

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

БИОХИМИЧЕСКИЙ ПРАКТИКУМ

Пособие для самостоятельной аудиторной работы студентов,
обучающихся по специальности 020400.62 – Биология,
профиль Микробиология
Часть 1

УФА
2014

УДК 577(07)
ББК 28.072я7
Б 63

Рецензенты:

Доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии
ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия»
Минздрава России *В.Е. Высокогорский*

Доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой биологической химии
ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России *В.Э. Цейликман*

Биохимический практикум: пособие для самостоятельной аудиторной работы студентов, обучающихся по специальности 020400.62 – Биология, профиль Микробиология. Ч. 1. / Ф.Х. Камилов, Ш.Н. Галимов, Э.Ф. Аглетдинов, О.А. Князева, Г.М. Абдуллина, Н.Т. Карягина, А.А. Байгильдина, А.Г. Валиев, Ф.А. Сагидуллин, И.Г. Кулагина, Р.С. Кидрасова, И.А. Меньшикова, Э.Р. Бикметова. – Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2014 – 110 с.

Пособие подготовлено в соответствии с требованиями ФГОС ВПО специальности 020400.62 – Биология, профиль Микробиология и на основании рабочей программы дисциплины биологическая химия данной специальности (2014 г.). Пособие предназначено для организации самостоятельной работы студентов в аудиторное время по дисциплине биологическая химия и направлено на привитие биохимических знаний, умений и навыков.

В пособие включены алгоритмы выполнения лабораторных работ, необходимые для расчетов формулы, химизм реакций, а также сведения по клинико-диагностической интерпретации полученных результатов, что имеет непосредственное отношение к формируемым в процессе изучения дисциплины биологическая химия профессиональным компетенциям. Приведенные лабораторные работы охватывают все разделы теоретического курса – статическую, динамическую биохимию, а также профильные разделы по различным направлениям подготовки.

Рекомендовано в печать по решению Координационного научно-методического совета и утверждено решением Редакционно-издательского совета ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России.

УДК 577(07)
ББК 28.072я7

© ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	6
Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории.....	9
Принцип работы с центрифугой.....	11
Правила работы на фотоэлектроколориметре.....	12
Прибор для электрофореза.....	13
Примеры оформления результатов и выводов по выполненным лабораторным работам.....	16
ВВЕДЕНИЕ В ЭНЗИМОЛОГИЮ.....	17
Химическая природа белков.....	17
Работа 1. Биуретовая реакция.....	17
Работа 2. Определение общего белка в сыворотке крови биуретовым методом (с помощью стандартного раствора).....	18
Работа 3. Количественное определение белка в сыворотке крови (слюне) биуретовым методом (метод калибровочного графика).....	19
Работа 4. Количественное определение альбумина в сыворотке крови... ..	21
Физико-химические свойства белков.....	22
Работа 5. Высаливание белков сыворотки крови.....	22
Работа 6. Осаждение белков при нагревании.....	24
Работа 7. Осаждение белков солями тяжелых металлов.....	25
Работа 8. Осаждение белков органическими кислотами.....	26
Работа 9. Осаждение белков концентрированной азотной кислотой (проба Геллера).....	26
Работа 10. Количественное определение белка в моче по методу Робертса – Стольников – Брандберга.....	27
Работа 11. Очистка белков от низкомолекулярных примесей методом диализа.....	28
Работа 12. Очистка от низкомолекулярных примесей методом гельфильтрации на сефадексе (молселекте).....	30
Работа 13. Разделение и количественное определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге.....	32
Структурно-функциональное разнообразие белков.....	35
Работа 14. Выделение муцина слюны и определение в нём углеводного и белкового компонентов.....	35
Работа 15. Выделение нуклеопротеинов в гидролизате дрожжей.....	37

Работа 16. Выделение и определение фосфопротеинов (казеина) из молока.....	39
Работа 17. Проба Тейхмана на гемоглобин.....	40
Работа 18. Количественное определение содержания гемоглобина в крови.....	41
Работа 19. Качественное открытие липопротеинов.....	42
Общие свойства ферментов.....	43
Работа 20. Сравнение действия ферментов и минеральных катализаторов.....	43
Работа 21. Определение специфичности действия ферментов.....	44
Работа 22. Определение термолабильности ферментов на примере амилазы слюны.....	45
Работа 23. Определение влияния реакции среды на активность ферментов и определение оптимума рН для α -амилазы слюны.....	46
Кинетика ферментативных реакций.	
Количественное определение активности некоторых ферментов.....	48
Работа 24. Количественное определение активности амилазы слюны по Вольгемуту.....	48
Работа 25. Количественное определение амилазной активности мочи.....	49
Работа 26. Количественное определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу <i>p</i> -нитрофенилфосфата (метод Бессей-Лоури-Брока).....	50
Регуляция активности ферментативных реакций.	
Изоферменты, мультиэнзимные комплексы.....	52
Работа 27. Определение влияния активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны.....	52
Работа 28. Определение конкурентного торможения сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой.....	53
Работа 29. Фотоколориметрический метод исследования активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови по Севелу и Товареку.....	55
Контрольные вопросы к разделам «Введение в энзимологию», «Механизмы регуляции ферментов».....	57
ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ.....	59
Биологическое окисление. Общие пути катаболизма.....	59
Работа 30. Количественное определение пировиноградной кислоты в моче.....	59
Работа 31. Обнаружение сукцинатдегидрогеназы в мышечной ткани.....	60
Работа 32. Обнаружение в ткани цитохромоксидазы.....	62

Работа 33. Определение активности пероксидазы в растительном материале по методу А.Н.Бояркина.....	62
Контрольные вопросы к разделу «Биологическое окисление. Общие пути катаболизма».....	65
ВИТАМИНЫ	66
Работа № 34. Качественное открытие витамина А в рыбьем жир.....	66
Работа № 35. Качественное открытие витамина Д в рыбьем жире.....	67
Работа № 36. Качественная реакция на витамин Е с азотной кислотой....	68
Работа № 37. Качественная реакция на викасол с щелочным.....	69
Работа № 38. Качественные реакции на витамин РР.....	69
Работа № 39. Реакция восстановления рибофлавина.....	70
Работа № 40 . Качественная реакция на витамин В ₆	71
Работа № 41. Определение тиамин и рибофлавина флуориметрическим методом в поливитаминных препаратах.....	71
Работа № 42. Количественное определение аскорбиновой кислоты по Тильмансу.....	73
Работа № 43. Количественное определение витамина Р в чае по Левенталю.....	77
Контрольные вопросы к разделу «Витамины».....	79
Рекомендуемая литература.....	80
Список использованной литературы.....	82
Приложения.....	84

ВВЕДЕНИЕ

Основная цель практикума – развить у студента творческое отношение к работе, навыки самостоятельно проводить биохимический анализ и критически оценивать наблюдаемые явления и факты, показать значение биохимических методов анализа для клинической практики.

В практикум включены 74 качественных и количественных анализов. При его составлении авторы стремились к тому, чтобы подбор лабораторных работ соответствовал требованиям программы и учебному плану высшего профессионального медико-биологического образования.

Внимание авторов также было сконцентрировано на том, чтоб предлагаемые работы могли быть выполнены в течение времени, обычно отводимого для занятия по биологической химии, с максимальной возможностью применения современных методов биохимического анализа. Так, включены некоторые методы «сухой» химии, унифицированные методы определения основных биохимических констант с использованием реагентов тест-наборов. При составлении работ учитывали также возможность их выполнения с помощью доступного оборудования и с минимальным количеством реагентов.

В основу практикума положен опыт преподавания курса биологической химии в Башкирском государственном медицинском университете. Использован также опыт проведения лабораторных занятий других вузов. В практикуме приведено большее количество работ, чем это предусматривается учебными программами по отдельным специальностям. Это обстоятельство даёт возможность выбора проведения лабораторного анализа, необходимого для усвоения учебной дисциплины.

