

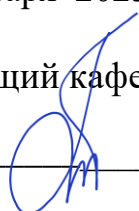
МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Естественнонаучный институт
Кафедра «Биотехнологий»

Утверждено на заседании кафедры
«Биотехнологий»
«30» января 2023 г., протокол № 6

Заведующий кафедрой

 О.Н. Понаморева

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине (модулю)**

«Биохимия»

**основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программы специалитет**

по специальности
31.05.01 Лечебное дело

со специализацией
Лечебное дело

Форма обучения: очная

Идентификационный номер образовательной программы: 310501-01-23

Тула 2023 год

ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЯ
фонда оценочных средств (оценочных материалов)

Разработчик:

Акатова Е.В., доцент, к.б.н.

(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)



(подпись)

Оглавление

Лабораторная работа № 1	5
Количественное определение общего белка в сыворотке крови биуретовым методом	5
Лабораторная работа № 2	6
Изучение строения и физико-химических свойств белков. Методы очистки белков от низкомолекулярных примесей	6
Лабораторная работа № 3	7
Изучение свойств ферментов как биологических катализаторов. Специфичность действия ферментов. Зависимость скорости реакции от температуры	7
Лабораторная работа № 4	8
Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов.	8
Лабораторная работа № 5	10
Жирорастворимые витамины. Методы определения	10
Лабораторная работа № 6	12
Строение и функции клеточных мембран	12
Лабораторная работа № 7	12
Количественное определение пировиноградной кислоты	13
Лабораторная работа № 8	15
Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной активности мышц	15
Лабораторная работа № 9	16
Обнаружение тирозиназы	16
Лабораторная работа № 10	17
Определение глюкозы в крови ферментативным методом	17
Лабораторная работа № 11	19
Синтез и распад гликогена. Выделение гликогена из печени	19
Лабораторная работа № 12	23
Обмен липидов. Переваривание липидов в ЖКТ. Обнаружение действия животной липазы и определение ее активности	23
Лабораторная работа № 13	25
Синтез и окисление жиров в организме	25
Лабораторная работа № 14	27
Всасывание и транспорт продуктов переваривания липидов. Липопротеины: образование и функции. Определение общего холестерина в сыворотке крови энзиматическим колориметрическим методом	27
Лабораторная работа № 15	28
Переваривание и всасывание белков в ЖКТ. Количественное определение кислотности желудочного сока	30
Лабораторная работа № 16	32
Обмен некоторых аминокислот: серина, глицина, метионина, фенилаланина и тирозина. Количественное определение креатинина в сыворотке крови и моче	32

Лабораторная работа № 17	34
Распад и синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Определение мочевины в сыворотке крови фотометрическим методом или мочевой кислоты.....	34
Лабораторная работа № 18	35
Гормоны общие сведения. Качественные реакции на гормоны. Гормоны поджелудочной железы. Сахарный диабет: биохимические признаки. Качественное определение кетоновых тел в моче.....	35
Лабораторная работа № 19	37
Биохимические функции гормонов щитовидной железы, надпочечников, гипофиза и половых гормонов.....	37
Лабораторная работа №20	39
Биохимия органов и тканей. Количественное определение общего билирубина в сыворотке крови. Определение содержания свободного гидроксипролина в моче.....	39

Лабораторная работа № 1

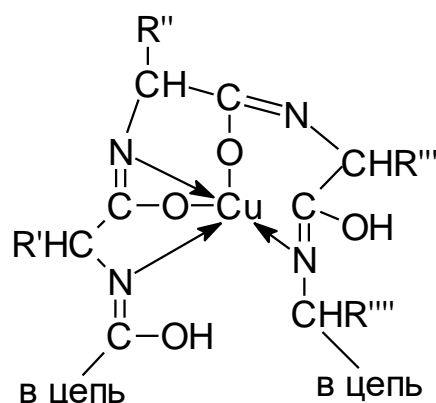
Количественное определение общего белка в сыворотке крови биуретовым методом

Цель работы: ознакомиться с количественным определением общего белка в сыворотке крови.

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 (100г/л), 0,9% раствор хлорида натрия, биуретовый реактив, фотоэлектроколориметр (ФЭК).

Ход работы.

В 2 пробирки отмеряют 0,1 мл сыворотки и стандартного раствора альбумина. В пробирки добавляют по 5,0 мл биуретового реактива. В контрольную пробирку приливают 0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия и 5,0 мл биуретового реактива. Через 20 минут измеряют экстинкцию опытной и стандартной проб (оптическую плотность) на фотоэлектроколориметре против контрольного раствора. Измерение проводят в кювете толщиной 1 см, длина волны 540-560 нм.

Содержание белка в сыворотке крови находят по формуле.

$$X = \frac{C_{\text{ст}} \times A_{\text{оп}}}{A_{\text{ст}}}$$

Где

X - содержание белка в сыворотке крови, г/л

C_{ст} – содержание белка в стандартном растворе, г/л

A_{оп} – оптическая плотность опытной пробы

A_{ст} - оптическая плотность стандартной пробы

Оформление работы. Кратко записывают теорию и ход работы. Занести полученные значения оптической плотности в тетрадь, рассчитать содержание белка по калибровочному графику и сделать вывод о возможных изменениях содержания белка в крови.

Лабораторная работа № 2

Изучение строения и физико-химических свойств белков. Методы очистки белков от низкомолекулярных примесей

Цель: ознакомиться с методом очистки белка от низкомолекулярных примесей.

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, раствор хлорида бария, биуретовый реактив, 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

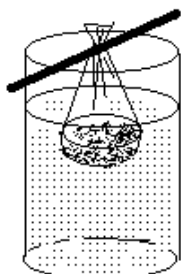


Рис.1 Диализатор в рабочем состоянии

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 SO_4^{2-} : добавляют в первую пробирку раствор BaCl_2 . Наблюдают образование белого осадка.

б) на присутствие белка: добавляют во вторую пробирку 1 мл биуретового реактива. Наблюдают образование фиолетового окрашивания..

5. Жидкость из мешочка сливают в пробирку, отбирают 1 мл и проделывают реакцию с биуретовым реактивом.

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

Лабораторная работа № 3

Изучение свойств ферментов как биологических катализаторов. Специфичность действия ферментов. Зависимость скорости реакции от температуры

Цель: ознакомиться с влиянием температуры на активность ферментов.

Ферменты характеризуются высокой каталитической активностью, специфичностью действия, чувствительностью к изменению внешних факторов (температуры, pH, ионной силе, действию ингибиторов и активаторов).

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.

Под действием фермента амилазы слюны в ротовой полости начинается процесс переваривания углеводов. Этот фермент эффективно катализирует

гидролиз α -(1 \rightarrow 4)-связей в молекуле крахмала, расщепляя полисахарид на олигосахариды и дисахариды - мальтозу и изомальтозу.

Степень расщепления крахмала амилазой контролируют, используя реакцию крахмала с йодом. Негидролизованный крахмал можно обнаружить по реакции с йодом, который взаимодействует с крахмалом с образованием синего комплекса.

Материал исследования: раствор амилазы

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостат с температурой 40⁰С, , кипящая водяная баня, баня со льдом, 1% раствор крахмала, 1% раствор сульфата меди, 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 40⁰С, четвертую - в кипящую водяную баню.

2. Через 3 мин содержимое каждой пары пробирок сливают вместе и оставляют на 1 мин в тех же условиях.

3. Через 1 мин из пробирки с реакционной смесью отбирают каплю жидкости на предметное стекло и добавляют к ней каплю реактива Люголя. 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, °С	Окраска раствора после взаимодействия с йодом
		Время τ_1 , мин
1	0	
2	20	
3	40	
4	100	

Лабораторная работа № 4

Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов.

Цель: ознакомиться с влиянием ингибиторов на активность ферментов.

Ферменты характеризуются высокой каталитической активностью, специфичностью действия, чувствительностью к изменению внешних факторов (температуры, pH, ионной силе, действию ингибиторов и активаторов).

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.

Под действием фермента амилазы слюны в ротовой полости начинается процесс переваривания углеводов. Этот фермент эффективно катализирует гидролиз α -(1 \rightarrow 4)-связей в молекуле крахмала, расщепляя полисахарид на олигосахариды и дисахариды - мальтозу и изомальтозу.

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. Негидролизованный крахмал можно обнаружить по реакции с йодом, который взаимодействует с крахмалом с образованием синего комплекса.

Материал исследования: раствор амилазы

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

Ход работы

Опыт 1. Влияние ингибиторов на активность фермента

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 1 мин в термостате при 40 $^{\circ}\text{C}$.

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	1		
		2		
		3		
		4		

Лабораторная работа № 5

Жирорастворимые витамины. Методы определения

Цель: ознакомиться с методами определения жирорастворимых витаминов на примере витамина Д.

Витамины D и родственные им стеринны дают цветные реакции с различными реагентами, что широко используется при колориметрическом определении витамина. Большинство стериннов, в том числе и витамины D, дают интенсивное окрашивание с серной кислотой (реакция Либермана-Бухарда) с максимумом поглощения при 620 нм. В присутствии ацетилхлорида раствор витамина D дает с 1,3-дихлоргидрином глицерина зеленое окрашивание с максимумом поглощения при 625 нм. С фурфуролом в присутствии трихлоруксусной кислоты витамин D дает цветную реакцию, после нагревания развивается розово-фиолетовое окрашивание с максимумом поглощения при 500–550 нм.

