	Фосфатный буфер	120 ммоль/л, рН 7.0
	Салицилат натрия	62.5 ммоль/л
	Нитропруссид натрия	5.00 ммоль/л
	ЭТДА	1.48 ммоль/л
Реагент 2	Гипохлорит натрия	18 ммоль/л
	Гидроксид натрия	450 ммоль/л

	Стандарт	50мг/дл (8.33 ммоль/л)
	Фотоэлектроколориметр ($\lambda=600$ нм, длина кюветы 1 см)	
	Термостат	

Приготовление растворов

а) *Работающий реагент.* Растворите фосфатный буфер I путем смешивания порошка с соответствующим количеством бидистиллированной воды:

60 мл для набора 5·100 мл

150 мл для набора 5·250 мл

300 мл для набора 5·300 мл

Когда растворится, доведите до нужного объема бидистиллированной водой до:

100 мл для набора 5·100 мл

250 мл для набора 5·250 мл

500 мл для набора 5·300 мл

Добавьте флакон уреазы к раствору приготовленного фосфатного буфера.

Ход определения

	Холостая проба	Стандартная проба	Опытная проба
Стандарт	-	0,01 мл	-
Сыворотка	-	-	0,01 мл
Работающий реагент	1 мл	1 мл	1 мл
Встряхните. Инкубируйте не меньше 3 мин при 37 ⁰ С или 5 мин при 20-25 ⁰ С.			
Реагент 2	0,2 мл	0,2 мл	0,2 мл
Встряхните. Инкубируйте не меньше 3 мин при 37 ⁰ С или 5 мин при 20-25 ⁰ С. Измерьте адсорбцию стандарта ($A_{ст}$) и пробы ($A_{пр}$) относительно холостой пробы.			

Расчет

$$\text{Концентрация} = \frac{A_{пр}}{A_{ст}} \cdot 8,33 (\text{ммоль} / \text{л})$$

$$\text{Концентрация} = \frac{A_{пр}}{A_{ст}} \cdot 50 (\text{мг} / \text{дл})$$

Практическое значение работы. Мочевина является одним из основных конечных продуктов белкового обмена. Синтезируется мочевина из аммиака, который постоянно образуется в организме при окислительном и неокислительном дезаминировании аминокислот, при гидролизе амидов

глутаминовой и аспарагиновой кислот, а также при распаде пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Часть аммиака образуется в кишечнике в результате действия бактерий на пищевые белки (гниение белков в кишечнике) и поступает в кровь воротной вены.

Аммиак - токсичное соединение. Даже небольшое повышение его концентрации оказывает неблагоприятное действие на организм, и, прежде всего, на центральную нервную систему. Несмотря на то, что аммиак постоянно продуцируется в тканях, он содержится в периферической крови лишь в следовых количествах, так как быстро удаляется из кровеносной системы печенью, где входит в состав глутамата, глутамина и мочевины. Биосинтез мочевины является основным механизмом обезвреживания аммиака в организме.

Определение концентрации *мочевины в крови* широко используется в диагностике, применяется для оценки тяжести патологического процесса, для наблюдения за течением заболевания и оценки эффективности проводимого лечения. На уровень мочевины в крови могут влиять не только патологические, но и физиологические факторы (характер питания, физическая нагрузка и т. д.), а также прием лекарственных препаратов. Уровень мочевины может изменяться как в сторону повышения, так и снижения. При физиологических процессах степень отклонения уровня мочевины от нормы, как правило, незначительна, в то время как при патологии наблюдаются значительные сдвиги, причем степень изменения уровня мочевины зависит от тяжести патологического процесса.

Концентрация мочевины в сыворотке крови здоровых взрослых людей составляет 2,5-8,3 ммоль/л (660 мг/л). У женщин, по сравнению с взрослыми мужчинами, концентрация мочевины в сыворотке крови обычно ниже. У пожилых людей (старше 60 лет) наблюдается некоторое увеличение концентрации мочевины в сыворотке крови (примерно на 1 ммоль/л по сравнению с нормой здоровых взрослых людей), что обусловлено снижением у пожилых способности почек концентрировать мочу.

Верхняя граница содержания мочевины в сыворотке крови зависит от приема белков с пищей. При приеме белков свыше 2,5 г/кг живой массы в сутки верхняя граница референтных величин содержания мочевины в сыворотке может быть повышена даже до 10 ммоль/л.

Определение концентрации *мочевины в моче* проводится значительно реже, чем определение уровня мочевины в крови и используется обычно при обнаружении повышенного уровня мочевины в крови и решении вопроса о состоянии выделительной функции почек. При этом определяют суточную экскрецию мочевины с мочой. Повышенное содержание мочевины крови при снижении суточной экскреции с мочой чаще свидетельствует о нарушении азотовыделительной функции почек. Однако не стоит забывать, что повышение уровня мочевины в крови с одновременным снижением ее экскреции встречается и при экстраренально возникающей функциональной почечной недостаточности, развивающейся при уменьшении почечного кровотока, что наблюдается при возникновении гиповолемии или в условиях застоя при

сердечной недостаточности. Напротив, одновременное увеличение уровня мочевины в крови и экскреции ее с мочой свидетельствует о том, что азотовыделительная функция почек не нарушена, одновременное повышение содержания мочевины в крови и моче связано с избыточным образованием мочевины в организме и носит транзиторный характер. На уровень мочевины в моче, также как и в крови, могут влиять не только патологические, но и физиологические факторы (характер питания, физическая нагрузка и т. д.), а также прием лекарственных препаратов.

Экскреция мочевины с мочой (при диете со средним содержанием белка) в норме составляет у взрослых 333,0-587,7 ммоль/сут (20-35 г/сут).

Выделение мочевины из организма свидетельствуют об интенсивности белкового обмена – увеличивается при употреблении пищи, богатой белками, и снижается при безбелковой диете. В норме в сутки у здорового человека выделяется 20-35 г мочевины (333-582 ммоль/сут). В сыворотке содержится 2,49 – 8,33 ммоль/л мочевины.

Оформление работы. По полученным значениям оптической плотности рассчитать содержание аммиака в сыворотке крови и сделать вывод о возможных нарушениях.

Превращение аминокислот. Образование и функции биогенных аминов

Лабораторная работа № 38. **Количественное определение креатинина в сыворотке крови и моче по цветной реакции Яффе (методом Поппера и др.)**

Принцип метода основан на способности креатинина в щелочной среде образовывать с пикриновой кислотой комплекс оранжевого цвета. Интенсивность окраски образовавшегося раствора при этом прямо пропорциональна концентрации креатинина.

Исследуемый материал: сыворотка крови или моча, разбавленная дистиллированной мочой в соотношении 1 : 100. Исследование проводят в тот же день после отбора пробы.

Реактивы и оборудование: ФЭК, набор химических реактивов фирмы “Лахема” (Чехия). Наборы хранят в холодильнике.

Состав набора: 1. ТХУ, 1,22 моль/л. 2. Пикриновая кислота, 0,04 моль/л. 3. Натрия гидрооксид, раствор 0,75 моль/л. 4. Креатинин, эталонный раствор 442,5 мкмоль/л. Готовят разведением содержимого флакона в 8 мл дистиллированной воды. Хранят в холодильнике. 5. Альбумин, эталонный раствор 20 г/л. Хранят в холодильнике. 6. Креатинин, калибровочный раствор 177 мкмоль/л. Готовят смешиванием 4 мл эталонного раствора креатинина с 6 мл раствора альбумина.

Ход работы.

Последовательность определения креатинина в сыворотке крови и моче представлена в таблице № 1 и № 2.

Табл. № 1. Последовательность определения креатинина в сыворотке крови

Компоненты	Раствор, мл		
	опытный	сравнения	эталонный
Сыворотка крови	0,5	—	—
Дистиллированная вода	1	1,5	1
ТХУ	0,5	0,5	0,5
Калибровочный раствор	—	—	0,5
Перемешивают, оставляют на 5 минут и центрифугируют 3000 об/мин в течение 10 минут. Отбирают супернатант			
Супернатант	1	1	1
Пикриновая кислота	0,5	0,5	0,5
Раствор NaOH	0,5	0,5	0,5

Табл. № 2. Последовательность определения креатинина в моче

Компоненты	Раствор, мл	
	опытный	сравнения
Моча, разбавленная 1 : 100	0,50	—
Дистиллированная вода	0,25	0,75
ТХУ	0,25	0,25
Пикриновая кислота	0,50	0,50
Раствор NaOH	0,50	0,50

Пробы перемешивают и через 20 минут измеряют оптическую плотность опытной и эталонной проб против раствора сравнения на ФЭКе при длине волны 505 нм в кюветах со слоем жидкости 10 мм.