Краткие теоретические сведения, перечень оборудования и реактивов, подробное описание манипуляций по ходу работы имеют цель помочь студенту по возможности самостоятельно выполнить каждую из них, понять целесообразность определения того или иного показателя. При подготовке к занятию студент должен ознакомиться с принципом (химизмом) соответствующего метода качественного или количественного анализа, а при выполнении работы

отмечать в рабочей тетради наблюдаемые изменения, оценивать полученный результат. Крайне важно, чтоб студент усвоил важнейшие биохимические нормативы. Информация о нормальных значениях этих показателей и причинах возможных отклонений поможет правильно трактовать биохимические сдвиги в организме. Не менее важно, чтоб студент получил представления о молекулярном уровне основ жизни вообще и человеческой, в частности, вызвать его интерес к одному из важнейших разделов современной биологии и побудить будущего специалиста постоянно углублять свои знания и представления о сути биохимических изменений при той или иной патологии, осмысленно подходить к её устранению.

Таким образом, пособие способствует формированию у студентов ряда общекультурных и профессиональных компетенций при выполнении ими самостоятельной аудиторной работы.

Компетенции, формируемые у студентов специальности 020209 Микробиология:

1. ОК-1 Способность и готовность следовать этическим и правовым нормам в отношении других людей и в отношении природы, иметь четкую ценностную ориентацию на сохранение природы и охрану прав и здоровья человека.

2. ОК-5 Способность и готовность использовать в своей деятельности нормативные правовые документы (по предмету Биохимия – данная компетенция отсутствует).

3. ОК-6 Способность и готовность использовать в познавательной и профессиональной деятельности базовые знания в области математики и естественных наук, применять методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования.

4. ОК-16 Способность качественно выполнять работу.

5. ОК-18 Способность работать как самостоятельно, так и в команде.

6. ПК-1 Способность и готовность демонстрировать базовые представления о разнообразии биологических объектов понимать значение биоразнообразия для устойчивости биосферы.

7. ПК-2 Способность и готовность использовать методы наблюдения, описания, идентификации, классификации биологических объектов.

8. ПК-3 Способность и готовность демонстрировать знания структурной и функциональной организации биологических объектов и механизмов гомеостатической регуляции, применять основные физиологические методы анализа и оценки состояния живых систем.

9. ПК-4 Способность и готовность демонстрировать знание принципов клеточной организации биологических объектов, биохимических основ, мембранных процессов и молекулярных основ жизнедеятельности.

10. ПК-5 Способность и готовность применять современные экспериментальные методы работы с биологическими объектами в лабораторных условиях, навыки работы с современной аппаратурой.

11. ПК-6 Способность и готовность представлять современные представления о геномике и протеомике.

12. ПК-15 Способность и готовность использовать современную аппаратуру и оборудование для выполнения лабораторных биологических работ.

Биохимические методы анализа широко используются в клинической практике и научно-исследовательской деятельности для получения определенной информации о химических процессах, протекающих в организме в физиологических условиях и при развитии патологических состояний.

При выполнении представленных в биохимическом практикуме работ студенты овладеют специальными приёмами и подходами обработки биохимического материала в зависимости от целей исследования. Прежде чем приступить к изучению конкретных методов исследования, необходимо ознакомиться с рядом общих положений практической биохимии.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Для обеспечения безопасности труда в биохимической лаборатории следует руководствоваться международными стандартами надлежащей лабораторной практики (GLP, Good Laboratory Practice), а также общегосударственными законами и ведомственными документами по технике безопасности при проведении работ в лаборатории.

Для ознакомления с правилами безопасного проведения работ организуется проведение инструктажа по технике безопасности, результаты которого заносятся в специальный журнал.

Во время работы в лаборатории следует соблюдать меры предосторожности, придерживаясь следующих правил.

Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде. Работать допускается только в специальном халате, так как есть вероятность порчи и загрязнения одежды при попадании на неё едких реактивов. Халаты должны быть достаточно длинными и застегиваться полностью. Рукава должны плотно охватывать запястья.

Во время работы следует соблюдать порядок, чистоту и аккуратность. Вся посуда, содержащая реактивы, должна быть маркирована этикетками. Все работы можно проводить только в чистой посуде. Все опыты с ядовитыми и неприятно пахнущими веществами проводить в вытяжном шкафу. Наливать или насыпать реактивы следует только над столом. Не следует оставлять открытыми банки с реактивами.

Запрещается пробовать на вкус любые реактивы, пить и есть в лаборатории.

При работе с приборами и аппаратами следует руководствоваться инструкциями и правилами. Запрещается прикасаться к движущимся и вращающимся частям используемого оборудования.

Нюхать вещества можно, лишь осторожно направляя на себя пары легким движением руки, но, ни в коем случае не наклоняясь к пробирке и не вдыхая пары (газы) полной грудью.

Наполнение пипеток растворами проводят только при помощи груши. Категорически запрещается затягивать реактивы в пипетки ртом.

Не загрязнять реактивы во время работы (не путать пробки от склянок, содержащих разные реактивы; избыток взятого реактива не выливать обратно в склянку; пользуясь пипеткой, набирать каждый реактив только предназначенной для этого пипеткой, ни в коем случае не путать их).

Перед тем как зажечь спиртовку, убедиться в том, что поблизости нет горючих жидкостей. Зажигать спиртовку можно только спичкой. В пробирке жидкость должна занимать не более $1/3$ объема пробирки. При нагревании жидкости держать пробирку отверстием в сторону от себя и тех, кто находится рядом, не касаться пробиркой горящего фитиля, всегда соблюдать большую осторожность при нагревании, не допускать выплескивания жидкости (время от времени отводить пробирку от пламени, не нагревать ее в вертикальном положении). После нагревания следует сразу затушить спиртовку, накрыв пламя колпачком.

Работа с водяной баней осуществляется только под тягой.

Запрещается выливать в раковины концентрированные растворы щелочей и кислот, органические растворители, легковоспламеняющиеся, горючие и взрывоопасные вещества, щелочные металлы. Все указанные отходы должны обязательно собираться в специальные ёмкости (слив).

В случае попадания на кожу концентрированной кислоты облитое место нужно промыть большим количеством воды, а затем разбавленным раствором соды. При попадании растворов щелочей на кожу на пораженное место положить ватку смоченную раствором марганцовокислого калия.

Закончив работу, привести рабочее место в порядок.

А вот как трактовал правила техники безопасности академик Михаил Григорьевич Воронков, он называл их «Правилами выживания в химической лаборатории»:

- Если вы откупорили что-либо - **закупорьте**.
- Если в руках у вас жидкое - **не разлейте**, порошкообразное - **не рассыпьте**, газообразное - **не выпустите наружу**.

- Если включили - **выключите**.
- Если открыли - **закройте**.
- Если разобрали - **соберите**.
- Если вы не можете собрать - **позовите на помощь умельца**.
- Если вы не разбирали - **не вздумайте собирать**.
- Если вы одолжили что-либо - **верните**.
- Если вы не пользуетесь чем-либо - **держите в порядке**.
- Если вы привели что-либо в беспорядок - **восстановите как было**.
- Если вы сдвинули что-либо - **верните на место**.
- Если вы хотите воспользоваться чем-либо, принадлежащим другому, **попросите разрешения**.
- Если вы не знаете, как это действует, - **не трогайте**.
- Если вас что-то не касается - **не вмешивайтесь**.
- Если не знаете, как делать, - **сразу спросите**.
- Если вы горите на работе, **постарайтесь, чтобы у вас ничего не загорелось**.
- Если у вас что-либо взорвалось, **проверьте, остались ли вы живы**.
- Если не усвоили этих правил, **не входите в лабораторию**.

Принцип работы с центрифугой

Центрифугирование - метод разделения жидких дисперсных сред на компоненты под воздействием центробежной силы.

При отделении осадка от раствора с помощью центрифуги (рис. 1.) перед работой необходимо ознакомиться с техническим описанием и инструкцией по эксплуатации центрифуги и соблюдать следующие правила:

Рабочая поверхность должна быть ровной и твердой. Не используйте центрифугу на неровной или наклонной рабочей поверхности.

Снять крышку с центрифуги и поместить в противоположащие гнезда уравновешенные пробирки с разделяемой смесью. При работе на центрифуге следует использовать только специальные центрифужные (конические) пробирки! Закрывать центрифугу крышкой, установить необходимую скорость центрифуги-

рования и включить центрифугу переключателем. После окончания центрифугирования выключить центрифугу, дождаться её полной остановки и лишь после этого открыть крышку. Запрещается включать центрифугу с открытой крышкой и останавливать центрифугу рукой или каким-либо предметом! Вынуть пробирки с отделенными осадками из центрифуги.