С йодом в этилендихлориде в присутствии витаминов D₂, D₃ развивается интенсивное желтое окрашивание с максимумом поглощения при 450 нм. Интенсивность окрашивания повышается при добавлении п-хлорбензоата ртути. Реагент обладает высокой специфичностью по отношению к витамину D и более высокой чувствительностью, чем с 1,3-дихлоргидрином глицерина, но менее чем с треххлористой сурьмой. При этом провитамин D и холестерол не мешают определению.

Практическое значение имеет метод, в основе которого лежит цветная реакция с треххлористой сурьмой. Витамины D₂, D₃ образуют с треххлористой сурьмой в хлороформе окрашенное соединение оранжевого цвета с максимумом поглощения при 520 нм. Реакция не достаточно специфична, но широко используется для количественного анализа продуктов с D-витаминной активностью. Для повышения стабильности реагента добавляют свежеперегнанный ацилхлорид (2,5–3%) или уксусный ангидрид. Эргостерол с треххлористой сурьмой дает красное окрашивание, а холестерол – желтое.

Ход анализа. Точную навеску анализируемого продукта (3–6 г) внести в коническую колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 100 мл, добавить 10 мл 10%-го раствора гидроксида калия и закрыть колбу обратным холодильником и поместить на час в водяную баню при температуре кипения спирта.

После омыления колбу с гидролизатом охладить, отсоединить холодильник и добавить 20 мл дистиллированной воды. Содержимое колбы количественно перенести в делительную воронку. Колбу трижды ополоснуть небольшими порциями дистиллированной воды и смывы объединить с гидролизатом. Гидролизат, содержащий неомыляемую фракцию, экстрагировать диэтиловым эфиром, используя на каждую экстракцию соответственно 50, 25, 25 мл эфира. Объединенные эфирные вытяжки перенести в делительную воронку и отмыть от щелочи дистиллированной водой, подкисленной соляной кислотой (1–2 капли концентрированной кислоты на литр), до отрицательной реакции промывных вод по фенолфталеину. Общий объем дистиллированной воды, взятой для промывки эфирных вытяжек, не должен превышать 200 мл.

Органический слой (верхний) отделить, собрать в плоскодонную колбу и оставить над осушителем (5–7 г свежепрокаленного сульфата натрия) при пе-

риодическом перемешивании. Спустя 30 минут после полного осветления раствора осушитель отфильтровать через воронку Шотта и собрать фильтрат в круглодонную колбу со шлифом. Дважды промыть осушитель на фильтре небольшими порциями диэтилового эфира (по 5 мл) и добавить их к основному фильтрату. Растворитель отогнать на ротационном вакуумном испарителе в атмосфере инертного газа при температуре 30 °С до сухого остатка.

Неомыляемый остаток растворить в сухом хлороформе и количественно перенести в мерную колбу с таким расчетом, чтобы полученный раствор содержал 100–1000 МЕ/мл (2,5–25 мкг/мл) витамина D. Объем раствора в мерной колбе довести до метки тем же растворителем. Отобрать из мерной колбы 1 мл раствора в фотоколориметрическую кювету, добавить три капли свежеперегнанного ацетилхлорида, 6 мл раствора хлорида сурьмы в хлороформе и выдержать ровно 4 минуты после добавления последнего реагента. Измерить оптическую плотность анализируемой смеси при 500 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм относительно контрольного раствора.

Контрольный раствор. Отмерить в фотоколориметрическую кювету 1 мл хлороформа, 6 мл раствора треххлористой сурьмы в хлороформе и три капли ацетилхлорида. По величине оптической плотности определить по калибровочному графику концентрацию витамина. Массовую долю витамина D (C_D , млн⁻¹) в анализируемой пробе рассчитать по формуле:

$$C_D = (C_k \times V_1) / (m \times V_2)$$

где C_D – концентрация витамина D, найденная по калибровочному графику, мкг/мл;

V_1 – общий объем хлороформного раствора после экстракции, мл;

V_2 – объем хлороформного раствора, взятый на проведение цветной реакции, 1 мл;

m – навеска исследуемого материала, г.

Построение калибровочного графика. Точную навеску кристаллического кальциферола (2,5 мг) растворить в 15 мл хлороформа и количественно перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл (с таким расчетом, чтобы содержание витамина D составило 10³ МЕ/мл). Из стандартного раствора приготовить пять калибровочных растворов с массовой концентрацией кальциферола от 100 до 1000 МЕ/мл (2,5–25 мкг/мл) по схеме, приведенной в таблице 2.1.11.

Таблица 2.1.11. Схема приготовления калибровочных растворов кальциферола

Номер калибровочного раствора	1	2	3	4	5
Объем стандартного раствора витамина D (10 ³ МЕ/мл), мл	0,1	0,25	0,50	0,75	1,00
Концентрация витамина D в калибровочном растворе, МЕ/мл	100	250	500	750	1000
Концентрация витамина D в калибровочном растворе, мкг/мл	2,5	6,25	12,50	18,75	25

Для этого в фотоколориметрическую кювету отмерить соответствующее количество стандартного раствора кальциферола, довести объем до 1 мл хлороформом, добавить три капли свежеперегнанного ацетилхлорида, 6 мл раствора хлорида сурьмы в хлороформе. Ровно через 4 минуты после добавления последнего реактива измерить оптическую плотность калибровочных растворов при 500 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм относительно раствора треххлористой сурьмы в хлороформе.

Построить калибровочный график в координатах: оптическая плотность (A_{500}) – содержание витамина D (C_D , мкг/мл).

Лабораторная работа № 6

Строение и функции клеточных мембран

Цель: изучить строение и функциями мембран и обнаружение холестерина, как одного из основных компонентов клеточных мембран

Фосфолипиды широко распространены в клетках животных и растительных тканей, клетках микроорганизмов, являясь главным компонентом биологических мембран. В составе запасных отложений встречаются редко и в небольших количествах. Молекула фосфолипидов образована остатком глицерина (реже пропандиола или этандиола) или сфингозина, жирных кислот, фосфорной кислоты, соединенной фосфорноэфирной связью с какой-либо полярной группой. В зависимости от строения полярной группы глицерофосфолипиды делятся на фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозитолы, фосфатидилглицеролы, дифосфатидилглицеролы. Подгруппа глицерофосфолипидов – плазмалогены (или фосфатидали) отличаются от других только тем, что имеют в С–1 положении L-глицеро-3-фосфата не остаток жирной кислоты, а α, β -ненасыщенный спирт, присоединенный простой эфирной связью. Полярная группа в плазмалогенах чаще всего представлена холином, этаноламином или серином.

Самыми распространенными сфингофосфолипидами являются сфингомиелины – фосфохолиновые производные церамидов. Остаток жирной кислоты в церамиде присоединен к аминогруппе. Особенно богаты сфингомиелинами мембраны нервной ткани, в частности мозга. Фосфолипиды растворимы в органических растворителях, но избирательно: одни – в диэтиловом эфире, другие – в этаноле, третьи – в бензоле. Большинство из них нерастворимы в ацетоне, что позволяет отделить их от других липидов. Они способны набухать в воде и окисляться на воздухе.

. Извлечение глицерофосфолипидов из мозга крыс

Принцип метода: гомогенат ткани обрабатывают раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) для удаления нелипидных примесей. Затем из осадка производят экстракцию фосфоглицеридов этанол-эфирной и хлороформ-метаноловой смесями.

Реактивы:

- 1) 2,5 % и 5 % растворы ТХУ,
- 2) смесь растворителей этанол–диэтиловый эфир (3 : 1),

- 3) смесь растворителей хлороформ–метанол (2 : 1);
- 4) этанол,
- 5) ацетон,
- 6) диэтиловый эфир.

Обратите внимание! Все работы с органическими растворителями и кислотами проводить под тягой, вдали от нагревательных приборов.

Ход определения: навеску ткани от 1 до 4 г (мозг), превращают в гомогенную массу с помощью гомогенизатора или тщательно растирают в ступке, помещенной в сосуд со льдом. Гомогенизированную ткань переносят в центрифужную пробирку, куда предварительно приливают (из расчета на 1 г ткани) 10 мл охлажденного до 0 °C 5 % раствора ТХУ и тщательно перемешивают. Далее производят центрифугирование в течение 7–10 мин при 3000–4000 об/мин, после чего надосадочную жидкость удаляют, полученный осадок многократно (10–12 раз) промывают охлажденной 2,5 % ТХУ из расчета 5 мл на 1 г ткани.