Содержание креатинина в сыворотке крови рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A_o}{A_s} \cdot 177$$

где X – содержание креатинина в сыворотке крови, мкмоль/л; A_o и A_s – оптическая плотность опытной и эталонной проб; 177 – пересчетный коэффициент.

Содержание креатинина в моче рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A_o}{A_s} \cdot 177 \cdot 50$$

где X – содержание креатинина в моче, моль/л; 50 – коэффициент разбавления.

Примечания: 1. Если содержание креатинина в пробе превышает 442 мкмоль/л, определение повторяют с пробой, разведенной дистиллированной водой.

2. Метод чувствителен к pH, поэтому необходимо строго соблюдать последовательность определения, которая гарантирует оптимальную конечную величину pH фотометрируемого раствора ($12,4 \pm 0,1$).

Практическое значение работы.

Креатинин, наряду с мочевиной и солями аммония является нормальным продуктом азотистого обмена и на его долю приходится около 2,5 – 7 % всего азота мочи. В норме содержание креатинина в сыворотке крови (натошак) составляет 61-115 мкмоль/л у мужчин и 53-97 мкмоль/л – у женщин. В моче содержание креатинина составляет 4,4 – 17,7 ммоль/сут. Повышенное содержание креатинина в крови наблюдается при остром или хроническом нарушении функции почек любой этиологии, гипертиреозе, приеме мясной пищи. Пониженное содержание креатинина в крови наблюдается при снижении мышечной массы, беременности (особенно в первый и второй триместр).

Лабораторная работа № 39. Определение гистамина в крови с диазотированным п-нитроанилином

Реактивы и оборудование. Диазотированный п-нитроанилин (готовят перед употреблением из 0,1% раствора п-нитроанилина в 0,1 М соляной кислоте, добавляют к 10 мл охлажденного на льду раствора п-нитроанилина 1 мл 4% раствора нитрита натрия); гистамин, стандартный раствор концентрации 200 мкмоль/л; карбонат натрия, 20% раствор; гидроксид натрия, 5 М раствор; ТХУ, 10% раствор; универсальная индикаторная бумага. Штатив с пробирками; воронка с фильтром; стеклянные палочки; водяная баня; пипетки вместимостью 1 и 5 мл; ФЭК.

Материал: Цельная кровь крысы или кролика, осажденная 10% раствором ТХУ в отношении 1 : 9 для экстракции гистамина (выдерживается в холодильнике в течение суток).

Метод основан на взаимодействии между гистамином и диазотированным п-нитроанилином с образованием соединения оранжево-красного цвета.

Ход определения. Трихлоруксусный экстракт крови фильтруют через бумажный фильтр. В одну пробирку отмеривают 2 мл фильтрата (опыт), в другую – 0,2 мл стандартного раствора гистамина и 1,8 мл дистиллированной воды (стандарт). В обе пробы прибавляют по 3 мл дистиллированной воды в 1 мл раствора нитрита натрия. Пробирки тщательно встряхивают и ставят на 2 мин в кипящую водяную баню.

Затем пробирки охлаждают под струей водопроводной воды и к охлажденным пробам добавляют по 1 мл диазотированного п-нитроанилина. Тщательно перемешивают пробы и доводят их рН до 10,0 по универсальной индикаторной бумаге, прибавляя сначала 1,5 мл, а затем 0,5 мл раствора карбоната натрия. Содержимое пробирок перемешивают, охлаждают под струей холодной воды и прибавляют 2-3 капли раствора гидроксида натрия до развития окрашивания.

Экстинкцию опытной и стандартной проб измеряют на ФЭКе при 520-540 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см против контроля на реактивы (10 мл дистиллированной воды, по 2 мл растворов нитрита натрия и диазотированного п-нитроанилина, 4 мл раствора карбоната натрия перемешивают и приливают 0,6 мл раствора гидроксида натрия).

Расчет проводят по формуле

$$X = \frac{E_{\text{оп}} \cdot 200}{E_{\text{ст}}},$$

где X – концентрация гистамина в цельной крови, мкмоль/л;

$E_{\text{оп}}$ – экстинкция опытного раствора;

$E_{\text{ст}}$ – экстинкция стандартного раствора;

200 – концентрация стандартного раствора гистамина, мкмоль/л.

Оформление работы. Рассчитать содержание гистамина в крови и сделать вывод о возможных изменениях его уровня.

Практическое значение работы. Гистамин относится к биогенным аминам. Он играет роль тканевого регулятора и медиатора в нервной системе. Гистамин усиливает проницаемость стенок кровеносных сосудов, стимулирует функцию желез желудка (выработку соляной кислоты), сокращение гладких мышц бронхов и т.д. Избыточное содержание гистамина в организме ведет к вегетативным нарушениям и аллергическим реакциям. Определение гистамина в практике используется для исследования его уровня в крови и тканях животных при действии на них аллергических веществ. Содержание гистамина в крови имеет видовые колебания. В крови лабораторных животных (крысы, кролики) его концентрация составляет 90-220 мкмоль/л, тогда как у здорового человека его содержание в крови составляет 0,02-0,04 мкмоль/л.

Раздел VIII. Обмен нуклеотидов и нуклеиновых кислот

Задачи раздела:

- 1) изучение метаболизма нуклеотидов и нуклеиновых кислот;
- 2) знакомство с основными методами количественного определения ферментов и метаболитов нуклеотидного обмена в биологических жидкостях для использования их на практике;
- 3) научиться использовать знания об изменениях нуклеотидного обмена в норме и при болезнях для объяснения нормальных функций организма и их нарушений при патологии.

Лабораторная работа № 40. Определение содержания мочевой кислоты в сыворотке крови по методу Мюллера и Зейферта

Метод основан на способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорновольфрамовый реактив (реактив Фолина) с образованием соединений, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации данной кислоты.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы и оборудование: реактив Фолина, 20 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты, насыщенный раствор карбоната натрия, стандартный раствор (0,02 мг/мл) мочевой кислоты, свежеприготовленный; штатив с пробирками, пипетки, центрифуга, ФЭК.

Ход работы.

В центрифужную пробирку вносят по 0,5 мл сыворотки крови, дистиллированной воды и трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирки перемешивают и через 5 минут центрифугируют в течение 10 минут при 3000 об/мин.

Берут две пробирки: опытную и стандартную. Добавляют в них реактивы в соответствии с таблицей.

Реактивы	Раствор, мл	
	опыт	стандарт
Дистиллированная вода	–	0,5
Центрифугат, соответствующий 0,5 мл сыворотки	1,5	–
Стандартный раствор	–	0,5
ТХУ	–	0,5
Насыщенный р-р карбоната Na	0,7	0,7
Реактив Фолина (осторожно!)	1 капля	1 капля

Пробирки закрывают пробками или фольгой и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. По истечении времени опытную и стандартную пробы фотометрируют против воды при длине волны 510–560 нм в кюветах с толщиной слоя жидкости 0,5 см.

Содержание мочевого кислоты в крови рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{E_{on} \cdot 0,01 \cdot 200}{E_{ст} \cdot 168},$$

где X – содержание мочевого кислоты в сыворотке крови, ммоль/л; $E_{оп}$ – экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ – экстинкция стандартной пробы; 0,01 – масса мочевого кислоты в пробе стандартного раствора, взятого для реакции, мг; 200 – коэффициент пересчета на 1 л сыворотки крови; 168 – молекулярная масса мочевого кислоты.

Оформление работы. Рассчитать содержание мочевого кислоты в сыворотке крови и сделать вывод о возможных изменениях пуринового обмена.

Практическое значение работы.