В случае ненормальной работы центрифуги (удары, вибрация, посторонний шум и т.д.) её необходимо остановить и сообщить преподавателю или лаборанту. Запрещается работать на неисправной центрифуге.



Центрифуга ЕВА-20 настольная
(Германия)



ЦЛМН-Р10-01-«Элекон»
(Россия)

Рис. 1. Виды лабораторных настольных центрифуг.

Правила работы на фотоэлектроколориметре

Фотоэлектроколориметр (рис. 2) предназначен для измерения оптической плотности или светопропускания жидких растворов по отношению к растворителю или стандартному раствору. В основе работы этого прибора лежит принцип уравнения интенсивности двух световых пучков, проходящих через оптические среды, при помощи переменной щелевой диафрагмы. Световые лучи от лампы, отразившись от зеркал, проходят через светофильтры, кюветы и попадают на фотоэлементы, которые подключены к гальванометру.

ФЭК включить в сеть за 15 минут до начала измерений. Во время прогрева кюветное отделение должно быть открыто. Установить необходимый для измерения светофильтр. Установить минимальную чувствительность колори-

метра, для этого ручку «чувствительность» установить в положение «1», ручку «установка грубо» - в крайнее левое положение. В световой пучок поместить кювету с контрольным раствором, по отношению к которому производятся измерения, в другое отделение поместить кювету с исследуемым раствором. Закрыть крышку кюветного отделения. Ручками «чувствительность» и «установка грубо и точно» установить отсчет 100 по шкале колориметра. Ручка «чувствительность» может находиться в одном из трех положений: «1», «2» или «3». Затем, поворотом ручки кювету с контрольным раствором заменить кюветой с исследуемым раствором. Снять отсчет по шкале колориметра, соответствующий коэффициенту пропускания исследуемого раствора в единицах оптической плотности. Измерение проводить 2-3 раза и окончательное значение измеренной величины определить как среднее арифметическое из полученных значений. Прибор после окончания работы выключить. Осторожно промыть кюветы.

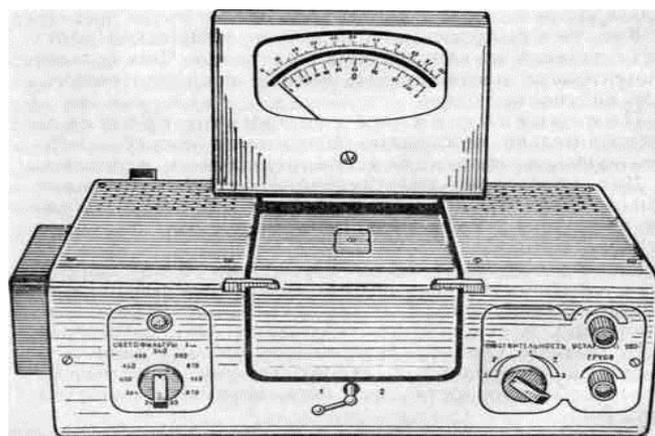


Рис. 2. Фотоэлектроколориметр КФК-2.

Прибор для электрофореза

Электрофорез - это движение заряженных частиц в поле постоянного электрического тока. Положительно заряженные частицы движутся к катоду, отрицательно заряженные – к аноду. В биохимической практике электрофорез используется как метод разделения белков, аминокислот, нуклеиновых кислот и других соединений, содержащих ионизируемые группы.

Устройство прибора для электрофореза. Прибор состоит из выпрямителя, подающего постоянный ток необходимого напряжения, и камеры для электрофореза. Сама камера состоит из 2-х ванн; в одной из них имеется неподвижная перегородка, куда помещается платиновый электрод (анод), а в другой находится электрод из нержавеющей стали (катод). Между ваннами, заполненными соответствующим буфером, имеется соединительный мост, на который помещают полоски специальной фильтровальной бумаги или другого носителя (рис. 3).

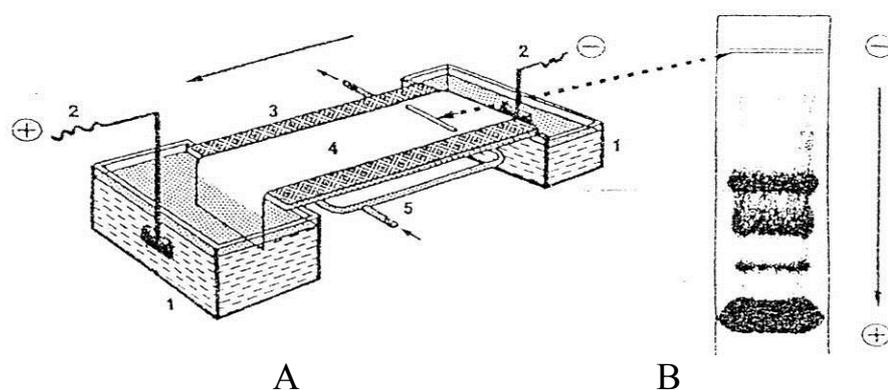


Рис. 3. Схема устройства камеры для электрофореза белков на бумаге (А) и внешний вид электрофореграммы (В):

1- ванна для буферного раствора, 2- электроды, 3- жесткая опора для поддерживающей среды-носителя, 4-носитель (целлюлоза, бумага и др.), 5- циркуляционная система охлаждения.

Проведение электрофореза. Заполняют обе ванны камеры раствором соответствующего буфера. Буферного раствора в ваннах должно быть столько, чтобы он покрывал неподвижную перегородку, но был ниже подвижных перегородок.

Вставляют в ванны электроды. Вырезают из фильтровальной бумаги или другого носителя полосы необходимого размера в зависимости от величины камеры (обычно шириной 4-6 см) и простым карандашом отмечают место, на которое впоследствии будет наноситься разделяемая смесь (старт). Смачивают эти полосы буфером, и на заранее отмеченные участки бумаги наносят разделяемую смесь со стороны катода или анода в зависимости от заряда частиц.

После нанесения на полосы разделяемой смеси камера герметично закрывается крышкой. На крышке камеры расположен прижим блокировки, слу-

жащий для включения камеры. Присоединенный выпрямитель, подает к камере постоянный ток от 2 до 4 мА при постоянном напряжении 110-160 В. Электрофорез проводят при градиенте потенциала от 3 до 8 В на 1 см полосы при комнатной температуре. Хорошее разделение происходит за 18-20 часов.

Выключение прибора и выявление полученных фракций. Выключают прибор. Снимают камеры и извлекают бумажные полосы из прибора. Затем каждую полоску помещают в сушильный шкаф на 20 минут при температуре 105⁰С. При этом происходит фиксация полученных фракций на бумаге. Проявление электрофореграмм производят путем окраски соответствующим красителем. Окраску белков проводят раствором бромфенолового синего в течение 30 минут, затем промывают электрофореграммы 2% раствором уксусной кислоты. Полученные электрофореграммы сушат на воздухе. Белковые фракции окрашиваются в сине-зеленый цвет.



Рис. 4. Современные приборы для подсчета содержания белковых фракций сыворотки крови.

Примеры оформления результатов и выводов по выполненным лабораторным работам

Студентам рекомендуется вести запись в отдельной тетради, которая предназначена для выполнения заданий при самостоятельной подготовке к занятию, оформления протоколов лабораторных работ. К концу каждого лабораторного занятия студент обязан представить преподавателю протокол занятий, включающий следующие разделы: тема занятия; цель занятия; результаты выполнения заданий при самостоятельной подготовке к занятию; принцип метода, порядок выполнения (кратко) лабораторного анализа качественного или количественного, результат анализа и вывод, объясняющий полученный результат.

Пример оформления качественного анализа.

Работа № 4. Выделение и определение фосфопротеинов (казеина) из молока.

Результат: 1. Выпадение хлопьевидного осадка. При проведении биуретовой реакции отмечается фиолетовая окраска. 2. При проведении молибденовой пробы с гидролизатом казеина выпал осадок лимонно-желтого цвета.

Вывод: 1. Казеиноген выпал в осадок при достижении ИЭТ. Положительная биуретовая реакции подтверждает белковую природу казеиногена. 2. Казеиноген является сложным белком – фосфопротеином, что подтверждается положительной молибденовой пробой на фосфорную кислоту с гидролизатом казеина.