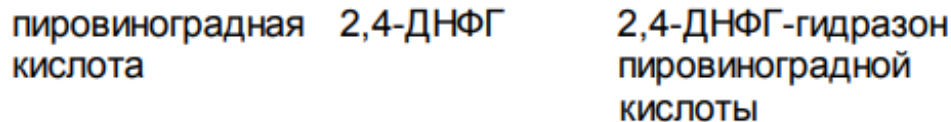
Далее, для удаления ТХУ осадок многократно (8–10 раз) промывают охлажденной дистиллированной водой и высушивают ацетоном и эфиром, которые берут из расчета 5 мл на 1 г ткани. После этого производят экстракцию фосфолипидов из осадка, для чего берут 20 мл свежеприготовленной спирт-эфирной смеси (3 : 1) и экстрагируют при 60 °C в течение 3 мин. Осадок отделяют и из него производят экстракцию хлороформ-метаноловой смесью (30 мл) в течении 30 мин при 64 °C на водяной бане с обратным холодильником. Поскольку ацетон и эфир, используемые для просушки осадка, частично растворяют фосфолипиды, их также следует объединить с хлороформ-метаноловым экстрактом. Спирт-эфирный и хлороформ-метаноловый экстракты (если необходимо, их объединяют) сливают в мерные колбы на 100 мл и доводят до метки. Полученный фосфолипидный экстракт используют для количественного определения фосфолипидов, (например, по фосфору)

Лабораторная работа № 7

Количественное определение пировиноградной кислоты.

Цель: определение содержания 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:

$$X = A \times 2 \times 1000.$$

где X - количество пирувата в мг/л; А - 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:

$$C = X/88 \text{ ,}$$

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.

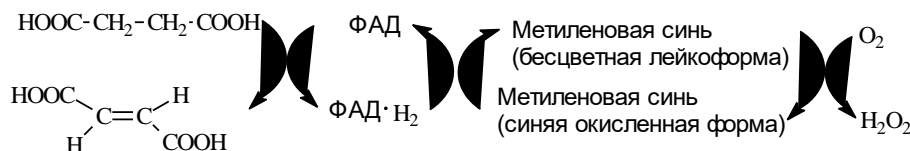
Лабораторная работа № 8

Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной активности мышц

Цель: в процессе исследования ферментативного действия некоторых окислительно-восстановительных комплексов закрепить знания о локализации ферментов в клетке и молекулярном механизме действия цепи переноса электронов;

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.

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.



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.

Материал исследования: мышечная ткань.

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 две пробирки.

2. Затем в пробирки приливают реактивы по схеме, приведенной в таблице:

№ пробы	Буфер (V,мл)	Янтарная кислота (V, мл)	H ₂ O (V,мл)	Малоновая кислота (V, мл)	Краситель (метиле-новый синий) (V,мл)
1 (субстрат)	1	1	1	-	0,1
2 (субстрат + ингибитор)	1	1	-	1	0,1

Содержимое пробирок тщательно перешивают и добавляют 1 мл вазелинового масла, чтобы избежать окисление красителя кислородом воздуха. Пробирки помещают в термостат и выдерживают 5-20 минут при 40°C, контролируя процесс обесцвечивания красителя.

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:

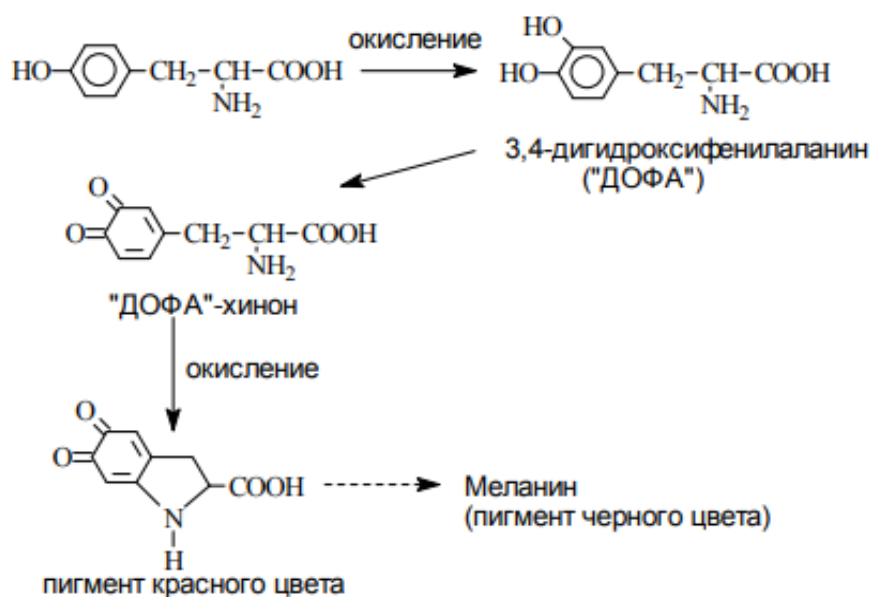
При оформлении указывают фермент, кофермент, донор и акцептор электронов в ткани, донор и акцептор электронов в опыте, а также заносят в тетрадь таблицу, добавив графу с наблюдениями. Сделать вывод про результатах работы.

Лабораторная работа № 9

Обнаружение тирозиназы

Цель: Изучить действие окислительно-восстановительных ферментов на примере тирозиназы.

Фермент тирозиназа (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	

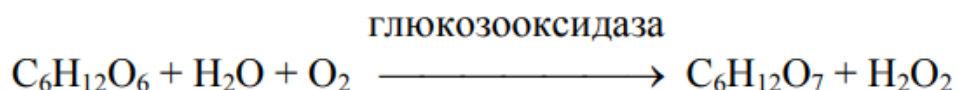
Лабораторная работа № 10

Определение глюкозы в крови ферментативным методом

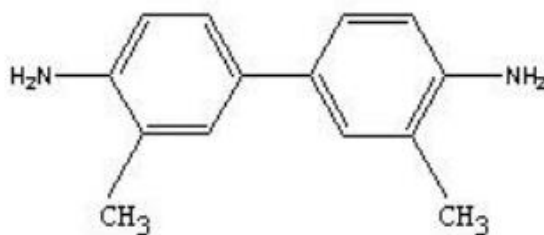
Цель: определить содержание глюкозы в крови ферментативным методом

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. 42 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 о-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 о-толидина; 0,25 н ацетатный буфер $\text{pH}=4,8$ (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 методом.

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 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 добав-

ления 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	0,75	100
3	0,375	0,625	150
4	0,5	0,5	200
5	0,625	0,375	250
6	0,75	0,25	300
7	0,875	0,125	350
8	1	-	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 № 11

Синтез и распад гликогена. Выделение гликогена из печени

Метод основан на выделении гликогена из мышечной ткани и цветной реакции с антроном. Метод состоит из следующих основных операций: гидролиз белков мышечной ткани щелочью, выделение гликогена из раствора этиловым спиртом, промывание гликогена и его растворение, реакция с антроном и развитие окраски, измерение интенсивности окраски. При нагревании навески мышечной ткани с крепким раствором щелочи происходит гидролиз мышечных белков, при этом гликоген освобождается из клеток. Гликоген не растворяется в спирте, поэтому он выпадает в осадок при добавлении довольно большого количества спирта. Прибавление сюда же нескольких капель концентрированной серной кислоты способствует осаждению гликогена вследствие образования сульфата аммония.

Окрашенный от зеленого до сине-зеленого цвета продукт реакции имеет мак-

симум поглощения при длине волны 620 мкм. Интенсивность окраски раствора измеряют на спектрофотометре СФ-4 или фотоэлектроколориметре ФЭК-М или фотометре ФТ-2 с красным светофильтром с максимум пропускания при той же длине волны.

Реактивы и материалы: 50%-ный раствор едкого кали, 96-, 60- и 80%-ный этиловый спирт, эфир, концентрированная химически чистая серная кислота, антрон (производное антрахинона), гликоген или глюкоза (для построения калибровочного графика), 95%-вая серная кислота (к 50 мл воды прибавляют 1 л концентрированной H_2SO_4 и охлаждают), свежеприготовленный 0,2%-ный раствор антрона в 96%-ной серной кислоте. 0,2 г антрона помещают в мерную колбу на 100 мл, растворяют и доводят до метки 95%-ной серной кислотой, после выдержки в течение 1 ч раствор готов для использования (на 1 день работы), 30%-ный водный раствор едкого кали, свежеприготовленный 0,2%-ный раствор антрона в 95%-ной серной кислоте (0,2 г антрона в 100 мл 95%-ной серной кислоты).

Оборудование и посуда: центрифуга, центрифужные пробирки, технические весы, пробирки, штатив, водяная баня, сифон, пипеткой, стеклянная палочка, спектрофотометр.

Ход работы:

1. Определение гликогена в мышцах

В центрифужные пробирки размером 25 x 160 мм вносят 5 мл 50%-ного раствора едкого кали и около 2,5 г мяса, взвешенного на технических весах с точностью до 0,01 г. Пробирки помещают в специальный штатив, вместе с которым их ставят в кипящую водяную баню. После образования однородного раствора (все частички мяса растворились) пробирки охлаждают, добавляют 5 мл дистиллированной воды, осаждают гликоген 40 мл 96%-ного спирта и вносят несколько капель концентрированной серной кислоты.

Пробирки оставляют на 24 ч, после чего центрифугируют в течение 30 мин при 3000 об/мин, жидкость над осадком сливают тонким сифоном или осторожно удаляют пипеткой. Осадок последовательно промывают 15 мл 60%-ного, затем 80%-ного спирта и, наконец, 96%-ным спиртом, а затем эфиром.

Для отделения промывных жидкостей пробирки с содержимым центрифугируют 30 мин. После каждого центрифугирования жидкость над осадком сливают, пользуясь вышеуказанным приемом. При обработке эфиром центрифугирования не требуется, после 10 мин настаивания эфир сливают из пробирки, а его следы удаляют на водяной бане.