В норме содержание мочевого кислоты в сыворотке крови составляет у мужчин – 3-9 мг/дл (0,18-0,54 ммоль/л) и у женщин – 2,5-7,5 мг/дл (0,15-0,45 ммоль/л). Повышение содержания мочевого кислоты в крови наблюдается при многих патологических состояниях, связанных с усиленным распадом нуклеопротеинов (лейкозах, полицитемии, миеломной болезни, диссеминированных опухолях) или с поражением почек (почечная недостаточность, токсикозы беременных, хроническая свинцовая нефропатия, поликистоз почек). Резко увеличивается концентрация мочевого кислоты при подагре, это сопровождается отложением солей мочевого кислоты в суставах и различных тканях организма. Понижение содержания мочевого кислоты в сыворотке крови отмечается при диете, бедной пуринами, ксантинурии, после

приема аллопуринола, салицилатов (в больших дозах), клофибрата, азатиоприна.

Лабораторная работа № 41. Определение активности кислой дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) в сыворотке крови по А.А.Покровскому, А.И.Арчакову и О.Н.Любимцевой

Метод основан на спектрофотометрическом определении при 260 нм кислоторастворимых продуктов гидролиза ДНК, образующихся под действием ДНКазы, содержащейся в исследуемом материале:

$$\text{ДНК} \frac{\text{ДНКазы}}{n\text{H}_2\text{O}} \text{фрагменты} \cdot \text{ДНК}$$

Материал: сыворотка крови.

Реактивы и оборудование: холодильник, термостат, центрифуга, спектрофотометр, штатив с пробирками, пипетки, 1 г/л раствор ДНК в 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,0), 0,5 М раствор хлорной кислоты.

Ход работы.

В опытную и контрольную пробирки отмеривают по 1,2 мл раствора ДНК. Затем в опытную пробу добавляют 0,2 мл сыворотки крови и перемешивают содержимое встряхиванием.

Обе пробирки помещают на 30 минут в термостат при 37°C, после чего в контрольную пробирку приливают 1,6 мл хлорной кислоты и 0,2 мл сыворотки крови, а в опытную – такой же объем хлорной кислоты. Содержимое проб перемешивают.

Ставят пробирки на 30 минут в холодильник при 4°C, а затем обе пробы центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин для осаждения негидролизованной ДНК. Надосадочную жидкость сливают в чистые пробирки и измеряют экстинкцию опытной пробы против контрольной на спектрофотометре при 260 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Расчет проводят по формуле:

$$X = E_{260} \cdot 2 \cdot 500,$$

где X - активность ДНКазы в $E_{260}/(\text{г} \cdot \text{л})$; 2 – коэффициент пересчета на 1 час; 500 – коэффициент пересчета на 1 л сыворотки крови.

Оформление работы. Рассчитать активность фермента в исследуемом материале, сделать вывод о присутствии кислой ДНКазы в сыворотке крови и практическом значении работы.

Практическое значение работы. Кислая ДНКазы локализована в лизосомах клеток различных тканей, поэтому в научных исследованиях определение этого фермента используют для контроля чистоты выделяемой фракции лизосом. Кроме того, кислая ДНКазы является индикатором повреждения или повышенной проницаемости мембран лизосом, что имеет практическое значение при оценке действия лизосомотропных препаратов и патологического процесса.

Биосинтез белка. Регуляция экспрессии генов. Генные мутации

Лабораторная работа № 42. Основы метода полимеразной цепной реакции

В основе метода генной диагностики (ДНК-диагностики) лежит полимеразная цепная реакция (ПЦР). Метод ПЦР позволяет избирательно синтезировать *in vitro* небольшие участки ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов, используя в качестве матрицы любые образцы ДНК.

Используются:

- 1) термофильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза), выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*, живущих в горячих источниках, и потому устойчивая к действию высоких температур;
- 2) специальный прибор – термальный циклизатор (амплификатор ДНК), позволяющий задавать температурный режим (90°C, 30-50°C, 60-70°C); временные параметры; количество циклов.

Процесс полностью автоматизирован. Выбор оптимального режима работы определяется длиной и специфичностью амплифицируемого участка.

Ход работы. Для подготовки реакционной смеси необходимы:

- 1) исследуемая ДНК;
- 2) субстраты: дАТФ; дГТФ; дЦТФ; дТТФ;
- 3) два праймера;
- 4) термофильная ДНК—полимераза (Taq-полимераза);
- 5) буфер, содержащий Mg^{2+} .

Из исследуемого материала (кровь, моча, биоптат, околоплодные воды и др.) выделяют ДНК.

Искусственно синтезированные праймеры представляют собой олигодезоксирибонуклеотиды (20-30 нуклеотидных остатков). Для синтеза праймеров необходимо знать нуклеотидную последовательность амплифицируемой области ДНК (первичную структуру). Праймеры должны быть комплементарны 3'-концам амплифицируемого участка.

Этапы циклизации

I этап – **денатурация**. Реакционную смесь нагревают до температуры 90°C в течение нескольких минут. Нагревание приводит к разрыву слабых связей между основаниями молекулы ДНК и образованию из исследуемой двухцепочечной матричной ДНК одноцепочечных молекул.

II этап – **гибридизация ДНК с праймерами**. Температуру снижают до 30-50°C. При этой температуре возможна специфическая гибридизация цепей ДНК с праймерами.

III этап – **элонгация (полимеризация)**. Это синтез последовательностей, комплементарных матричной ДНК. При температуре 60-70°C, оптимальной для работы Taq-полимеразы, начинается полимеразная цепная реакция. Перемещаясь по матрице в направлении 5'-конца, Taq-полимераза удлиняет

праймер, присоединяя к нему один за другим нуклеотидные остатки, комплементарные нуклеотидам матрицы.

Дальнейший процесс ПЦР заключается в чередовании циклов. Продолжительность каждого цикла зависит от длины и первичной структуры амплифицируемого участка, но, как правило, не превышает 3-5 мин.

За каждый цикл происходит двукратное увеличение числа синтезированных копий, т.е. содержание продуктов амплификации в реакционной смеси нарастает в геометрической прогрессии.

Этот трехступенчатый цикл может быть повторен многократно, пока не образуется достаточно материала, необходимого для дальнейших исследований.

Полученный материал подвергают фракционированию методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. Разработаны специальные полиакриламидные гели, с помощью которых удастся разделить фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающихся только на один нуклеотид.

По сравнению с традиционными методами диагностики данный метод позволяет проводить быструю, чувствительную и специфическую идентификацию генетического материала.

В медицинской диагностике при помощи этого метода можно решать многие вопросы:

- Проводить пренатальную диагностику наследственных болезней.
- Выявлять гетерозиготных носителей дефектных генов.
- Определять точную локализацию генов в ДНК человека.

Раздел IX. Биохимия гормонов

Целью изучения данного раздела является знакомство с химическим строением гормонов, специфическими реакциями на некоторые из них, что необходимо для понимания роли гормонов в регуляции обмена веществ и последующего изучения причин эндокринных заболеваний и их диагностики.

В медико-биологической практике применяют методы качественного и количественного определения гормонов, отклонения в содержании гормонов используют для диагностики заболеваний.

В то же время отклонения в содержании гормонов регистрируют по нарушению регулируемых ими звеньев в обмене веществ.

Общая характеристика гормонов, их структура и функции

Лабораторная работа № 43. Качественные реакции на гормоны

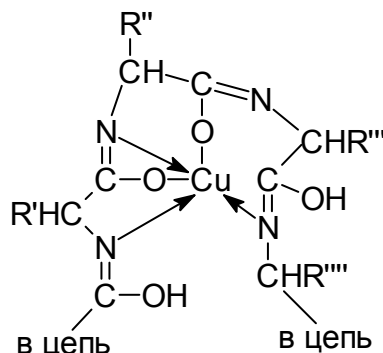
Качественные реакции позволяют определить отдельные физико-химические свойства гормонов, а также выявить ряд функциональных групп и структурных компонентов, играющих важную роль для проявления их биологического действия при осуществлении биохимических процессов.

Отдельные качественные реакции положены в основу количественного определения гормонов.

Материал исследования: 0,1% раствор адреналина, инсулин.

Реакции на гормоны белково-пептидной природы (на примере инсулина)

Опыт 1. Биуретовая реакция



Качественное определение инсулина основано на способности енолизированных в щелочной среде пептидных связей белков и полипептидов образовывать с ионами меди окрашенное комплексное соединение.