Пример оформления количественного анализа.

Работа № 7. Количественное определение белка в сыворотке крови (слюне) биуретовым методом (метод калибровочного графика).

Результат: E (экстинкция исследуемого раствора) = 0,25.

По калибровочному графику содержание белка в сыворотке крови соответствует – 54 г/л.

Вывод: Содержание белка в сыворотке крови – 54 г/л, что соответствует гипопроteinемии, которая может наблюдаться при потерях белка организмом (кровотечения, нефротический синдром, энтероколиты, ожоги, асцит), при белковом голодании (кахексия) или снижении процессов биосинтеза белка (цирроз печени, мальабсорбция), а также при повышении распада белка (интоксикации, злокачественные новообразования, травма, лихорадка, гипертиреоз, сепсис).

ВВЕДЕНИЕ В ЭНЗИМОЛОГИЮ

Химическая природа белков

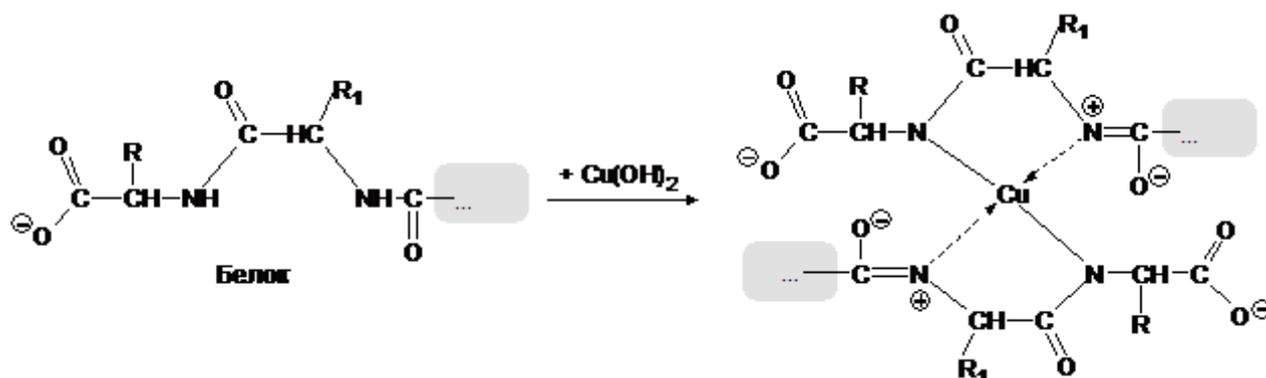
Белки – важнейшая и необходимая составная часть всех живых организмов. Это сложные высокомолекулярные соединения, состоящие из аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. При полном гидролизе белков образуется смесь аминокислот.

Реакции на присутствие белка основаны на наличии в нем отдельных химических групп и на его физико-химических свойствах. Ряд цветных реакций на белок направлены на обнаружение той или иной аминокислоты, входящей в состав белка. Поэтому для установления наличия белка недостаточно какой-либо одной реакции. Известные реакции обнаружения белков и пептидов можно разделить на следующие группы: 1) реакции на пептидную связь, характерную для белков и пептидов; 2) реакции на α -аминогруппу или α -карбоксыльную группу, которую дают аминокислоты и некоторые другие соединения; 3) реакции на боковые радикалы или отдельные аминокислоты. В клинической практике с диагностической целью важно знать количество белка в крови, моче, слюне, спинномозговой жидкости.

Цветные реакции на белки

Работа № 1. Биуретовая реакция.

Принцип метода: реакция основана на способности пептидной группы белков и полипептидов образовывать с ионами меди в щелочной среде комплексные соединения фиолетового цвета. Реакция позволяет обнаружить наличие пептидной группы: $-\text{CO}-\text{NH}-$ в исследуемом веществе и, следовательно, является универсальной реакцией для обнаружения веществ белковой природы. Свое название реакция получила от производного мочевины биурета, который дает в данных условиях то же окрашивание, что и белок. Окрашивание появляется за счет образования медной комплексной соли следующего строения:



Оборудование: штатив с пробирками, пипетки капельные (глазные).

Реактивы:

1. Яичный белок, 1 % раствор;
2. NaOH, 10 % раствор;
3. CuSO₄, 1 % раствор.

Ход работы: в пробирку внести 5 капель 1 % раствора яичного белка, 3 капли 10 % раствора NaOH, 1 каплю 1 % раствора CuSO₄, перемешать. Отметить появление сине-фиолетового окрашивания.

Вывод.

Работа № 2. Определение общего белка в сыворотке крови биуретовым методом (с помощью стандартного раствора).

Принцип метода: в щелочной среде белок образует с ионами меди комплексное соединение фиолетового цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации белка в пробе (сыворотка крови, плазма, слюна).

Оборудование: штатив с пробирками, микропипеты – дозаторы, наконечники, пипетки на 1 или 2 мл, кюветы толщиной 3 мм или 5 мм, ФЭК.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы:

- 1) реагент - биуретовый реактив, готовый к использованию.
- 2) калибратор – калибровочный раствор альбумина, 70 г/л, готовый к использованию.

Ход работы:

Отмерить	Опытная проба	Стандартная проба
Калибратор	-	0,02 мл
Сыворотка крови	0,02 мл	-
Реагент	1 мл	1 мл

Пробы перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре (18-25С°). Измерить оптическую плотность опытной ($E_{оп}$) и стандартной ($E_{ст}$) проб против реагента.

Расчет: концентрацию белка (С) в пробе в г/л рассчитать по формуле:

$$C = E_{оп} / E_{ст} \times 70,$$

где 70 – концентрация белка в калибраторе, г/л.

Нормальные величины: в сыворотке крови - 65-85 г/л.

Вывод.

Работа № 3. Количественное определение белка в сыворотке крови (слюне) биуретовым методом (метод калибровочного графика).

Принцип метода: одним из методов количественного определения суммарного белка сыворотки крови является биуретовый, который основан на способности белков, содержащих пептидные связи, образовывать с ионами меди в щелочной среде комплексное соединение фиолетового цвета (см. работу 1). Интенсивность окраски пропорциональна содержанию белка в растворе.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки на 0,1 мл и на 5 мл, калибровочный график для определения белка в сыворотке крови (слюне) биуретовым методом, ФЭК, кюветы толщиной 10 мм.

Исследуемый материал: сыворотка крови (слюна).

Реактивы:

1. Хлорид натрия, 0,9 % раствор (физиологический раствор)*.
2. Биуретовый реактив*.

Ход работы: в пробирку налить 0,1 мл исследуемой сыворотки (слюны), в другую (контрольную) пробирку – 0,1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. В обе пробирки добавить по 5,0 мл биуретового реактива. Содержимое обеих пробирок перемешать. Через 30 мин измерить экстинкцию исследуемого рас-

твор на ФЭКе в кювете толщиной 10 мм при длине волны 540-560 нм (зеленый светофильтр) против контрольного раствора.

Содержание белка в сыворотке крови (в г/л) найти по калибровочному графику, который построен с заранее известными концентрациями стандартного белка и выражает зависимость между количеством белка в пробе и оптической плотностью (экстинкцией) окрашенного раствора.

Построение калибровочного графика.

Для этого применяют стандартный белок – альбумин сыворотки крови. Из 10 % стандартного раствора альбумина в четырех пробирках готовят растворы белка (см. таблицу).

№ Пробирки	Стандартный 10 % р-р 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 30 мин измеряют экстинкцию на ФЭКе против контрольного раствора (0,1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия и 5 мл биуретового реактива).

Полученные экстинкции откладывают на оси ординат, а концентрацию белка (г/л) на оси абсцисс.