Каждую порцию промывной жидкости добавляют не сразу, а в два приема. Сначала вносят небольшую часть жидкости и тщательно распределяют в ней остаток, перемешивая его стеклянной палочкой, а затем добавляют оставшееся количество, тщательно смывая в пробирку приставшие к палочке частицы.

После удаления следов эфира к остатку добавляют 5 мл горячей воды, раствор перемешивают вращательным движением пробирки и нейтрализуют соляной кислотой по лакмусу (сначала двумя каплями концентрированной, а

затем 2%-ным раствором).

Из пробирки раствор гликогена переносят в мерную колбу соответствующей емкости (если парное мясо – в колбу на 500 мл, если же мясо, выдержанное в течение 1–2 суток, – на 25–50 мл). Для проведения цветной реакции в две пробирки молибденового стекла размером 30 x 200 мм помещают аликвотные части раствора гликогена (например, 0,5 и 1,5 мл), добавляют до 5 мл дистиллированной водой и погружают в водяную баню со льдом. Осторожно, непрерывно перемешивая, приливают тонкой струей 10 мл свежеприготовленного раствора антрона в 95%-ной серной кислоте. Затем жидкости еще раз осторожно перемешивают вращательным движением и пробирки помещают на 10 мин в сильно кипящую водяную баню. По окончании нагревания пробирки быстро охлаждают в воде со льдом и измеряют оптическую плотность в отношении контрольного раствора. Образовавшаяся зеленая окраска при использовании реактивов высокой чистоты устойчива на протяжении 4–5 ч.

Контрольный опыт проводят в аналогичных условиях, помещая в пробирку 5 мл дистиллированной воды и 10 мл раствора антрона в серной кислоте.

Оптическая плотность контрольного раствора, измеренная относительно серной кислоты, не должна быть более 0,08.

При помощи калибровочного графика находят концентрацию гликогена во взятом на цветную реакцию количестве раствора и затем пересчитывают на содержание его в мясе.

$$x = \frac{\alpha \cdot 25 \cdot 100}{ne} \text{ мг } \%,$$

где α – количество гликогена, вычисленного по калибровочному графику, мг;

25 – емкость мерной колбы, в которой был растворен осадок гликогена;

100 – множитель перевода в проценты;

n – количество исследуемого раствора, взятого на цветную реакцию, мл;

e – навеска мяса, г.

Чтобы построить калибровочный график, готовят стандартный раствор. Для приготовления стандартного раствора применяют тщательно очищенный и высушенный в эксикаторе гликоген, полученный из печени только что убитого кролика, или пользуются химически чистым препаратом глюкозы; для перевода глюкозы в гликоген результаты определения делят на 1,11.

Взвешивают на аналитических весах 16 мг гликогена, навеску растворяют теплой, дистиллированной водой в мерной колбе на 200 мл, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем водой до метки и тщательно перемешивают. Такой раствор содержит в 1 мл 0,08 мг гликогена. Из него готовят серию растворов для построения калибровочного графика, помещая в пробирки количества, указанные в табл.

Количество гликогена, мг	Количество раствора гликогена, мл	Количество воды, мл	Количество раствора антрона, мл
0,01	0,125	4,875	10,0
0,02	0,25	4,75	10,0
0,04	0,50	4,50	10,0
0,06	0,75	4,25	10,0
0,08	1,00	4,00	10,0
0,12	1,50	3,50	10,0
0,16	2,00	3,00	10,0
0,20	2,50	2,50	10,0

После добавления антрона пробирку помещают точно на 10 мин в сильно кипящую водяную баню и через определенный промежуток времени (например, 5 мин) заливают раствором антрона следующую пробирку и нагревают ее так же, как и предыдущую.

Если интенсивность окраски раствора не изменяется в течение некоторого промежутка времени, то можно подготовить для измерения сразу несколько растворов. Для этого предварительно устанавливают время, в течение которого измерение возможно. После 10 мин нагревания и охлаждения раствора до комнатной температуры измеряют его оптическую плотность, держатель с кюветами вынимают из камеры спектрофотометра и оставляют на 5 или 10 мин, после чего вновь ставят в камеру прибора и измеряют светопоглощение раствора. Такую операцию повторяют несколько раз в течение, например, 1 ч. Если практически получается одна и та же величина оптической плотности, то окраску раствора можно считать стабильной на протяжении исследованного периода времени. Это дает право одновременно подготовить для измерения нужное число пробирок с растворами, что значительно экономит время, затрачиваемое на анализ.

Для построения калибровочного графика необходимо провести не менее трех серий определений, используя каждый раз вновь приготовленный раствор гликогена или глюкозы.

2. Определение содержания гликогена в печени

В пробирку молибденового стекла (или стекла пирекс) размером 20 x 160 мм помещают навеску 1,00 г тщательно измельченной печени, добавляют 3 мл 30%-ного раствора едкого кали и нагревают на сильно кипящей водяной бане в течение 20 мин. По истечении этого времени пробирку охлаждают в холодной воде, содержимое пробирки количественно переносят в мерную колбу и доводят объем дистиллированной водой до метки. Емкость мерной колбы подбирают в зависимости от возможного содержания гликогена в печени: если анализируют печень только что убитого животного, измельченную при охлаждении, то выбирают колбу на 200–600 мл; для анализа печени, хранившейся длительное время, берут колбу на 25–50 мл.

Цветную реакцию с антроном и измерение проводят так же, как при определении содержания гликогена в мышечной ткани

Лабораторная работа № 12

Обмен липидов. Переваривание липидов в ЖКТ. Обнаружение действия животной липазы и определение ее активности

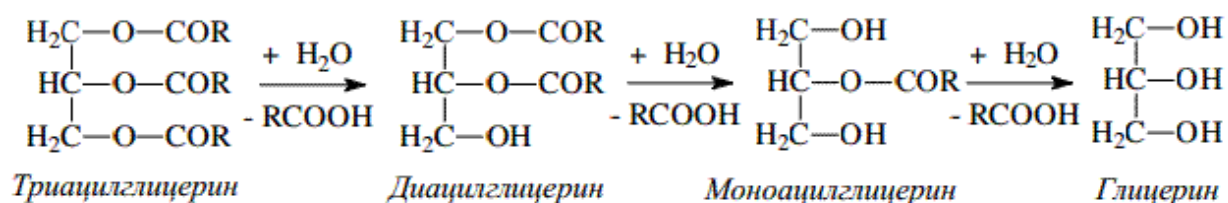
Цель: Установить значимость фермента животной липазы для процесса пищеварения. Освоить метод определения активности животной липазы.

Жиры, или триацилглицерины, практически не всасываются в пищеварительном тракте. В тонкой кишке происходит их гидролиз, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой.

Панкреатическая липаза поступает в кишечник в виде неактивного предшественника – пролипазы. В просвете кишечника происходит активация пролипазы путем образования комплекса с низкомолекулярным белком – колипазой. Последняя присоединяется к пролипазе в молярном отношении 2:1. В результате липаза становится активной и устойчивой к действию трипсина.

Активная липаза катализирует гидролиз эфирных связей в $\alpha(1)$ - и $\alpha'(3)$ -положениях, в результате образуется β -моноацилглицерол и освобождаются две жирные кислоты. В панкреатическом соке помимо липазы содержится моноглицеридная изомераза – фермент, катализирующий внутримолекулярный перенос ацила из β -положения моноацилглицерола в α -положение. А эфирная связь в α -положении чувствительна к действию панкреатической липазы.

Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, моноацилглицерины) всасываются в стенках кишечника. В процессе переваривания и всасывания липидов важную роль играют желчные кислоты. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов переваривания. Липаза один из ферментов подкласса 1 класса гидролаз. Ферменты, входящие в состав этого подкласса, действуют в присутствии воды на сложно-эфирные связи. Липаза катализирует гидролиз нейтрального жира.



Клинико – диагностическое значение:

Значительная часть населения страдает ожирением, которое, в свою очередь, провоцирует развитие болезней сердечно-сосудистой системы. Для лечения этих заболеваний необходимо понимание механизма их развития, что невозможно без знания нормальных процессов обмена липидов.

- Причиной расстройств метаболизма липидов в организме ча-

сто является нарушение их пищеварения и всасывания, что в значительной мере зависит от присутствия желчных кислот. Это сопровождается стеатореей (*повышенное выведения жиров из организма с калом*), развитием гиповитаминозов жирорастворимых витаминов.

Принцип метода: При воздействии липазы на эмульгированные жиры молока происходит их гидролиз. Гидролиз жира сопровождается образованием свободных насыщенных жирных кислот (пальмитиновая, миристиновая, стеариновая и т.д.), количество которых постоянно увеличивается. Их определяют титрованием NaOH в присутствии фенолфталеина, который при нейтрализации кислот приобретает слабо-розовый цвет.

Исследуемый материал: молоко, разведенное водой в соотношении 1:10

Реактивы: 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина; 0,01н раствор NaOH; Раствор панкреатина (6 мг/мл), содержащий липазу.

Оборудование: колбы конические на 100 мл, пипетки, пробирки, бюретки термостат

Ход работы.

(4 подгруппы)

1. Определяют кислотность молока

В конические колбы наливают 5 мл разбавленного молока (1:10), добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют 0,01н раствором NaOH по каплям из бюретки до появления слабо-розового цвета (НЕ ПЕРЕТИТРОВАТЬ!!!). При первом титровании нейтрализуются органические кислоты – молочная и другие, которые присутствуют в молоке до начала действия липазы. Данные 2 титрований записывают в таблицу.