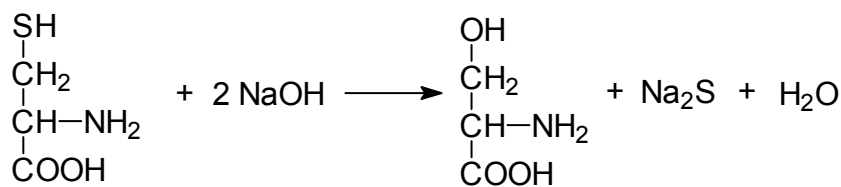
Реактивы и оборудование: свежеприготовленный биуретовый реактив.

Ход работы. В пробирку к 3 каплям инсулина добавляют 6 капель биуретового реактива.

Опыт 2. Реакция Фоля.

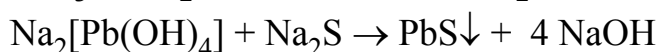
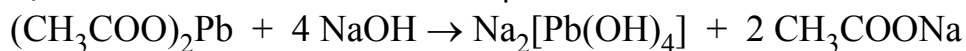
Инсулин – это низкомолекулярный белок, в состав которого входят две полипептидные цепи, соединенные между собой двумя цистинами, поэтому инсулин проявляет качественные реакции на серосодержащие аминокислоты.

Принцип метода, положенный в основу реакции Фоля, основан на способности серосодержащих аминокислот в щелочной среде при нагревании освобождать сульфид-ионы, которые в присутствии плумбита натрия дают осадок сульфида свинца черного цвета.



Цистеин

Серин



Реактивы и оборудование: 30% раствора гидроксида натрия, 1% раствор ацетата свинца, кипящая водяная баня.

Ход работы. В пробирку к 5 каплям инсулина добавляют 5 капель раствора гидроксида натрия и кипятят в течение 3-х минут. Затем пробирку охлаждают и добавляют 3 капли раствора ацетата свинца.

Оформление опытов 1 и 2. Наблюдения по изменению цвета растворов заносят в тетрадь, делают вывод о химической природе инсулина.

1) Реакции на гормоны, производные аминокислот (на примере адреналина).

Адреналин и норадреналин образуются из аминокислоты тирозина и являются производными пирокатехина. Присутствие в их структуре пирокатехинового кольца определяет химические свойства этих гормонов. Они легко окисляются в нейтральных растворах с образованием адrenoхрома, который при последующей полимеризации образует меланины, а в щелочной среде – флуоресцирующее соединение – адренолютин.

Опыт 3. Реакция с хлорным железом.

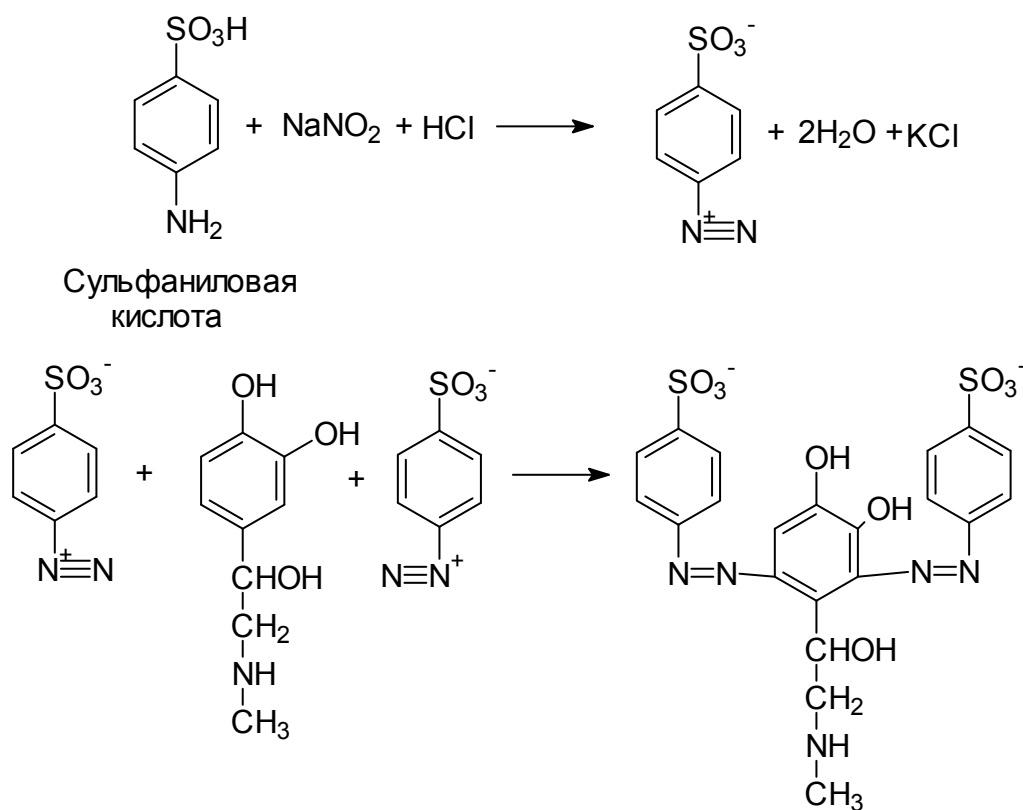
При добавлении к раствору адреналина хлорида железа (III) образуется фенолят железа изумрудно-зеленого цвета.

Реактивы и оборудование: 3% раствор хлорида железа (III), 10% раствор гидроксида аммония.

Ход работы. В пробирку к 3 каплям раствора адреналина добавляют 1 каплю раствора хлорида железа (III). Наблюдают появление окраски раствора. При добавлении 1 капли раствора гидроксида аммония окраска переходит в вишнево-красную, а затем в коричневую.

Опыт 4. Диазореакция.

При взаимодействии сульфаниловой кислоты в кислой среде с нитритом натрия происходит реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоновая кислота. При реакции последней с адреналином образуется соединение вишнево-красного цвета:



Реактивы и оборудование: 1% раствор сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты, 0,5% раствор нитрита натрия, 10% раствор карбоната натрия.

Материал: кровь кролика.

Реактивы и оборудование: инсулин во флаконах для инъекций, 40 ЕД/мл; адреналин, 0,1% раствор для инъекций; цитрат натрия, 10% раствор; хлорид натрия, 9 г/л раствор; этанол 70%; Шприцы; инъекционные иглы; ножницы; вата; микропипетки;

Ход работы. Для взятия крови берут двух кроликов, голодавших 12 ч. Их взвешивают, выстригают шерсть на ухе, находят краевую вену, прокалывают ее инъекционной иглой и собирают примерно 0,5 мл крови. После удаления инъекционной иглы ранку на ухе кролика зажимают ватным тампоном, смоченным этанолом, в течение полминуты.

Одному кролику подкожно вводят раствор инсулина, разведенный хлоридом натрия, из расчета 1,5 ЕД на 1 кг массы тела, а другому – раствор адреналина из расчета 0,35 мл на 1 кг массы тела. Через 30 минут у обоих кроликов отбирают кровь, как описано выше.

При введении инсулина необходимо помнить об опасности наступления гипогликемии. Резкое снижение уровня глюкозы в крови может вызвать у животного судороги и смерть. При вялости животного, ознобе и начальных признаках судорог ему необходимо срочно ввести (внутривенно или подкожно) 10 мл 40% стерильного раствора глюкозы и 1 мл стерильного раствора адреналина.

Микропипеткой отбирают по 0,1 мл крови, взятой перед опытом и через 30 мин после введения инсулина и адреналина. Определяют содержание глюкозы в крови по методике, описанной в работе № 24.

По окончании опыта кролику для предупреждения инсулинового шока подкожно вводят 10 мл 40% стерильного раствора глюкозы.

Оформление работы. Полученные результаты занести в таблицу. В выводах отметить разницу в действии инсулина и адреналина на уровень глюкозы в крови животных.

Содержание глюкозы в крови до опыта	Содержание глюкозы в крови после введения гормонов	
	инсулина	адреналина

Практическое значение работы. Инсулин и адреналин регулируют содержание глюкозы в крови, что позволяет по изменению ее концентрации судить об эффекте данных гормональных препаратов. Гипогликемическое действие инсулина используют для лечения больных сахарным диабетом. а адреналин применяют при гипогликемических состояниях, являющихся следствием гликогенозов, с целью дифференциальной диагностики.