Клинико-диагностическое значение. Сыворотка крови содержит смесь белков, различных по физиологическому значению, структуре и физико-химическим свойствам. Нормальное содержание белка в сыворотке крови 65-85 г/л, у детей до 6 месяцев 48-56 г/л. Нормальное содержание белка в слюне 0,5-4 г/л. Изменение содержания белка в сыворотке крови может свидетельствовать о различных нарушениях. Снижение содержания белка (гипопротеинемия) может наблюдаться при потерях белка организмом (кровотечения, нефротический синдром, энтероколиты, ожоги, асцит), при белковом голодании (кахексия) или при снижении процессов биосинтеза белка (цирроз печени, мальабсорбция), при повышении распада белка (интоксикации, злокачественные новообразова-

ния, травма, лихорадка, гипертиреоз, сепсис). Повышенное содержание белка (гиперпротеинемия) бывает редко, это может быть при сгущении крови из-за значительной потери жидкости (длительная рвота, ожоговая болезнь), при наследственных заболеваниях – парапротеинемиях.

Вывод.

Работа № 4. Количественное определение альбумина в сыворотке крови.

Принцип метода. При взаимодействии альбумина с красителем бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде образуется комплекс зеленого цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации альбумина в пробе.

Оборудование: ФЭЖ, микропипетки-дозаторы, наконечники, штатив с пробирками, кюветы толщиной слоя 3 мм, пипетки объемом 1 мл или 2 мл.

Реактивы: – набор реагентов «Альбумин-Ново» ЗАО «Вектор-Бест».

Состав:

Реагент (Р) – раствор бромкрезолового зеленого в сукцинатном буфере, готовый к использованию.

Калибратор – калибровочный раствор альбумина, 40 г/л, готовый к использованию.

Исследуемый материал. Негемолизированная сыворотка, гепаринизированная или ЭДТА – плазма крови.

Ход работы. Добавить в две пробирки реагенты согласно таблице:

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба
Калибратор	-	0,01
Проба (сыворотка, плазма)	0,01	-
Реагент	1,0	1,0

Перемешать, выдержать несколько минут, измерить оптическую плотность опытной (А) и калибровочной (К) проб против реагента.

Измерить в кюветах с длиной оптического пути 3 или 5 мм при длине волны 628 (578-640) нм. Окраска стабильна в течение 2-х часов.

Расчет. Концентрация альбумина в пробе (С) в г/л рассчитать по формуле:

$$C = A / K \cdot 40$$

Норма содержания альбумина сыворотки крови: 37-53 г/л.

Клинико - диагностическое значение. Основные функции альбумина: связывание и транспорт некоторых катионов, малых и больших анионов, жирных кислот, билирубина, витамина С, лекарств, ксенобиотиков; поддержание постоянства коллоидно-осмотического (онкотического) давления и обеспечение клеток аминокислотами. Время полужизни - 15-20 дней. Гипоальбуминемия наблюдается при: а) снижении его синтеза в печени (цирроз печени, недоедание (кахексия), синдром мальабсорбции); б) повышении катаболизма (травма, инфекция, сепсис, лихорадка, гипоксия, синдром Кушинга, гипертиреоз, гиперкортицизм, злокачественные опухоли); в) аномальных потерях (шок, кровотечение, энтероколиты, нефротический синдром); г) патологическом распределении (после оперативных вмешательств, при ожогах, токсикозе, асците, плеврите).

Гиперальбуминемия наблюдается при остром обезвоживании, при приеме анаболических стероидов.

Вывод.

Физико-химические свойства белков

Особенности структурной организации молекул белка определяют их физико-химические свойства, которые отсутствуют у полипептидов. Эти особенности лежат в основе многих методов и приемов, применяемых в экспериментальной биохимии, биохимических лабораториях клиник и производств, в фармацевтической практике.

Работа № 5. Высаливание белков сыворотки крови.

Принцип метода: реакция высаливания обусловлена дегидратацией макромолекул белка с одновременной нейтрализацией электрического заряда солями щелочных и щелочноземельных металлов. Высаливание белков сернокислым аммонием широко используется для разделения белков друг от друга и получения их в кристаллическом виде. Например, глобулины сыворотки крови, имеющие большую молекулярную массу и меньший заряд легче высаливаются, чем альбумины. Глобулины осаждаются в полунасыщенном, а альбумины в насыщенном растворе сернокислого аммония.

Высаливание – обратимый процесс. Осадок белка может вновь раствориться в воде после уменьшения концентрации солей путем добавления воды. При этом белок сохраняет свои естественные биологические свойства.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки на 0,5 мл и на 2 мл, фильтры обеззоленные, воронка.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы:

1. Сернокислый аммоний ((NH₄)₂SO₄), насыщенный раствор*.
2. Сульфат аммония сухой.
3. NaOH, 10 % раствор.
4. CuSO₄, 1 % раствор.

Ход работы. 1. В пробирку налить 2 мл сыворотки крови и прибавить равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония, перемешать.

2. Получается полунасыщенный раствор сульфата аммония, в котором наблюдают выпадение осадка белков – глобулинов.

3. Через 5-6 минут осадок отфильтровать в чистую пробирку.

4. В фильтрат для высаливания альбуминов добавить тонко измельченный сухой сульфат аммония до полного насыщения, т.е. до тех пор, пока новая порция порошка не перестает растворяться. Выпадает осадок альбуминов.

5. Выпавший осадок альбуминов отфильтровать, проверить фильтрат на отсутствие белка с помощью биуретовой реакции. Для этого к 0,5 мл фильтрата добавить 10 капель 10 % раствора NaOH и 1-2 капли 1 % раствора CuSO₄.

Оформление работы. Результат оформить в виде таблицы.

Высаливающий материал	Степень насыщения (NH₄)₂SO₄	Осаждаемая фракция белков

Клиническое значение и практическое применение. В клинических лабораториях метод высаливания используют для разделения и определения соотношения альбуминов и глобулинов. В нормальных условиях это соотношение колеблется в пределах 1,5-2,3 и изменяется при патологии печени, почек, воспалительных и других заболеваниях, сопровождаются диспротеинемией.

Вывод.

Работа № 6. Осаждение белков при нагревании.

Принцип метода: при нагревании в нейтральной или слабокислой среде почти все белки денатурируют и переходят в нерастворимое состояние. Для большинства белков изоэлектрическая точка соответствует слабокислой среде (рН около 5,0). Наиболее полная и быстрая коагуляция имеет место в изоэлектрической точке. В сильно кислых и сильно щелочных растворах белок приобретает высокий заряд и не выпадает в осадок. Для разных белков различна температура свертывания. Некоторые из них выдерживают даже продолжительное кипячение, тогда как другие коагулируют при 50-55°.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки капельные (глазные) и на 1,0 или 2,0 мл, спиртовка, держатели для пробирок.

Реактивы:

1. Яичный белок, 1 % раствор.
2. Уксусная кислота, 1 % раствор.
3. Уксусная кислота, 10 % раствор.
4. Хлорид натрия, насыщенный раствор.
5. NaOH, 10 % раствор.

Ход работы:

1. В 5 пробирок налить по 0,5 мл раствора белка.
2. Нагреть содержимое первой пробирки. Наблюдать выпадение осадка белка.
3. Во вторую пробирку добавить каплю 1 % раствора уксусной кислоты и нагреть. Осаждение происходит быстрее и полнее, т.к. молекула белка находится в изоэлектрическом состоянии.
4. В третью пробирку прибавить 1-2 капли (0,5 мл) 10 % раствора уксусной кислоты и нагреть. Белок не осаждается даже при кипячении, поскольку белки в кислой среде приобретают положительный заряд, что придает им устойчивость.
5. В четвертую пробирку добавить 1-2 капли (0,5 мл) 10 % раствора уксусной кислоты и несколько капель насыщенного раствора хлорида натрия, нагреть. Белок выпадает в осадок, т.к. лишается гидратной оболочки.

6. В пятую пробирку прилить несколько капель (0,5 мл) 10 % раствора гидроксида натрия и нагреть. Осадок белка не образуется даже при кипячении, поскольку белки приобретают отрицательный заряд.

Оформление работы. Полученные результаты оценить и внести в таблицу, сделать выводы. Записать в таблицу результаты осаждения белка при кипячении: появление осадка «+», а отсутствие «-». В каждом случае указать причины появления или отсутствия осадка белка.

Нейтральная	Слабокислая	Сильнокислая	Сильнокислая с электролитом	Щелочная среда

Вывод:

Работа № 7. Осаждение белков солями тяжелых металлов.