2. Определение активности липазы

В 6 пробирок наливают по 5 мл разбавленного молока и 0,5 мл раствора панкреатина. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и ставят в термостат (температура 38 -40 °С). Каждые 10 мин. Из термостата вынимают по 2 пробирки, добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют 0,01н раствором NaOH по каплям из бюретки до появления слабо-розового цвета (интенсивность окраски должна быть одинаковой для всех проб). Данные титрования записывают в таблицу.

Промежуток времени	V (NaOH), мл		
	№1	№2	Средний
до начала гидролиза			
через 10 мин			
через 20 мин			
через 30мин			

На основании полученных данных изобразите графически динамику расщепления жира липазой, где по оси абсцисс откладывают время в мин., а по оси ординат – объемом 0,01н раствора NaOH, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный промежуток времени, после предварительного вычитания количества щелочи, израсходованной на титрование контрольной пробы.

Выразите активность липазы как концентрацию карбоксильных групп жирных кислот, образовавшихся в 100 мл молока за все время исследования, пользуясь следующей формулой:

$$C = \frac{4,5 \times C_{NaOH} \times \Delta V_{NaOH}}{V_{\text{молока}}}$$

где C - концентрация жирных кислот, образующихся в 100 мл молока (г/100мл); C_{NaOH} - концентрация раствора NaOH (0,01н); ΔV_{NaOH} – разность объемов раствора NaOH, израсходованный на титрование 5 мл молока за все время инкубации и контрольной пробы, мл; $V_{\text{молока}}$ - объем молока в титруемой пробе, (5мл).

Лабораторная работа № 13

Синтез и окисление жиров в организме

Цель.: ознакомиться с синтезом и окислением липидов в организме. Качественное определение кетоновых тел в моче, как метаболитов липидного обмена.

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.

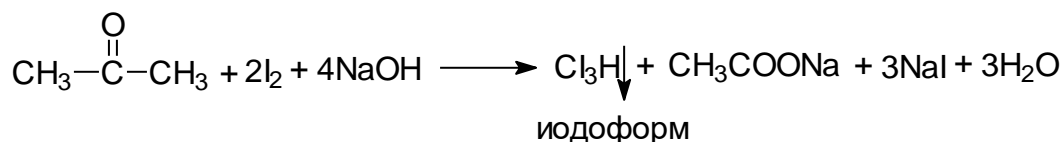
Ход работы. Взять 2 пробирки и внести по 2 мл в одну пробирку мочу из образца № 1, а в другую – из образца № 2. Добавить по 5 капель уксусной кис-

лоты и нитропрусида 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 ук-

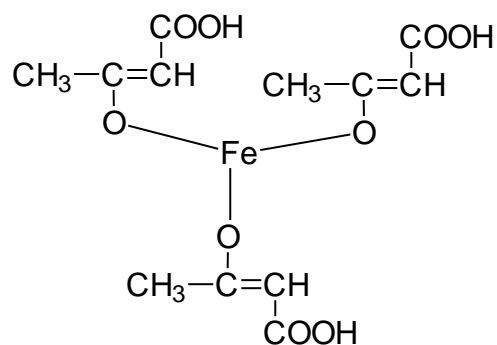


сусная кислота, реактив Люголя¹.

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 Легалья		
Проба Ланге		
Проба Либена		
Проба Гекхардта		

Практическое значение работы. При недостатке выработки инсулина развивается сахарный диабет, важнейшими биохимическими показателями которого являются:

- увеличение сахара в крови (гипергликемия),

¹ см. приложение

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

В норме пробы на кетоновые тела в моче отрицательны.

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 № 14

Всасывание и транспорт продуктов переваривания липидов. Липопротеины: образование и функции. Определение общего холестерина в сыворотке крови энзиматическим колориметрическим методом

1. Принцип метода основан на способности гепарина образовывать с ЛНП (□-липопротеинами) сыворотки крови комплекс, который под действием хлористого кальция выпадает в осадок. Степень помутнения раствора прямо пропорциональна концентрации ЛНП сыворотки крови.

Реактивы и оборудование: хлористый кальций, 0,025 М раствор; гепарин. Пипетка, микропипетки, ФЭК.

Исследуемый материал: сыворотка или плазма (ЭДТА без оксалата, цитрата или гепарина) крови.

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 (D1) на ФЭКе (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 (D2) в тех же условиях.

Содержание ЛНП в сыворотке крови рассчитать по формуле:

$$X = (D2 - D1) \times 11,65$$

где X – содержание ЛНП в г/л;

D2 и D1 – оптические плотности после и до добавления гепарина;

11,65 – эмпирический коэффициент перерасчета для выражения ЛНП в г/л.

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

Практическое значение работы: В норме содержание ЛНП в сыворотке крови составляет 3,6-6,4 г/л. Наиболее часто наблюдается увеличение содержания ЛНП. Повышение их количества тесно связано с повышенным содержанием холестерина в крови, так как холестерин входит в состав, главным образом ЛНП. Повышение ЛНП имеет место при первичной гиперлипопротеинемии типов IIa и IIb, заболеваниях, которые могут приводить ко вторичному повышению ЛНП: вторичная гиперлипопротеинемия при гипотиреозе, нефротический

синдром, заболевания печени, диабет, хроническая почечная недостаточность, синдром Иценго-Кушинга.

2.

Холестерин является в организме человека одним из основных липидов. По строению и свойствам его можно охарактеризовать как одноатомный циклический моновенасыщенный спирт, производный циклопентанпергидрофенантрена. Существует в организме в свободном состоянии и в виде эфиров с высшими жирными кислотами (олеиновой, линолевой, линоленовой и др.).

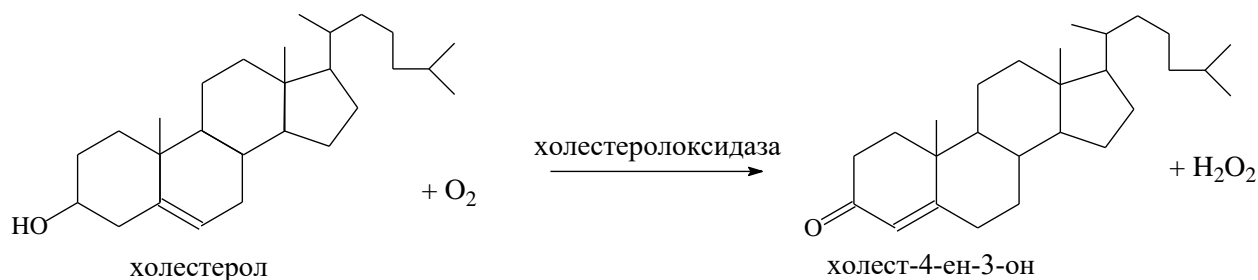
Важнейшее значение холестерина заключается в том, что он присутствует как обязательный компонент мембран всех клеток. В мембранах холестерин находится в свободном состоянии, в котором он проявляет амфифильные свойства, поэтому способен взаимодействовать с полярными фосфолипидами, составляющими основу мембран. Не менее важное значение холестерина в том, что он используется в качестве предшественника при биосинтезе стероидных гормонов (глюко- и минералкортикоидов, половых), витамина D₃, а также желчных кислот.

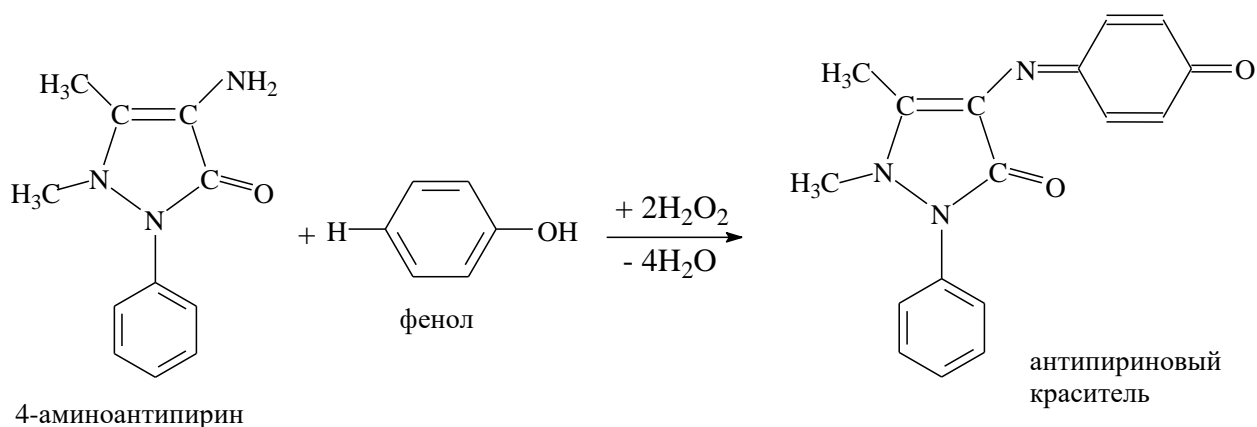
Одним из показателей, характеризующих состояние обмена ХС, является его количественное содержание в плазме крови. У взрослых здоровых людей оно равно 3,9-6,5 ммоль/л (1,5-2,5 г/л, 150-250 мг/100 мл).