Нарушение обмена веществ при сахарном диабете. Диагностика сахарного диабета

При недостатке выработки инсулина развивается сахарный диабет, важнейшими биохимическими показателями которого являются:

- увеличение сахара в крови (гипергликемия),
- выделение сахара с мочой (глюкозурия),
- накопление кетоновых тел в крови (ацетонемия) и выделение их с мочой (ацетонурия), что связано с неполным сгоранием жирных кислот.

Определение концентрации сахара в крови и моче, а также кетоновых тел в моче позволяет диагностировать сахарный диабет и осуществлять контроль за эффективностью проводимого лечения.

Лабораторная работа № 45. Определение содержания гликированного гемоглобина в крови фотоколориметрическим методом

Метод основан на способности 5-гидроксиметилфурфурола, образующегося из углеводного компонента гликированного гемоглобина при его кислотном гидролизе, образовывать с тиобарбитуровой кислотой окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию гликированного гемоглобина в эритроцитах.

Материал: К крови, забранной из вены, добавляют гепарин из расчета 5 ед/мл для предотвращения свертывания. Эритроциты отделяют от плазмы центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин и трехкратно отмывают физиологическим раствором. Затем к суспензии эритроцитов добавляют дистиллированную воду и 1-2 капли хлороформа для гемолиза.

Реактивы и оборудование: Центрифуга лабораторная; спектрофотометр; штатив с пробирками с плотно притертыми пробками; термостат. ТХУ, 40% раствор; щавелевая кислота, 1 М раствор; тиобарбитуровая кислота, 0,05 М раствор; гидроксид аммония, 0,04% раствор; хлорид натрия, 0,9% раствор.

Ход работы: 1) Определение концентрации гемоглобина в гемолизате.

В пробирку вносят 8 мл раствора аммиака и добавляют 0,05 мл гемолизата (микропипеткой, многократно промывая ее раствором аммиака). Встряхивают 2 мин, после чего определяют экстинкцию на ФЭКе (длина волны 540 нм, зеленый светофильтр) против раствора аммиака. Содержание гемоглобина в гемолизате (в г/л) определяют по калибровочному графику.

2) Определение процентного содержания гликированного гемоглобина.

В пробирку вносят объем гемолизата, содержащего 10 мг гемоглобина, доводят до 1 мл 0,9% раствором хлорида натрия, добавляют 1 мл 1 М щавелевой кислоты, плотно закрывают крышкой и инкубируют в термостате при 100°C в течение 5 часов.

Пробирку охлаждают, вносят 1 мл 40% раствора ТХУ, тщательно перемешивают и центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин.

В чистую пробирку отбирают 2 мл надосадочной жидкости, перемешивают и инкубируют 40 мин на водяной бане при 40°C, после чего фотометрируют при длине волны 443 нм против дистиллированной воды.

Содержание гликированного гемоглобина (в % от общего) определяют по калибровочному графику.

Практическое значение работы. Содержание гликированного гемоглобина в норме составляет от 4 до 6 % от общего. В отличие от определения глюкозы в крови гликированный гемоглобин является интегральным тестом, отражающим уровень гликемии за предшествующие 2-3 месяца. В настоящее время тест применяют для контроля за нарушениями режима за предшествующие 2-3 месяца, а также с целью ранней диагностики и оценки компенсации сахарного диабета.

Лабораторная работа № 46. Качественное определение кетоновых тел в моче

Материал исследования: моча, содержащая ацетон и ацетоуксусную кислоту, нормальная моча.

Опыт 1. Нитропруссидная проба на ацетон и ацетоуксусную кислоту.

а) Проба Легала.

Принцип реакции основан на способности ацетона и ацетоуксусной кислоты в щелочной среде образовывать комплексы с нитропруссидом натрия оранжево-красного цвета. Подкисление раствора вызывает образование соединений вишневого цвета.

Креатинин мочи также дает оранжевое окрашивание с нитропруссидом натрия, но при добавлении уксусной кислоты цвет раствора не меняется.

Реактивы и оборудование: 0,5% раствор нитропруссиды натрия, 10% раствор гидроксида натрия, ледяная уксусная кислота, концентрированный раствор аммиака.

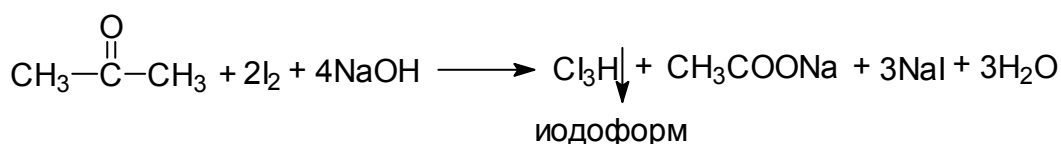
Ход работы.

Взять 2 пробирки и внести по 2 мл в одну пробирку мочу из образца № 1, а в другую – из образца № 2. Добавить 1 мл свежеприготовленного раствора нитропруссиды натрия и 1 мл раствора щелочи. Отметить изменение цвета раствора. Затем добавить 2 мл ледяной уксусной кислоты. Наблюдения записать в лабораторный журнал.

б) Проба Ланге.

Ход работы. Взять 2 пробирки и внести по 2 мл в одну пробирку мочу из образца № 1, а в другую – из образца № 2. Добавить по 5 капель уксусной кислоты и нитропруссиды натрия. Встряхнуть и осторожно налить равный объем концентрированного раствора аммиака. Наблюдают изменение окраски на границе раздела фаз.

Опыт 2. Иодоформная проба на ацетон (проба Либена).



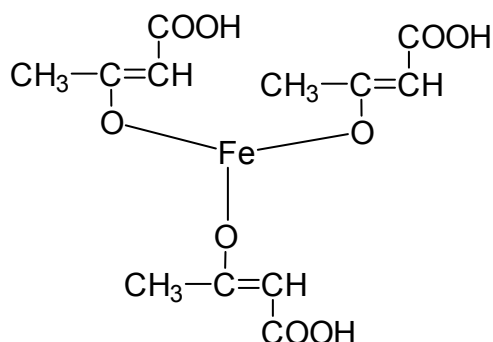
Ацетон способен в щелочной среде взаимодействовать с иодом с образованием иодоформа (бледно-желтого осадка с характерным запахом):

Реактивы и оборудование: 10% раствор гидроксида натрия, ледяная уксусная кислота, реактив Люголя.

Ход работы. Взять 2 пробирки и внести по 2 мл в одну пробирку мочу из образца № 1, а в другую – из образца № 2, добавить в каждую по 1 мл реактива Люголя и щелочи.

Опыт 3. Проба на ацетоуксусную кислоту с хлорным железом (проба Гекхардта).

Енольная форма ацетоуксусной кислоты способна образовывать комплексные соединения с ионами Fe^{3+} красного или винно-красного цвета.



Реактивы и оборудование: 10% раствор хлорида железа (III).

Ход работы. Взять 2 пробирки и внести по 2 мл в одну пробирку мочу из образца № 1, а в другую – из образца № 2, добавить в каждую по 1 мл раствора хлорида железа (III).

Оформление работы. Результаты опытов вносят в таблицу и делают выводы о наличии кетоновых тел в образцах мочи.