Принцип метода: белки из растворов осаждаются солями тяжелых металлов при небольших концентрациях этих солей. Ионы тяжелых металлов связываются с функциональными группами радикалов аминокислот в молекуле белка. В результате разрушается пространственная структура молекулы и денатурированный белок осаждается. При добавлении избытка солей тяжелых металлов (кроме AgNO_3 и HgCl_2) происходит адсорбция ионов металла, белок приобретает заряд, и происходит растворение первоначально образовавшегося осадка. Способность белка прочно связывать ионы тяжелого металла в виде нерастворимых осадков в воде, позволяет использовать их как противоядие при отравлении солями ртути, меди, свинца и других тяжелых металлов.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки капельные (глазные).

Реактивы:

1. Яичный белок, 1 % раствор.
2. Уксуснокислый свинец, 5 % раствор.
3. CuSO_4 , 5 % раствор.

Ход работы: в две пробирки налить по 5 капель раствора белка. Затем в первую пробирку прибавить 2 капли 5 % раствора уксуснокислого свинца, во вторую - 2 капли 5 % раствора сернокислой меди. Отметить появление осадка. Доба-

вить избыток солей и отметить растворение осадков денатурированного белка.

При оформлении работы в выводе отметить причину денатурации.

Вывод.

Работа № 8. Осаждение белков органическими кислотами.

Принцип метода: некоторые органические кислоты способны нейтрализовать заряд молекулы белка и разрушить ее пространственную структуру. Это вызывает необратимое осаждение (денатурацию) белков. Практическое применение получили трихлоруксусная и сульфосалициловая кислоты. Сульфосалициловой кислотой пользуются в клинике для обнаружения малых количеств белка в биологических жидкостях. А трихлоруксусной кислотой в целях получения безбелкового фильтрата при определении низкомолекулярных азотистых соединений (пептидов, аминокислот, мочевины, нуклеотидов и др.).

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки на 1 мл.

Реактивы:

1. Яичный белок, 1 % раствор.
2. Сульфосалициловая кислота, 10 % раствор.
3. Трихлоруксусная кислота, 5 % раствор.

Ход работы: к 1мл раствора белка добавить равный объем 10 % раствора сульфосалициловой кислоты или 5 % раствора трихлоруксусной кислоты. Отметить выпадение белого осадка.

Вывод.

Работа № 9. Осаждение белков концентрированной азотной кислотой (проба Геллера).

Принцип метода: выпадение белка в осадок при действии некоторых минеральных кислот связано с дегидратацией белковых частиц, образованием комплексных солей с кислотами, с разрушением пространственной структуры (денатурацией) молекулы белка.

В избытке всех минеральных кислот, за исключением азотной, выпавший осадок белка растворяется из-за образования избытка положительного заряда.

Поэтому реакция осаждения белков азотной кислотой используется при клинических исследованиях мочи (проба Геллера).

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки капельные глазные.

Реактивы:

1. Яичный белок, 1 % раствор;
2. Азотная кислота, концентрированная.

Ход работы: в пробирку налить 10 капель концентрированной азотной кислоты. Осторожно по стенке пробирки, наклонив ее под углом 45° так, чтобы обе жидкости сразу же не смешивались, наслоить равный объем раствора белка. На границе двух жидкостей отметить образование осадка в виде белого кольца.

Вывод.

Работа № 10. Количественное определение белка в моче по методу Робертса-Стольников-Брандберга.

Принцип метода: в основе метода лежит проба Геллера – денатурация белка азотной кислотой. Экспериментально установлено, что при наслаивании на азотную кислоту раствор, содержащий 0,0033 % белка, дает белое колечко в промежутке между второй и третьей минутами после наслаивания. Если колечко появляется непосредственно после наслаивания раствора, содержащего белок, на азотную кислоту, то путем последовательного разведения исследуемого материала достигают такого максимального разведения, при котором появляется кольцо между второй и третьей минутами. Умножая разведение на 0,0033 %, получают процентное содержание белка в моче.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки на 1 или 2 мл.

Исследуемый материал: моча.

Реактивы:

1. Азотная кислота, концентрированная.

Ход работы: приготовить 2 ряда пробирок (по 8 в каждом). Во все пробирки первого ряда прилить по 1 мл концентрированной азотной кислоты.

В пробирках второго ряда развести исследуемую мочу методом кратных разведений. Для этого в первую и во вторую пробирку второго ряда налить по 1 мл исследуемой мочи, во вторую и все последующие - по 1 мл дистиллированной воды.

После перемешивания из второй пробирки перенести 1мл жидкости в третью, затем после перемешивания такой же объем из третьей пробирки перенести в четвертую и т.д. до конца ряда. Из последней пробирки 1мл жидкости вылить. Таким образом, получается следующий ряд разведений исследуемой мочи: в первой пробирке моча исходной концентрации, во 2-ой – разведена в 2 раза, в 3-ей – в 4 раза, в 4-ой – в 8 раз, в 5-ой - в 16, в 6-ой - в 32, в 7-ой – в 64, в 8-ой – в 128.

После разведения мочи произвести поочередное наслаивание содержимого каждой пробирки на концентрированную азотную кислоту. По секундомеру отметить, в какой пробирке белое кольцо образовалось между 2-ой - 3-ей минутами после начала опыта.

Расчет. Между 2-ой и 3-ей минутами белое кольцо образовалось в 5-ой пробирке, где разведение мочи 1:16.

Следовательно, концентрация белка в исходной порции мочи равна:

$$0.0033 \% \times 16 = 0,05 \%$$

Клинико-диагностическое значение. Моча здоровых людей содержит небольшое количество белка (20-30 мг в суточном количестве мочи), не выявляемые обычными методами исследования. Физиологическая протеинурия встречается при беременности, после физических нагрузок.

При ряде заболеваний количество белка в моче увеличивается (протеинурия), поэтому его определение имеет большое клиническое значение. Протеинурия наблюдается при заболеваниях почек, сопровождающихся структурно-функциональными нарушениями гломерулярных мембран (нефриты, нефрозы, преэклампсии, системные заболевания соединительной ткани, нефротическом синдроме, диабетической и гипертензивной нефропатии).

Вывод.

Работа № 11. Очистка белков от низкомолекулярных примесей методом диализа.

Принцип метода: диализ демонстрирует макромолекулярную природу белков. Диализ основан на способности малых по геометрическим размерам молекул (кристаллоидов) диффузно проникать через полупроницаемые мембраны, а мак-

ромолекул (коллоидов) – не проникать. Белки являются высокомолекулярными веществами и не диффундируют через полупроницаемые мембраны (например, коллодиевую или целлофановую пленки). Это свойство белков лежит в основе очистки белков от низкомолекулярных органических и неорганических примесей. Основанный на этом же принципе метод гемодиализа, применяют для лечения больных с почечной недостаточностью (аппарат «искусственная почка»). С этой целью применяют диализатор или электродиализатор. Простейшим диализатором является сделанный из коллодия или целлофановой пленки мешочек, наполненный раствором белка и погруженный в стакан с дистиллированной водой.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки капельные (глазные) и на 1 и 5 мл, целлофановый или коллодиевый мешочки, стакан с дистиллированной водой.

Исследуемый материал: сыворотка крови (или 1 % раствор яичного белка).

Реактивы:

1. Азотная кислота, 10 % раствор.
2. Азотнокислое серебро, 1 % раствор.
3. NaOH, 10 % раствор.
4. CuSO₄, 1 % раствор.
5. NaCl, 6 % раствор.

Ход работы: в подготовленный целлофановый (коллодиевый) мешочек добавить 1 мл сыворотки крови (раствор яичного белка) и 3-4 мл 6 % раствора хлористого натрия, аккуратно поместить их в стеклянный стакан с дистиллированной водой. Через 30-60 минут с небольшими порциями диализуемого раствора белка (содержимое мешочка) и диализата (наружная жидкость) провести пробы на хлориды и белок, чтоб удостовериться в том, что соль диффундировала, а белок остался в мешочке.

Биуретовая реакция (см. работу №1.) Определяют, содержит ли исследуемый раствор белок. Для этого к 5 каплям раствора добавить 10 капель 10 % раствора NaOH, одну каплю 1 % раствора CuSO₄ и полученную смесь тщательно перемешать. Появление красно-фиолетовой окраски свидетельствует о наличии в растворе белка.