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.

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.





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°C 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°C или 10 минут при 37°C. 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.

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.

Лабораторная работа № 15

Переваривание и всасывание белков в ЖКТ. Количественное определение кислотности желудочного сока

Желудочный сок представляет собой секрет желез слизистой оболочки желудка. Это прозрачная бесцветная жидкость резко кислой реакции (рН около 1,0). За сутки у человека выделяется около 1,5л желудочного сока. В состав желудочного сока входят вода, белки, ферменты (пепсин, гастриксин, липаза), муцин, соляная кислота, хлорид натрия, кислые фосфаты, гормон гастрин, глюкотеид, так называемый внутренний фактор Касла.

Соляная кислота вырабатывается обкладочными клетками желез желудка. При клиническом анализе желудочного сока определяют его кислотность и активность пепсина.

При определении кислотности желудочного сока различают *общую кислотность, общую соляную кислоту, свободную и связанную соляную кислоту*, содержание которых определяют с помощью кислотно-основного титрования 0,1 н раствором NaOH в присутствии различных индикаторов (фенолфталеина, метиленового оранжевого, ализаринсульфоновокислого натрия) по формуле:

$$C_{HCl} = V_{NaOH} \cdot n_{NaOH} \cdot 1000 / V_{ЖС} \text{ (ммоль/л)},$$

где V_{NaOH} - количество 0,1н раствора NaOH пошедшего на титрование, мл; $V_{ЖС}$ - количество желудочного сока, взятого для титрования, мл; n_{NaOH} - количество мг-экв щелочи в 1мл 0,1 н. раствора, ммоль (0,1 ммоль); 1000- пересчет на 1л.

Под *общей кислотностью* желудочного сока понимают сумму всех кислореагирующих веществ: свободная соляная кислота, кислые фосфаты. Общую кислотность желудочного сока определяют титрованием в присутствии индикатора фенолфталеина (зона перехода цвета рН 8,3-10,0; ниже 8,2 - бесцветный, выше 10,0-малиновый).

Содержание *свободной соляной кислоты* в желудочном соке определяют в присутствии индикатора метиленового оранжевого (зона перехода цвета рН 3,0-4,4; ниже 3,0 - розово-красный, выше 4,4-желтый). Свободная соляная кислота почти вся оттитровывается при рН 3,0; при этом окраска метиленового оранжевого изменяется от розово-красной до оранжевой. Слабые кислоты, например молочная, или кислые фосфаты и связанная соляная кислота при рН 3,0-4,4 находятся в растворе в недиссоциированном состоянии и в реакцию со щелочью не вступают.

Соляная кислота, называемая "*связанной*", находится в солеобразном состоянии с белками и продуктами их переваривания. Связанная соляная кислота желудочного сока определяется титрованием в присутствии индикатора ализаринсульфоновокислого натрия (зона перехода рН 3,7-5,2) или бромкризолового синего (зона перехода рН 3,8-5,4), желтый цвет которого переходит в фиолетовый, или по методу Михаэлиса.

Общая соляная кислота - сумма свободной и связанной соляной кислоты.

Показатели кислотности желудочного сока в норме у здоровых взрослых людей:

	Содержание, ммоль/л
Общая кислотность	40-60
Свободная HCl	20-40
Связанная HCl	10-20

Реактивы, оборудование и исследуемый материал:

1. NaOH, 0,1н. раствор.
2. HCl, 0,2% раствор.
3. Индикаторы: метилоранж, 0,5% спиртовой раствор; фенолфталеин, 0,5% спиртовой раствор.
4. Колбы для титрования.
5. Микробюретка.
6. Стеклянные палочки.
7. Пипетки вместимостью 5мл.
8. Желудочный сок.
9. фенол, 1% раствор.
10. FeCl₃ 1% раствор.

Порядок выполнения работы.

Метод Михаэлиса

Отмеряют пипеткой в колбу 5мл желудочного сока, добавляют 1 каплю метилоранжа и 2 капли фенолфталеина. При наличии в желудочном соке свободной соляной кислоты он окрашивается в красный цвет с розовым оттенком, при отсутствии ее сразу появляется желтая окраска.

Титруют свободную соляную кислоту 0,1н. раствором щелочи из микробюретки до появления оранжевого окрашивания и записывают результат (V_1). Не добавляя щелочи в бюретку, продолжают титрование до появления лимонно-желтого цвета и записывают результат (V_2 от нуля). Продолжают титровать до появления розового окрашивания (V_3 от нуля).

Расчет:

Свободная HCl	$C_{\text{HCl свобод}} = V_1 \times 20 \text{ (ммоль/л)}$
Общая кислотность	$C = V_3 \times 20 \text{ (ммоль/л)}$
Общая HCl	$C_{\text{HCl общ}} = \{(V_3 + V_2)/2\} \times 20 \text{ (ммоль/л)}$
Связанная HCl	$C_{\text{HCl связ}} = C_{\text{HCl общ}} - C_{\text{HCl свобод}}$

Клинико-диагностическое значение. При заболеваниях желудка кислотность может быть нулевой, пониженной и повышенной. При язвенной болезни желудка или гиперацидном гастрите происходит увеличение содержания сво-

бодной соляной кислоты и общей кислотности (гиперхлоргидрия). При гипацидном гастрите или раке желудка наблюдается уменьшение количества свободной соляной кислоты и общей кислотности (гипохлоргидрия). При раке желудка, хроническом гастрите отмечается полное отсутствие соляной кислоты и значительное снижение общей кислотности (ахлоргидрия). При злокачественном малокровии, при раке желудка наблюдается полное отсутствие соляной кислоты (ахилия).

Наряду с нормальными составными частями в желудочном соке при ряде заболеваний могут появиться другие вещества: молочная кислота, кровь, летучие жирные кислоты, желчные пигменты. В клинике часто исследуют эти вещества с помощью специальных реакций.

При ахлоргидрии наряду с молочной кислотой образуются летучие жирные кислоты (уксусная, масляная), так как под влиянием микроорганизмов в желудке развиваются процессы брожения. Кровь (кровяные пигменты) может попадать в желудочный сок при изъязвлении стенок желудка. Желчные пигменты появляются в желудке из двенадцатиперстной кишки вследствие антиперистальтики.

Обнаружение молочной кислоты по реакции Уффельманна

К реактиву Уффельманна (20 капель фенола, 1% раствор. И 2 капли FeCl_3 1% раствор – фиолетовый цвет) добавляют 5 капель желудочного патологического сока до появления желто-зеленого окрашивания (лактат железа).

Лабораторная работа № 16

Обмен некоторых аминокислот: серина, глицина, метионина, фенилаланина и тирозина. Количественное определение креатинина в сыворотке крови и моче

Цель: ознакомиться с обменом некоторых аминокислот и количественно определить креатинин в крови и моче.

Креатинин является одним из конечных продуктов азотистого обмена и нормальной составной частью мочи. За сутки с мочой выделяется креатинина у мужчин 8,8-17,7 ммоль (1-2 г/сут), а у женщин – 1,7-15,9 ммоль (0,8-1,8 г/сут). Креатинин - ангидрид креатина. Креатин содержится в мышцах (около 80%), особенно в сердечной, где из него при участии АТФ образуется макроэргическое соединение креатинфосфат, при распаде которого образуется креатинин и фосфат. Креатин в моче взрослого здорового человека отсутствует, появление его в моче называют креатурией. Однако у детей и подростков моча всегда содержит креатин.

Принцип метода. Креатинин при взаимодействии с пикриновой кислотой в щелочной среде образует окрашенные соединения, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации креатинина в моче и сыворотке крови.

Исследуемый материал: моча, сыворотка крови.

Реактивы: стандартный раствор креатинина (177 мкмоль/л), 2%-ный раствор пикриновой кислоты, 10%-ный раствор NaOH, 5%-ный раствор ТХУ, дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки, пипетки, ФЭК, кюветы.

ХОД РАБОТЫ. В трех пробирках смешивают реактивы по схеме:

Реактивы (мл)	Опытная проба	Стандарт	Контроль
Сыворотка	0,5	-	-
Дистиллированная вода	1	1	1,5
ТХУ	0,5	0,5	0,5
Стандартный раствор	-	0,5	-

Через 5 мин опытную пробу и стандартную пробы центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин. С надосадочной жидкостью готовят следующие пробы:

Реактивы (мл)	Опытная проба	Стандарт	Контроль
Надосадочная жидкость	1,0	1,0	1,0
Пикриновая кислота	0,5	0,5	0,5
NaOH	0,5	0,5	0,5

Перемешивают и через 20 мин колориметрируют опытную и стандартную пробы при зеленом светофильтре (540 нм) в кювете толщиной 0,5 см против контроля. Расчет проводят по формуле:

$$C \text{ (мкмоль/л)} = 177 \cdot A_{on} / A_{cm}.$$

Перед определением содержания креатинина мочу разводят в 100 раз. Это разведение учитывают при расчетах. В опытной пробе смешивают 0,5 мл мочи, 0,25 мл дистиллированной воды, 0,25 мл ТХУ, 0,5 мл пикриновой кислоты, 0,5 мл NaOH. Через 20 мин колориметрируют на зеленом светофильтре (длина волны 540 нм) в кювете толщиной 0,5 см против контроля, приготовленного в предыдущей работе. Рассчитывают концентрацию креатинина в моче по формуле с учетом ее разведения:

$$C \text{ (мкмоль/л)} = 50 \cdot 177 \cdot A_{on} / A_{cm}.$$

Содержание креатинина суточной мочи рассчитывают по формуле

$$C \cdot 1,5 / 1000 = \text{ммоль/сут},$$

где С – концентрация креатинина в моче в мкмоль/л; 1,5 – суточный диурез в литрах, 1000 – коэффициент перевода мкмоль в ммоль.