Качественные реакции	Образец № 1	Образец № 2
Проба Легала		
Проба Ланге		
Проба Либена		
Проба Гекхардта		

Раздел X. Биохимия органов и тканей

Задачи раздела:

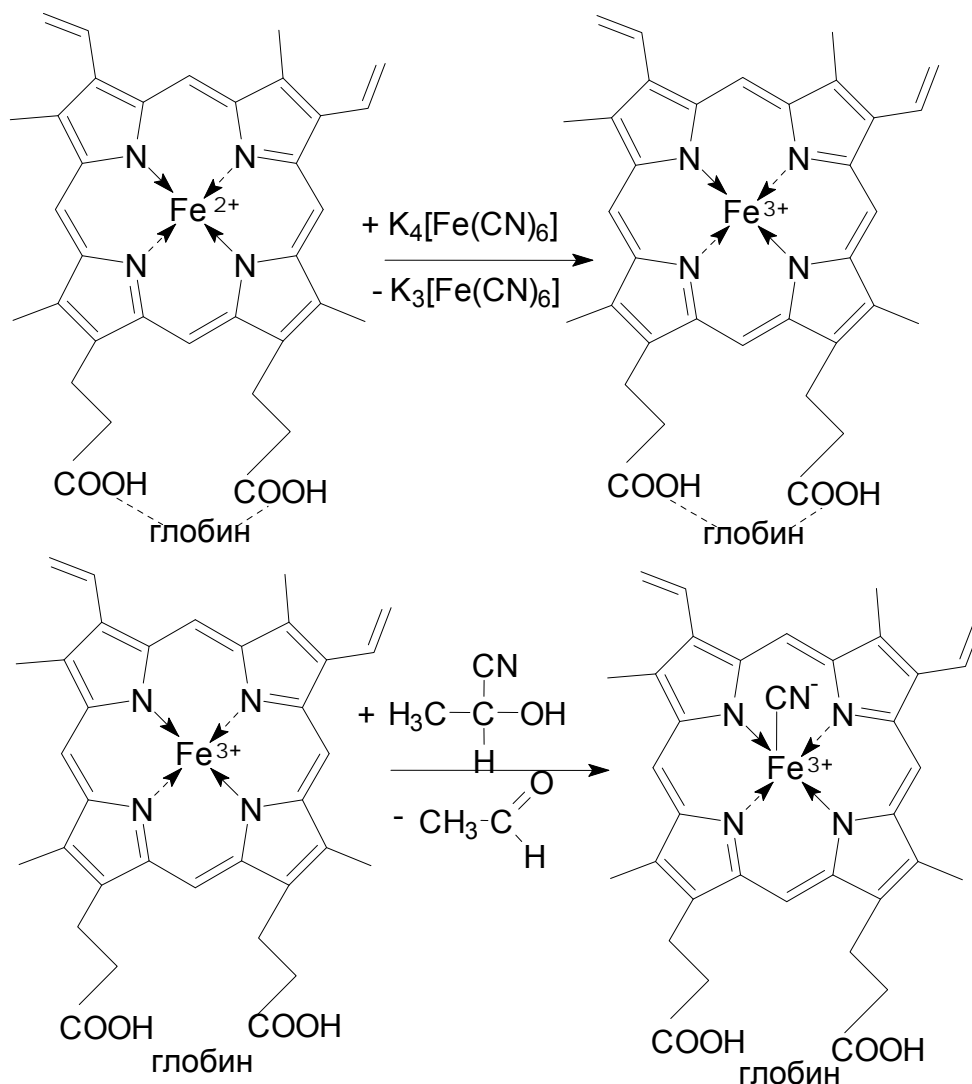
- 1) изучение особенностей метаболизма различных органов и тканей;
- 2) овладение методами анализа органоспецифических ферментов и метаболитов в биологических жидкостях для использования их на практике;
- 3) научиться использовать знания о структурных особенностях различных органов и тканей и изменения их состава и состава биологических жидкостей для объяснения нормальных функций органов и тканей и их нарушений при патологии.

Биохимия крови

Лабораторная работа № 47. Определение гемоглобина в крови

Принцип метода: основан на способности гемоглобина окисляться гексацианоферратом (II) калия до метгемоглобина, который образует с ацетоциангидрином окрашенный цианметгемоглобин. Концентрацию цианметгемоглобина определяют колориметрически.

У здоровых людей концентрация гемоглобина в крови составляет для мужчин 8,7 – 11, 2 ммоль/л или 14 – 18 г/100мл, для женщин – 7,5 – 9,9 ммоль/л или 12 – 16 г/100мл.



Исследуемый материал: цельная кровь.

Реактивы и оборудование.

1. Концентрированный реактив: раствор ацетоцингидрина ($0,77 \cdot 10^{-3}$ моль/л или $65,5 \cdot 10^{-3}$ г/ 100мл); гексацианоферрат (II) калия ($6,07 \cdot 10^{-3}$ моль/л); гидрокарбонат натрия (0,12 моль/л или 10 г/100 мл).
2. Калибратор (раствор цианметгемоглобина 478 мг/л – соответствует концентрации гемоглобина в крови 12, 0 г/100мл при разведении в 251 раз).
3. Спектрофотометр ($\lambda=540$ нм).

Ход работы.

1. Получение рабочего раствора: к 1 мл концентрированного раствора добавить 9 мл дистиллированной воды и перемешать.
2. Приготовить калибровочный раствор цианметгемоглобина. Для этого к 0,05 мл калибратора добавить 12,5 мл дистиллированной воды.
3. Приготовить пробы согласно таблицы:

Добавляемые растворы и реактивы	Пробирка № 1 (опытная проба)	Пробирка № 2 (калибровочная проба)
Рабочий раствор	5 мл	5 мл
Калибратор (разбавленный в 251 раз)	-	0,02 мл
Исследуемая кровь	0,02 мл	-

4. Инкубировать 10 минут при температуре 20 – 25⁰С
5. Измерить оптическую плотность (А) полученных растворов против дистиллированной воды.

Расчет содержания гемоглобина.

1. При измерении на спектрофотометре типа СФ-46 на длине волны 540 нм концентрация может быть вычислена по формуле:

$$\text{Концентрация гемоглобина (г/100мл)} = A \cdot K_1 \quad (K_1=36,77) \quad (1)$$

$$\text{Концентрация гемоглобина (моль/л)} = A \cdot K_2 \quad (K_2=22,82), \quad (2)$$

где А – измеренная оптическая плотность против дистиллированной воды.

2. Расчет содержания гемоглобина по калибратору.

Содержание гемоглобина в анализируемой пробе может быть вычислено по формуле:

$$Hb(\text{г/100мл}) = \frac{A}{A_{\text{кал.}}} \cdot 12,0; \quad (3)$$

где А – измеренная оптическая плотность исследуемого раствора, А_{кал.} - измеренная оптическая плотность раствора калибратора; 12,0 – концентрация Нб в г/100мл.

Практическое значение работы. У здоровых людей концентрация гемоглобина в крови составляет для мужчин 8,7 – 11, 2 ммоль/л или 14 – 18 г/100мл, для женщин - 7,5 – 9,9 ммоль/л или 12 – 16 г/100мл.

Оформление работы.

Сделать необходимые расчеты и занести полученные данные в таблицу:

А	А _{кал}	Нб ₁ (г/100мл) (расчет по формуле 1)	Нб ₁ (ммоль/л) (расчет по формуле 2)	Нб ₂ (г/100мл) (расчет по формуле 3)

Осторожно!

Ацетоциангидрин – токсичный компонент. При работе с ним следует соблюдать осторожность и не допускать попадания на кожные покровы и слизистые оболочки. При попадании реактива на кожу следует промыть пораженные участки большим количеством воды.

Лабораторная работа № 48. Определение “средних” молекул (СМ) в сыворотке крови по методу Н.И.Габриэлян и В.И.Липатовой

Принцип метода заключается в измерении при 254 нм оптической плотности сыворотки крови, освобожденной от грубодисперсных белков.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы и оборудование.

1. 10 %-ный раствор ТХУ.
2. Спектрофотометр ($\lambda=254$ нм).
3. Центрифуга.

Ход работы.

К 1 мл сыворотки крови добавляют по каплям 0,5 мл 10 % раствора ТХУ, перемешивают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 минут. Надосадочную жидкость разводят в 10 раз - для этого к 0,5 мл надосадочной жидкости добавляют 4,5 мл дистиллированной воды. Измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 254 нм.

Практическое значение работы. Уровень СМ выражается в единицах, количественно равных показателям экстинкции. В норме поглощение, обусловленное СМ, составляет $0,24 \pm 0,02$ ед. Метод, благодаря простоте и дешевизне, широко используется в клиниках для оценки тяжести состояния больных, имеющих синдром эндогенной интоксикации.

Лабораторная работа № 49. Определение веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ) по М.Я.Малаховой

Принцип метода состоит в осаждении крупномолекулярных частиц плазмы крови или эритроцитов 15 %-ным раствором ТХУ и регистрации спектральной характеристики водного раствора супернатанта в зоне длин волн от 238 до 310 нм.

Исследуемый материал: плазма крови, эритроциты или моча.

Реактивы и оборудование.

1. 15 %-ный раствор ТХУ.
2. Спектрофотометр ($\lambda=238-310$ нм).
3. Центрифуга.