Обнаружение хлоридов: к 0,5-1 мл раствора добавить 1-2 капли 1% раствора азотной кислоты и 1-2 капли 1% раствора азотнокислого серебра. Отме-

тить выпадение творожистого осадка при наличии хлоридов.

Оформление работы. Результат оформить в виде таблицы, отметив знаками « + » или « - » наличие реакции.

Изучаемые компоненты	До диализа		После диализа	
	Жидкость из стаканчика	Жидкость из мешочка	Жидкость из стаканчика	Жидкость из мешочка
Белок				
Cl ⁻				

Вывод.

Работа № 12. Очистка от низкомолекулярных примесей методом гельфильтрации на сефадексе (молселекте).

Принцип метода. Основным свойством декстранового геля, как хроматографического материала, является способность разделять вещества согласно размерам молекул. Крупные молекулы при хроматографии не проникают в частицы геля и элюируются в свободном объеме, т.е. в свободном пространстве между частицами геля. Применяя сефадексы (молселекты) разных типов с разными размерами частиц и изменяя условия хроматографии гель-фильтрацию на сефадексах (молселектах) можно использовать для разделения смесей в зависимости от молекулярной массы, для определения чистоты веществ, а также в целях обессоливания и концентрирования растворов высокомолекулярных соединений и др.

Расчеты показывают, что на сефадексе Г-25 (молселекте Г-25) молекулы массой 5600 и более будут элюировать в свободном объеме, а соли и органические вещества с молекулярной массой в пределах 1000 проникают в частицы декстранового геля и задерживаются. Это позволяет сравнительно легко отделить с помощью сефадекса Г-25 (молселекта Г-25) соли и низкомолекулярные органические примеси из растворов белков и других молекул.

Оборудование: колонка с гелем; пипетки капельные (глазные) и на 1 мл, штатив с пробирками.

Реактивы:

1. Гемоглобин, 2% раствор.
2. Хлорид натрия, 3% раствор.

3. Азотнокислое серебро, 1 % раствор.

4. Дистиллированная вода.

Ход работы. Для проведения работы открыть подготовленную колонку, дать профильтроваться воде над слоем геля и наслоить пипеткой 1-1,5 мл 2 % раствора гемоглобина или другого окрашенного белка с равным объемом 3 % раствора хлористого натрия. Как только раствор профильтруется (войдет в гель), ополоснуть стенки колонки небольшим количеством дистиллированной воды и начать элюирование дистиллированной водой со скоростью тока примерно 0,5 мл в минуту. Элюаты объемом 2,5-3 мл собирать в отдельные пробирки. Через 12-15 минут элюирование прекратить, в исходном растворе белка и в отдельных фракциях элюата проверить наличие белка по окраске содержимого пробирок и наличие хлоридов реакцией с азотнокислым серебром (см. выполнение предыдущей работы).

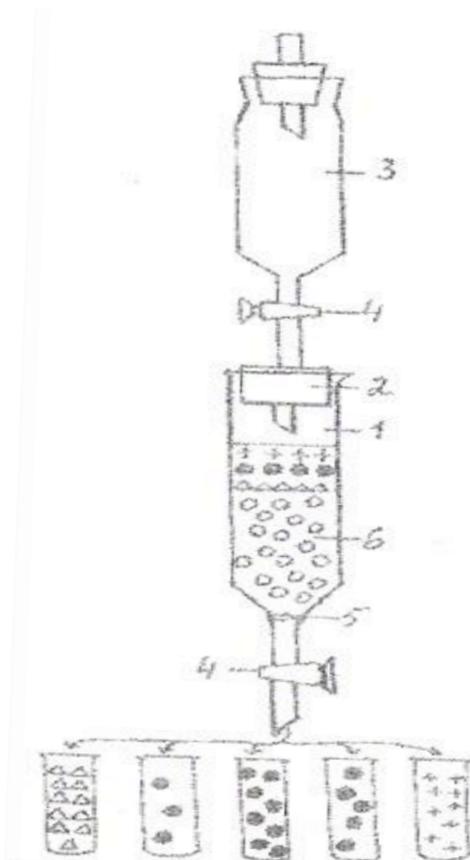


Рис. 5. Схема устройства для гель-фильтрации: 1-колонка; 2-пробирка со стеклянной трубкой; 3-капельница, содержащая элюирующий раствор; 4-зажим; 5-кружок фильтровальной бумаги; 6-поверхность суспензии геля; 7-изотонический раствор NaCl; 8-смесь фракционируемых веществ.

▲ - вода; • - Hb; + - изотонический раствор NaCl; о - молселект.

Оформить протокол в виде таблицы, отметив знаками « + » или « - » наличие или отсутствие хлоридов и белка.

Определяемый компонент	№ пробирок				
	1	2	3	4	5
NaCl					
Гемоглобин					

Вывод.

Работа № 13. Разделение и количественное определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге.

Принцип метода. Под электрофорезом понимают способность заряженных частиц в растворе двигаться в поле постоянного электрического тока. Скорость перемещения молекул белков в электрическом поле зависит от величин заряда, молекулярной массы, условий опыта (рН и ионная сила раствора). Разделение белков производится в специальном аппарате для электрофореза, используя специальную фильтровальную бумагу или целлюлозу (описание прибора на стр. 7).

Белки сыворотки крови, обладающие зарядом, помещаются на полоску бумаги, смоченную буферным раствором, через которую пропускают постоянный электрический ток. При рН 8,6 все белки сыворотки крови заряжаются отрицательно и под воздействием электрического поля перемещаются к аноду.

Сыворотка крови человека характеризуется многообразием белков. С помощью электрофореза на бумаге они делятся на фракции: альбумины, α_1 -, α_2 -, β -, γ - глобулины.

Оборудование: прибор для электрофореза; сушильный шкаф; ФЭК или денситометр, дистиллированная вода.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы:

1. Вероналовый буфер с рН 8,6*.
2. Раствор бромфенолового синего.

3. Носитель: бумага, целлюлоза.
4. Уксусная кислота, 2 % раствор.
5. NaOH, 0,01 н раствор*.

Ход работы. Проведение электрофореза описано на стр. 7.

Количественное определение белковых фракций на электрофореграмме можно установить двумя способами: путем элюирования краски и фотоколориметрирования и денситометрическим методом.

Колориметрический метод. Окрашенные белковые пятна вырезают, краситель элюируют 0,01 н раствором щелочи. Интенсивность окраски каждой фракции определяют колориметрически на ФЭКе и по экстинкциям отдельных пятен производят расчет процентного содержания фракций.

Денситометрический метод. В специальном аппарате (денситометре) через электрофореграмму пропускают пучок света, поглощение которого зависит от оптической плотности окрашенных белковых пятен. Свет, прошедший через электрофореграмму, улавливается фотоэлементом и превращается в электрический ток, колебания которого фиксируются на бумажном листе в виде кривой, каждый пик кривой соответствует определенной белковой фракции.

Сумма экстинкций или площади денситом берётся за 100 % и производится расчет процентного соотношения белковых фракций.

Протеинограмма здорового человека – процентное распределение белков сыворотки крови.

Содержание белковых фракций сыворотки крови, полученное с помощью электрофореза на бумаге, в среднем составляет у взрослого человека:

- альбумины 55,4-65,9 %
- α_1 -глобулины 3,4-4,7 %
- α_2 -глобулины 5,5-9,5 %
- β -глобулины 8,9-12,6 %
- γ -глобулины 13-22,2 %

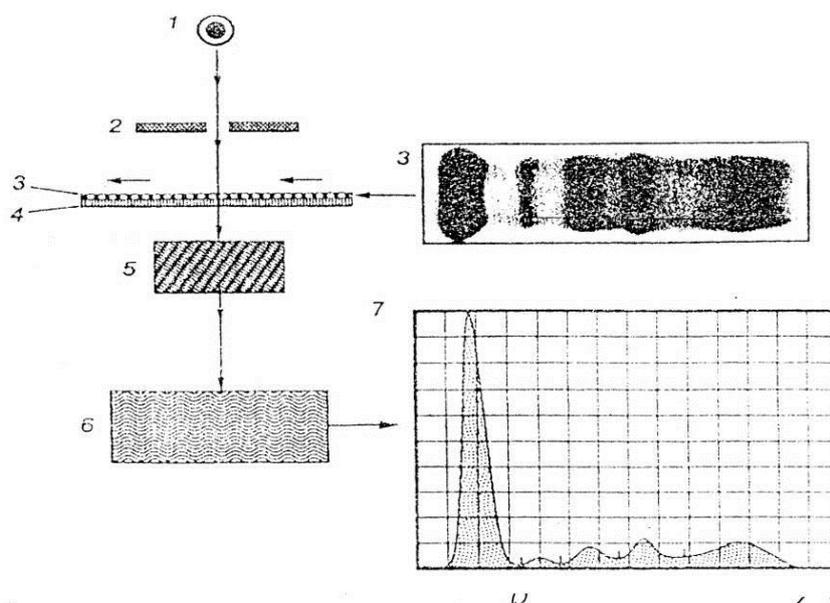


Рис.6. Схема устройства и принцип работы регистрирующего денситометра: 1- источник света, 2-подвижная диафрагма, 3- электрофореграмма, движущаяся с постоянной скоростью, 4- поддерживающая основа для электрофореграммы, 5- детектор, 6- фотоумножитель (усилитель электрического сигнала), 7- регистратор самописец.