Норма креатинина в сыворотке крови – 53-106 мкмоль/л, в суточной моче – 4,4-17,6 ммоль/сутки.

Клиренс креатинина (его очищение рассчитывают по формуле

1,07 С /С ,

где 1,07 минутный диурез. В норме клиренс по креатинину составляет 80 – 120 мл/мин.

Клинико-диагностическое значение. Определение креатинина проводят для исследования функции почек. Содержание его в сыворотке крови увеличивается при значительном ухудшении функции почек. Креатинемия наблюдается также при закупорке мочевых путей, кишечной непроходимости, тяжелом диабете, механической желтухе, гипофункции надпочечников, голодании. Увеличение креатинина в моче наблюдается при усиленной мышечной работе, лихорадочных состояниях, пневмонии, выраженной недостаточной функции печени. Понижение креатинина в моче – при мышечной дистрофии, голодании, дегенерации почек, лейкемии. Расчет клиренса креатинина позволяет получить информацию об интенсивности основных функций фильтрации, реабсорбции, секреции и почечном кровообращении.

Лабораторная работа № 17

Распад и синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Определение мочевины в сыворотке крови фотометрическим методом или мочевой кислоты

Цель.: ознакомиться с синтезом и распадом пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов и определить содержание мочевой кислоты в сыворотке крови.

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

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы и оборудование: реактив Фолина; трихлоруксусная кислота, 20 %-ный раствор; карбонат натрия, насыщенный раствор; мочева кислота, стандартный раствор 0,02 г/мл, свежеприготовленный. Пробирки, пипетки вместимостью 0,5 – 2,0 мл, центрифуга, фотоэлектроколориметр.

Ход работы: в центрифужную пробирку вносят по 1,5 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 чистые пробирки – опытную и стандартную – добавляют в них реактивы в соответствии с таблицей.

Реактив	Опыт	Стандарт
Центрифугат, соответствующий 0,5 мл сыворотки	1,5 мл	-
Стандартный р-р мочевой кислоты	-	0,5 мл
Трихлоруксусная кислота	-	0,5 мл

Дистиллированная вода	-	0,5 мл
Насыщенный р-р карбоната натрия	0,7 мл	0,7 мл
Реактив Фолина (осторожно!)	1 капля	1 капля

Через 10 минут обе пробы фотометрируют против воды на ФЭКе при 510-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см.

Расчет проводят по формуле

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

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

Практическое значение работы. В норме содержание мочевой кислоты в сыворотке крови составляет у мужчин – 3-9 мг% (0,18-0,54 ммоль/л) и у женщин – 2,5-7,5 мг% (0,15-0,45 ммоль/л). Повышение содержания мочевой 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 мочевой кислоты при подагре, это сопровождается отложением солей мочевой кислоты в суставах и различных тканях организма. Понижение содержания мочевой кислоты в сыворотке крови отмечается при диете, бедной пуринами, ксантинурии, после приема аллопуринола, салицилатов (в больших дозах), клофибрата, азатиоприна.

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

Лабораторная работа № 18

Гормоны общие сведения. Качественные реакции на гормоны. Гормоны поджелудочной железы. Сахарный диабет: биохимические признаки. 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 Легалья.

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.

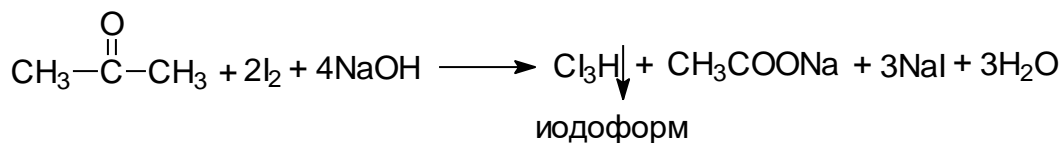
б) Проба Ланге.

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 ук-

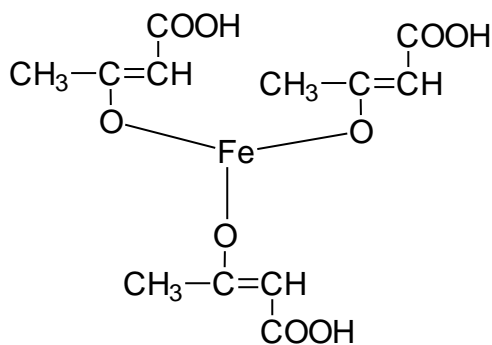


сусная кислота, реактив Люголя².

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).

² см. приложение

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 Легалья		
Проба Ланге		
Проба Либена		
Проба Гекхардта		

Практическое значение работы. 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.

В норме пробы на кетоновые тела в моче отрицательны.

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 № 19

Биохимические функции гормонов щитовидной железы, надпочечников, гипофиза и половых гормонов

Цель: ознакомиться с функциями гормонов щитовидной железы, надпочечников, гипофиза и половых гормонов. Изучить качественные реакции на гормоны тироксин и адреналин.

1. Тироксин можно обнаружить в препарате тиреоидина, получаемого из щитовидной железы крупного рогатого скота. Обнаруживают тироксин следующим образом – отщепляют от него с помощью кислотного гидролиза йодоводородную кислоту и переводят ее в свободный йод. Последний экстрагируют хлороформом, который окрашивается при этом в фиолетовый цвет.

Ход работ. В пробирку внести полтаблетки тиреоидина и 10 капель HNO_3 . Осторожно нагреть 1-2 мин. Затем добавить 20 капель 1% KIO_3 (иодат калия), перемешать и охладить. KIO_3 окисляет освободившуюся при гидролизе йодоводородную кислоту в свободный йод.



В пробирку добавить 1-2 мл хлороформа и хорошо встряхнуть. После отстаивания слой хлороформа (нижний) окрашивается в фиолетовый цвет.

2. Качественные реакции на адреналин

Раствор адреналина: (содержимое ампулы 0,1%) растворить в 100 мл воды.

Адреналин образуется из тирозина при участии метионина (донор метильной группы). При образовании адреналина кольцо тирозина превращается в пирокатехиновое кольцо (оно легко окисляется, образуя различные цветные соединения). Это и используется во многих цветных реакциях на адреналин.

1) Диазореакция. Ход работы. В пробирку поместить 3 капли 1% раствора сульфаниловой кислоты, 3 капли 5% раствора азотистокислого Na, 5 капель раствора адреналина (1:1000) и 3 капли 10% раствора углекислого Na. Жидкость окрашивается в красный цвет.

2) Реакция с йодатом калия. Ход работы. В пробирку внести 3 капли адреналина (1:1000), 2-3 капли 10% раствора KIO_3 и 2 капли 10% CH_3COOH . Жидкость слегка нагреть. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Результаты исследования гормонов оформить в виде таблицы:

Железа внутренней секреции	Гормон	Химическое строение	Метаболи- ческая роль	Употребля- емые реак- тивы	Получаемое окрашивание

3. *Определение концентрации адреналина*

Принцип метода. Метод основан на колориметрическом определении интенсивности синего окрашивания, которое образуется при взаимодействии адреналина с реактивом Фолина. Реактив Фолина состоит из солей фосфорновольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот. Эти соли при взаимодействии с фенолами восстанавливаются с образованием более низких окислов, комплексы которых окрашены в синий цвет.

Ход работы.

В сухую пробирку внести 1 мл исследуемого раствора, 4 мл 10% раствора Na_2CO_3 и 0,5 мл реактива Фолина. Содержимое встряхнуть. Через 3-5 мин появляется синяя окраска. Экстинкцию измерить на ФЭК против контроля (контроль – 1 мл H_2O , 4 мл 10% Na_2CO_3 и 0,5 мл реактива Фолина). Количество адреналина определить по калибровочной.

Калибровочная для определения адреналина

В мерную колбу емкостью 25 мл вносят точно 1 мл коммерческого адреналина. Доводят до метки водой. 1 мл стандартного раствора содержит 0,04 мг адреналина, что соответствует концентрации 4 мг%. Этот раствор разводят следующим образом:

Номера пробирок	Контроль	1	2	3	4
Стандартный раствор адреналина (мл)	0	1	0,75	0,5	0,25
H_2O (мл)	1	0	0,25	0,5	0,75
Концентрация адреналина (г/л)	0	0,04	0,03	0,02	0,01
Оптическая плотность раствора (E)					

Лабораторная работа №20

Биохимия органов и тканей. Количественное определение общего билирубина в сыворотке крови. Определение содержания свободного гидроксипролина в моче

Цель. Изучить такие показатели крови как содержание общего билирубина и гидроксипролина в сыворотке крови.

1. Определение содержание гидроксипролина.