Ход работы.

Для определения находящихся в и на эритроцитах ВНиСММ эритроцитарную массу доводили до исходного объема изотоническим раствором хлорида натрия, перемешивали, отбирали 1 мл и проводили осаждение 15 %-ным раствором ТХУ, как и при исследовании плазмы крови. Через 5 минут центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут.

Супернатант разводят дистиллированной водой 1 : 9 и фотометрировали против контроля.

Схема проведения опыта

Исследуемый р-р или реактив	Номер пробирки			
	Контроль, мл	Плазма, мл	Эритроциты, мл	Моча, мл
Плазма крови	—	1,0	—	
Эритроциты	—	—	0,5	
Моча	—	—	—	0,1
8 г/л р-р NaCl	—	—	0,5	0,9
H ₂ O	1,0	—	—	—
Энергично встряхнуть пробы				
Р-р ТХУ	0,5	0,5	0,5	0,5
Тщательно перемешать стеклянными палочками. Оставить стоять пробы на столе 5-7 минут. Центрифугировать 30 минут при 3000 об/мин.				
Супернатант	0,5	0,5	0,5	0,5
Дист. H ₂ O	4,5	4,5	4,5	4,5

Расчет конечного результата производили путем интегрального измерения площади фигуры, образованной осью абсцисс и полученными значениями экстинкций для каждого типа определения: плазмы, эритроцитов или мочи.

$$ВНиСММ_{пл} = (E_{238} + \dots + E_{310}) \text{ усл. ед.}$$

$$ВНиСММ_{эр} = (E_{238} + \dots + E_{310}) \text{ усл. ед.}$$

$$ВНиСММ_{мочи} = (E_{238} + \dots + E_{310}) \text{ усл. ед.}$$

Практическое значение работы.

Регистрация спектра в данной зоне ультрафиолетовой части позволяет произвести комплексную оценку более 200 токсичных продуктов, образующихся при нормальном и нарушенном метаболизме. Результат исследования выражается величиной, равной площади, ограниченной осью абсцисс и линией, соединяющей значения полученных экстинкций (спектрограммой), и записывается в условных единицах. Помимо расчета площади, как средства выражения результата исследования, исследуются также спектрограммы, формы которых в норме являются характерными, с индивидуальными особенностями, обусловленными оптическими свойствами веществ, находящихся в исследуемой биологической жидкости, качественным и количественным составом ВНиСММ.

Биохимическое исследование функций печени

В настоящее время принято наиболее целесообразным классифицировать функциональные пробы печени по синдромному принципу, т.е. по сущности нарушений гепатобилиарной системы, которые эти пробы отражают. Выделяют следующие синдромы: 1) цитолитический синдром; 2) синдром малой

недостаточности печени (гепатодепрессивный синдром); 3) мезенхимально-воспалительный синдром; 4) холестатический синдром; 5) синдром регенерации и опухолевого роста печени.

Наиболее чувствительными индикаторами цитолитического синдрома служат сывороточные аланин- и аспартатаминотрансферазы.

Лабораторная работа № 50. **Определение активности аспартат- и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови**

Принцип метода основан на способности кетокислот вступать в реакцию с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) и образовывать гидразоны кетокислот.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы и оборудование:

Субстратные растворы № 1 и № 2, 2,4-ДНФГ (0,1 %-ный раствор на 2 М растворе соляной кислоты), 0,4 М раствор гидроксида натрия. Термостат, фотоэлектродетектор, пробирки, пипетки.

Ход работы.

Определение активности ферментов проводят по схеме

Реактивы	АлАТ		АсАТ	
	опыт	контроль	опыт	контроль
Субстратный раствор	Раствор № 1, 0,5 мл	Раствор № 1, 0,5 мл	Раствор № 2, 0,5 мл	Раствор № 2, 0,5 мл
Нагревание в течение 5 минут при 37°C				
2,4-ДНФГ	—	1,0 мл	—	1,0 мл
Сыв-ка крови	0,1 мл	0,2 мл	0,1 мл	0,2 мл
Инкубация в течение 30 минут при 37°C				
2,4-ДНФГ	0,5 мл	—	0,5 мл	—
Экспозиция в течение 20 минут при комнатной температуре				
NaOH	5,0 мл	10 мл	5,0 мл	10 мл
Экспозиция в течение 10 минут при комнатной температуре				

Фотометрируют опытные пробы против контрольной на ФЭКе при 500-5560 нм (зеленый светофильтр) в кювете толщиной слоя 1 см.

Расчеты производят по формуле:

$$X = \frac{m20000}{1000},$$

где x — активность ферментов, ммоль/(ч·л); m — количество кетокислот в пробе, найденное по калибровочному графику, мкмоль; 10000 — коэффициент пересчета на 1 л крови; 1000 — коэффициент пересчета мкмоль в моль; 2 — для пересчета на 1 ч.

Практическое значение работы. В норме активность аланинаминотрансферазы составляет 0,1-0,68, а аспартатаминотрансферазы —

0,1-0,45 ммоль/(ч·л). Определение активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови является индикатором цитолитического синдрома при заболеваниях печени. Уровень ферментемии позволяет судить о выраженности цитолитического синдрома. Повышение активности аминотрансфераз сыворотки крови в 1,5-5 раз по сравнению с верхней границей нормы рассматривается как умеренная гиперферментемия, в 5,1-10,0 раз – как гиперферментемия средней степени и более 10,1 раза – как большая гиперферментемия. Рассчитывается также отношение активностей АсАТ к АлАТ (коэффициент Де Ритиса), которое в норме составляет 1,33. Это соотношение может до известной степени говорить о тяжести поражения печени. Преимущественное поражение АсАТ наблюдается при более тяжелых поражениях печени, что связывают с ее преимущественным расположением в митохондриях.

Одним из индикаторов холестатического синдрома является сывороточный билирубин.

Лабораторная работа № 51. **Количественное определение общего билирубина в сыворотке крови**

Принцип метода основан на способности билирубина давать при взаимодействии с диазофенилсульфоновой кислотой азобилирубин розово-фиолетового цвета. Билирубинглюкуронид реагирует с диазореактивом непосредственно. Связанный с белками билирубин взаимодействует с диазореактивом после диссоциации белкового комплекса, которая достигается добавлением кофеинового реактива.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы и оборудование:

Кофеиновый реактив, диазореактив. Пробирки, пипетки, фотоэлектроколориметр (ФЭК).

Ход работы.

Берут две пробирки (контрольную и опытную). Реакционную смесь составляют по схеме:

Реактивы	Общий билирубин, мл	Контроль, мл
Сыворотка	0,5	0,5
Кофеиновый реактив	1,75	1,75
Р-р хлорида натрия	–	0,25
Диазореактив	0,25	–

Содержимое опытной и контрольной проб хорошо перемешивают и ставят на 20 минут в темноту. По истечении указанного времени колориметрируют каждую пробу против воды на ФЭКе при 520-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см.

Расчет. Из полученной экстинкции общего билирубина вычитают экстинкцию контрольной пробы и по калибровочному графику находят содержание общего билирубина.

Практическое значение работы. В норме содержание общего билирубина в сыворотке крови составляет 8,0-20,0 мкмоль/л. Гипербилирубинемия является индикатором холестатического синдрома. Желтушная окраска кожных покровов появляется при содержании билирубина в крови выше 27 мкмоль/л. Исследование содержания билирубина проводится в клинике с целью дифференциальной диагностики желтух.

Одним из индикаторов мезенхимально-воспалительного синдрома является тимоловая проба.

Лабораторная работа № 52. Тимоловая проба

Принцип метода основан на осаждении патологически повышенных β - и γ -глобулинов, липопротеинов при pH 7,55 буферным раствором, насыщенным тимолом, и на колориметрическом определении степени опалесценции растворов, зависящей от содержания и состава белковых фракций.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы и оборудование:

Используют набор реактивов фирмы “Лакема” (Чехия). Состав набора. 1. Концентрированный рабочий раствор. 2. Калибровочный раствор № 1 – серная кислота 5N. 3. Калибровочный раствор № 2 – бария хлорид, раствор 0,0962 N.

Ход работы.

В пробирку вносят 3 мл рабочего раствора, добавляют 0,05 мл сыворотки крови, тотчас тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре точно на 30 минут. Затем содержимое пробирки вновь перемешивают и измеряют оптическую плотность раствора пробы против рабочего раствора в кюветах с толщиной слоя 1 см, в интервалах длин волн 620-660 нм (оптимальная длина волны 650 нм). Степень опалесценции находят по калибровочной кривой.

Если опалесценция превышает 20 ед., то следует провести повторное определение с сывороткой крови, разбавленной изотоническим раствором натрия хлорида в соотношении 1 : 1, а полученный результат умножить на 2. При исследовании хилезных сывороток опалесценцию измеряют по отношению к контрольному раствору, приготовленному смешиванием 0,05 мл сыворотки крови с 3 мл изотонического раствора натрия хлорида.

Построение калибровочного графика. Для построения графика из основных эталонных растворов № 1 и 2 готовят рабочие эталонные растворы, соответствующие 5, 10, 15 и 20 ед. помутнения (см. таблицу).

Данные для построения калибровочного графика

Номер пробирки	Основной эталонный раствор, мл		Единицы помутнения, ед.
	№ 1	№ 2	
1	4,5	1,5	5
2	3,0	3,0	10
3	1,5	4,5	15
4	–	6,0	20

Замечают время смешивания эталонных растворов, точно через 30 минут содержимое пробирок тщательно перемешивают и измеряют оптическую плотность растворов на ФЭКе при длине волны 650 нм против дистиллированной воды в кюветах с толщиной слоя жидкости 10 мм.

Практическое значение работы.

Осадочные реакции отражают изменение концентрации в сыворотке крови не какого-либо одного компонента, а ряда веществ. В частности, на патологические изменения тимол-вероналовой пробы влияет повышение концентрации IgM и IgG, а также липопротеинов сыворотки крови, поэтому специфичность осадочных реакций невелика. Однако клиническая практика показала несомненную диагностическую ценность этих реакций, особенно при остром вирусном гепатите, хроническом активном гепатите и циррозе печени.

В норме значение тимоловой пробы до 5 ед. помутнения. Является индикатором мезенхимально-воспалительного синдрома и используется как для диагностики, так и для оценки фазы заболевания и активности патологического процесса.

Биохимия соединительной ткани

Лабораторная работа № 53. **Определение содержания свободного гидроксипролина в моче по Нейману и Логану в модификации П.Н.Шараева**

Принцип метода основан на взаимодействии продукта окисления и декарбоксилирования гидроксипролина с п-диметиламинобензальдегидом, в результате чего образуется окрашенное соединение розового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации гидроксипролина в пробе.

Исследуемый материал: моча, предварительно профильтрованная.

Реактивы и оборудование.

Ход работы.

В 2 пробирки вносят по 1 мл профильтрованной мочи, раствора сульфата меди (II), раствора гидроксида натрия, раствора пероксида водорода. Содержимое обеих пробирок перемешивают стеклянной палочкой в течение 5 минут, затем их ставят в термостат при 70°C на 5 минут, периодически встряхивая до полного прекращения выделения пузырьков. Затем пробы охлаждают в воде со льдом или снегом. К охлажденным пробиркам приливают

по 4 мл раствора серной кислоты и по 2 мл реактива Эрлиха и перемешивают содержимое пробирок стеклянной палочкой. После этого опытную пробирку помещают в кипящую водяную баню на 80 сек, а контрольную – на то же время в воду со льдом или снегом.

Измеряют экстинкцию опытной и контрольной проб против воды на ФЭКе при зеленом светофилтре в кювете с толщиной слоя 1 см. Из экстинкции опытной пробы вычитают экстинкцию контрольной пробы и полученную величину используют для нахождения содержания гидроксипролина в пробе по калибровочному графику.

Для построения калибровочного графика отмеривают в одну пробирку 1 мл воды (“слепая” проба) – по 1 мл раствора гидроксипролина с концентрацией его 1, 10, 15, 20 и 25 мкг/мл.

Данные пробы обрабатывают также как и описанные выше опытные, измеряют экстинкцию стандартных проб против “слепой” при тех же условиях.

Расчет проводят по формуле

$$X = \frac{EV}{1000},$$

где X – содержание гидроксипролина в моче, мг/сут; E – содержание гидроксипролина в пробе, найденное по калибровочному графику по разнице экстинкций опытной и контрольной проб, мкг; V – суточный объем мочи, мл; 1000 – коэффициент пересчета микрограммов в миллиграммы.

Практическое значение работы.

Гидроксипролин входит в состав только белков соединительной ткани – коллагена и эластина, в которых содержание данной аминокислоты составляет соответственно 10 – 15 и 1,5%. Выделение гидроксипролина с мочой, а также концентрация его в плазме или сыворотке крови зависят в основном от скорости синтеза коллагена, образования коллагеновых фибрилл и интенсивности распада коллагена в тканях.

В норме экскреция свободного гидроксипролина с мочой у взрослого человека составляет 1 – 8 мг, или 7,6 – 61,0 мкмоль в сутки. Повышенное выделение его с мочой отмечается при повреждении соединительной ткани, сопровождающемся распадом коллагена (например, при ревматизме, системной склеродермии и др.). Динамическое наблюдение за экскрецией гидроксипролина с мочой может дать информацию о формировании рубца в постинфарктном участке миокарда.

Лабораторная работа № 54. Определение сиаловых кислот в сыворотке крови методом Гесса

Принцип метода основан на цветной реакции, которая наблюдается при нагревании сиаловой кислоты с уксусно-серноокислотным реактивом. Интенсивность розово-красного окрашивания зависит от концентрации сиаловой кислоты.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы и оборудование.

1. 10 %-ный раствор ТХУ.

2. Уксусно-серноокислый реактив (95 г ледяной уксусной кислоты и 5 г концентрированной серной кислоты).
3. Водяная баня.
4. Фотоэлектроколориметр (ФЭК).

Ход работы.

К 1 мл сыворотки крови прибавляют 1 мл 10 %-ного раствора ТХУ, смесь энергично встряхивают, нагревают 5 минут на водяной бане, охлаждают и центрифугируют. К 0,5 мл надосадочной жидкости добавляют 5 мл уксусно-серноокислого реактива и нагревают 30 минут на кипящей водяной бане, при этом развивается розово-красное окрашивание. После охлаждения раствор колориметрируют при зеленом светофильтре. Полученное значение экстинкции умножают на 1000. Результат определения выражают в величинах экстинкции.

Практическое значение работы.

Сиаловые кислоты – производные нейраминовой кислоты. В сыворотке крови содержится сиаловая кислота под названием N-ацетилнейраминовой. В норме значение экстинкции колеблется от 100 до 195, что соответствует содержанию сиаловых кислот от 50 до 79 мг/дл (0,7 г/л). Поскольку содержание сиаловых кислот в крови увеличивается при раке легких, туберкулезе, ревматизме, злокачественных опухолях костной ткани, их определение имеет большое диагностическое значение.

Литература

1. Алейникова Т.Л. Руководство к практическим занятиям по биохимии / Алейникова Т.Л. и др.; под ред. Е.С. Северина. – М.: "Медицина", 2000. – 126 с.
2. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. – Под ред. А.Я. Николаева. – М.: "Высшая школа", 1988. – 239 с.
3. Николаев А.Я. Биологическая химия. М.: изд-во "Медицинское информационное агентство", 2004. – 565 с.
4. Пустовалова Л.М. Практические работы по биохимии. Ростов-на-Дону: изд-во "Феникс", 2004. – 319 с.
5. Строев Е.А., Макарова В.Г. Практикум по биологической химии. М.: "Высшая школа", 1986. – 232 с.

Учебное издание

Составители: Строителев В.В.
Понаморева О.Н.
Каманина О.А.
Акатова Е.В.
Бабкина Е.Е.

**Методические указания
для студентов очной формы обучения
к лабораторным работам
по биологической химии**

Авторское редактирование

Изд. лиц. № 020300 от 12.02.1997. Подписано в печать 24.02.2016.

Формат бумаги 60х84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 5,3. Уч.-изд. л. 4,5.

Тираж 100 экз. Заказ 037

Тульский государственный университет

300012, г. Тула, просп. Ленина, 92

Отпечатано в Издательстве ТулГУ

300012, г. Тула, просп. Ленина, 95