Реактивы и оборудование: Сульфат меди (II), 0,01 М раствор; пероксид водорода, 6% раствор; серная кислота, 6 М раствор; реактив Эрлиха (5% раствор п-диметиламинобензальдегида в н-пропаноле и изопропаноле); гидроксид натрия, 2,5 М раствор. Штатив с пробирками, пипетки вместимостью 1 мл; стеклянные палочки; термостат; стакан со льдом (или снегом); водяная баня; ФЭК.

Материал. Моча, предварительно профильтрованная.

Метод 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.

Ход работы. В две пробирки вносят по 1 мл профильтрованной мочи, раствора сульфата меди (II), раствора гидроксида натрия и раствора пероксида водорода. Содержимое обеих пробирок перемешивают стеклянной палочкой в течение 5 мин, затем их ставят в термостат при 70° С на 5 мин, периодически встряхивая до полного прекращения выделения пузырьков. Затем пробы охлаждают в воде со льдом или снегом. К охлажденным пробам 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 с, а контрольную – на то же время в воду со льдом или снегом.

Измеряют экстинкцию опытной и контрольной проб против воды на ФЭ-Ке при зеленом светофильтре 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), а в пять других (стандартные пробы) – по 1 мл раствора гидроксипролина с концентрацией его 1, 10, 15, 20 и 25 $\mu\text{g}/\text{vkl}$.

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

Расчет производят по формуле

$$X = \frac{E \cdot V}{1000},$$

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;

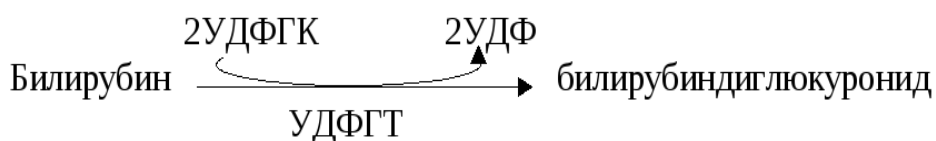
1000 – коэффициент перерасчета микрограммов в миллиграммы.

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 зависит, 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/сутки, или 7,6-61,0 мкмоль/сутки. Повышенное выделение его с мочой отмечается при повреждении соединительной ткани, сопровождающемся распадом коллагена (например, при ревматизме, системной склеродермии, поражении костной системы и др.). Динамическое наблюдение за экскрецией гидроксипролина с мочой может дать информацию о формировании рубца в постинфарктном очаге миокарда.

2. Определение общего билирубина в сыворотке крови.

Билирубин – продукт ферментативного окисления гемоглобина (конечный продукт распада гема), образующийся в результате естественного распада эритроцитов в клетках РЭС, относится к группе желчных пигментов. Билирубин – вещество токсичное, т.к. молекула билирубина является гидрофобной и может проникать в клетки головного мозга. Поэтому в организме человека существуют реакция обезвреживания билирубина, которая протекает в печени.



где УДФГК – кофермент уридиндифосфат глюконовой кислоты, УДФГТ – фермент уридиндифосфатглюкуронилтрансфераза.

Билирубиндиглюкуронид экскретируется с желчью в ЖКТ, где высвобождается из конъюгата, восстанавливается до уробилиногена, затем превращается в стеркобилиноген, в форме которого и выводится из организма человека.

Принцип метода: в основе определения билирубина лежит реакция азосочетания билирубина с диазосмесью Эрлиха, в результате которой появляется малиновокрасная окраска за счет образующегося азобилирубина. Концентрация последнего определяется фотокolorиметрически.

Билирубиндиглюкуронид реагирует с диазосмесью непосредственно (□ прямой билирубин □ по старой терминологии), тогда как свободный билирубин неустойчив в растворе в сильно кислой среде, при которой происходит реакция азосочетания и требует присутствия стабилизатора, роль которого могут играть кофеин, спирт, мочеви́на, ацетат, бензонат натрия и др. (□ не прямой билирубин □).

Реактивы и оборудование:

1. Химические пробирки, бюретки, пипетки на 10мл и 1 мл; 2. Раствор сульфаниловой кислоты 0,5%; 3. Раствор нитрита натрия 0,5% (готовится ежедневно); 4. Кофеиновый реактив: кофеина чистого 5г, бензойнокислого натрия – 37,5г, уксуснокислого натрия – 62,5г, растворяются при нагревании: раствор доводится дистиллированной водой до 1л; 5. Сыворотки крови с различными концентрациями билирубина.

Ход работы: в химическую пробирку из бюреток отмеривают 1 мл сыворотки и 2,5 мл кофеинового реактива. Диазосмесь готовят в одной пробирке на всю группу следующим образом: 10 мл 0,5% раствора сульфаниловой кислоты и 0,25мл 0,5% нитрита натрия отмеривают пипеткой в пробирку из склянки на столе преподавателя. Готовую диазосмесь отмеривают пипеткой по 0,5мл в каждую пробу с сывороткой. Содержимое пробирки перемешивают и ставят на 20 минут в темноту, затем фотометрируют с зеленым светофильтром (длина волны 530 нм), в кюветах 10 мм против контрольной пробы, в которой вместо сыворотки используют 1 мл дистиллированной воды.

Расчет по формуле

$$X = (6,34 \cdot D) - 0,05 = \text{мг\%} \cdot 17,1 = \text{мкмоль/л}$$

где D – оптическая плотность

0,05 – поправка на окраску диазосмеси с кофеиновым реактивом

17,1 – коэффициент перерасчета в единицах СИ

$$D_1 = X_1 =$$

$$D_2 = X_2 =$$

Вывод:

Клинико-диагностическое значение определения общего билирубина в сыворотке крови

В крови здорового человека уровень общего билирубина равен 8,5 – 20,5 мкмоль/л (0,4 – 0,8 мг/дл), причем около 75% этого количества приходится на долю – непрямого билирубина – (6,4 – 15,4 мкмоль/л).

Повышение содержания общего билирубина более 20,5 мкмоль/л называется гипербилирубинемией и является симптомом различных физиологических и патологических состояний. Гипербилирубинемия более 30–35 мкмоль/л сопровождается желтушной окраской склер и кожных покровов.

Физиологическая гипербилирубинемия □ это так называемая неонатальная физиологическая желтуха новорожденных. Общий билирубин повышен за счет неконъюгированного (непрямого) билирубина, что является следствием с одной стороны интенсивного гемолиза эритроцитов, содержащих фетальный гемоглобин (HbF), а с другой стороны, следствием незрелости гепатоцитов по захвату, конъюгации и экскреции конъюгированного билирубина.

Патологическая гипербилирубинемия может быть вызвана различными причинами, например:

- гемолитическая гипербилирубинемия (гемолитическая желтуха) является следствием массивного гемолиза эритроцитов. Общий билирубин повышен за счет неконъюгированного (непрямого) билирубина, при возможном повышении и конъюгированного (прямого) билирубина. В свою очередь причины гемолиза делятся на биологические (малярия, переливание крови несовместимой по группе или резус-фактору) и химические (действие сильных окислителей и других тиоловых ядов, врожденные заболевания с гемолизом, например гемоглобинопатии (серповидноклеточная анемия) и энзимопатии (в частности по глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе и метгемоглобинредуктазе).

- врожденная неконъюгированная гипербилирубинемия (врожденная негемолитическая желтуха) является следствием метаболического дефекта в конъюгации билирубина за счет отсутствия или крайней низкой активности УДФГТ, что наблюдается при синдроме Клиглера□Найяра и синдроме Жильбера. Общий билирубин повышен за счет неконъюгированного (□непрямого□) билирубина.

- токсическая гипербилирубинемия (паренхиматозная желтуха) является следствием поражения клеток печени вирусами (вирус гепатита А, В, С, Д, цитомегаловирус), гепатотропными ядами (хлороформ, четыреххлористый углерод, трихлорэтилен, галотан, ацетаминофен (парацетомол), изониазид, рифампицин, □-аманитин (токсин бледной поганки) и др.), а также имеет место при циррозе печени (синдром гепатоцеллюлярной недостаточности). Общий билирубин повышен преимущественно за счет неконъюгированного (непрямого) билирубина. Конъюгированный (прямой) билирубин может быть в норме или повышен (при цитолизе).

- конъюгированная гипербилирубинемия (обтурационная, холестатическая желтуха) является следствием механического препятствия оттоку желчи, что наблюдается при желчно-каменной болезни (калькулезный холецистит) и при наличии опухоли, перекрывающей желчевыводящие пути (опухоль главного желчевыводящего протока, опухоль головки поджелудочной железы и др.). Общий билирубин повышен за счет конъюгированного (прямого) билирубина.

- врожденная конъюгированная гипербилирубинемия (хроническая идиопатическая желтуха) является следствием дефекта в экскреции конъюгированного билирубина в желчь. Наблюдается при синдроме Дубина-Джонсона. Общий билирубин повышен за счет прямого билирубина. При гистологическом исследовании ткани печени выявляется меланоз с неидентифицированным пигментом.

- врожденная конъюгированная гипербилирубинемия (хроническая негемолитическая желтуха) предположительно является следствием нарушения экскреторной функции печени, наблюдается при синдроме Ротора, при гистологическом исследовании ткани печени патологических изменений не находят.

Неконъюгированный билирубин может проходить гематоэнцефалический барьер в случае его повышенного содержания в крови и приводить к поражению мозга (ядерная желтуха). Для предотвращения развития энцефалопатии применяют индукторы УДФГТ (фенобарбитал, люминал), например для коррекции состояния у недоношенных новорожденных детей.