Клинико-диагностическое значение. При многих заболеваниях часто изменяется процентное соотношение отдельных белковых фракций, общее содержание белка в сыворотке крови может оставаться в пределах нормы. Такое состояние носит название «диспротеинемия».

Диспротеинемии подразделяют на наследственные и приобретенные. *Наследственные диспротеинемии* обычно связаны с первичной гипоальбуминемией, анальбуминемией, агаммаглобулинемией (проявляется нарушениями иммунитета), недостаточностью α_1 -антитрипсина (приводит к эмфиземе легких), α_1 -липопротеина, гаптоглобина, а также церуллоплазмينا.

Приобретенные диспротеинемии возникают вследствие различных заболеваний. Повышенное содержание в крови α_2 -глобулина характерно для острых и обострения хронических воспалительных процессов. Гипербеттаглобулинемия отмечается при заболеваниях печени, застойной желтухе, β -миеломе. Гипогамаглобулинемия характерна для иммунодефицитных состояний, которые могут проявляться и недостаточностью только одного из типов иммуноглобулинов. Гипергаммаглобулинемия (гаммалатия) возникает при аутоиммунных процес-

сах, хронических инфекционных и паразитарных заболеваниях, болезнях печени, крови. Может преобладать повышенное содержание какого-либо одного класса иммуноглобулинов. Например, при ревматоидном артрите преобладает фракция IgM (ревматоидный фактор), при остром гепатите - фракция IgG. Моноклональные гаммапатии характеризуются увеличением в крови концентрации какого-либо одного класса, отдельных тяжелых или легких цепей одного из классов иммуноглобулинов (плазмоцитомы, злокачественная лимфома, хронический лимфолейкоз).

Вывод.

Структурно-функциональное разнообразие белков

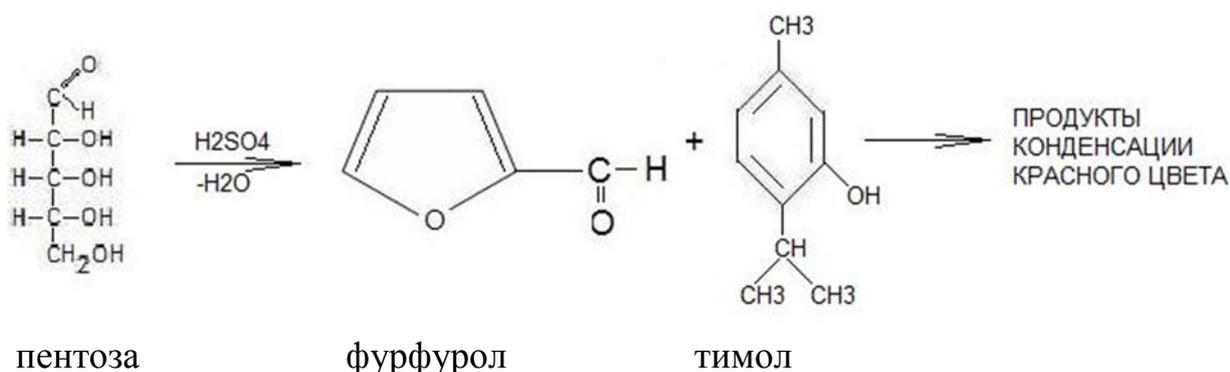
Белки разделяют на две большие группы: протеины или простые белки, протеиды или сложные белки, которые помимо простого белка содержат в структуре и небелковую (простетическую) группу – углевод, металл, нуклеиновую кислоту, пигмент и др.

Работа № 14. Выделение муцина слюны и определение в нем углеводного и белкового компонентов.

Гликопротеины – сложные белки, содержащие углеводный компонент, составляющий около 10-20 % массы белка и представленный глюкозой, маннозой, галактозой, ксилозой, фукозой, арабинозой, гексозаминами, ацетилированными гексозаминами и нейраминовой кислотой и др.

Гликопротеины широко распространены в организме человека. Муцин слюны является представителем гликопротеинов слизистых секретов.

Принцип метода: Реакция основана на дегидратации гексоз и пентоз при действии концентрированной серной кислоты с образованием оксиметилфурфура и фурфурола, которые в присутствии серной кислоты дают с тимолом продукт конденсации красного цвета (реакция Молиша).



Оборудование: штатив с пробирками, пипетки капельные (глазные) и на 1 мл, держатели для пробирок.

Реактивы:

1. Тимол, 1 % спиртовый раствор.
2. Серная кислота концентрированная.
3. Уксусная кислота концентрированная.
4. NaOH, 10 % раствор.
5. CuSO₄, 1 % раствор.

Исследуемый материал: слюна, которую собирают после прополаскивания ротовой полости водой.

Ход работы: в две пробирки собрать примерно по 1 мл слюны, по каплям прилить концентрированную уксусную кислоту и нагреть до кипения. Появляется сгусток муцина. Жидкость из пробирок осторожно слить.

В одной пробирке провести биуретовую реакцию (см. работу №1), предварительно добавив 10 капель 10 % NaOH для нейтрализации кислоты, затем 1-2 капли 1 % раствора CuSO₄.

Во второй пробирке провести реакцию Молиша на углеводный компонент муцина. Для этого к сгустку добавить 2-3 капли раствора тимола. Перемешивать. По стенке пробирки, наклонив её, осторожно наслоить концентрированную H₂SO₄ до появления розового кольца.

Оформление работы: по результатам работы заполнить таблицу.

Вещество	Реакция	Наличие окраски

Вывод.

Работа № 15. Выделение нуклеопротеинов из гидролизата дрожжей.

При гидролизе нуклеопротеины и нуклеиновые кислоты расщепляются до составных компонентов.

В гидролизате дрожжей качественными реакциями можно определить белковую часть, пуриновые основания, пентозы, фосфорную кислоту нуклеопротеинов.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки капельные (глазные) и на 1 мл, спиртовка, держатели для пробирок.

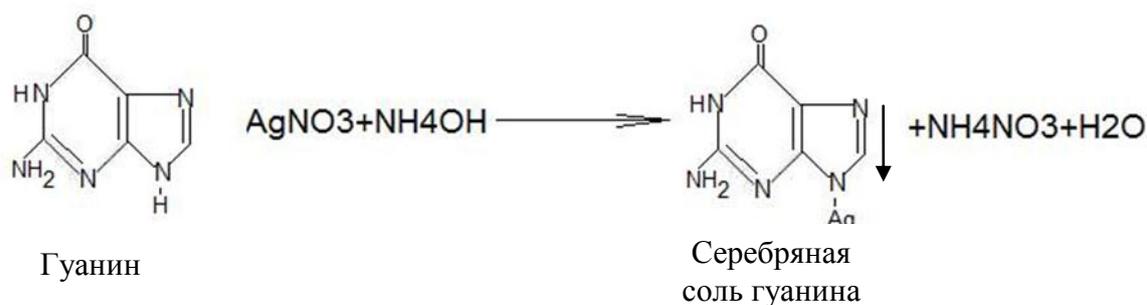
Реактивы:

1. Гидролизат дрожжей*.
2. Тимол, 1 % спиртовой раствор.
3. NaOH, 10 % раствор.
4. NH₄OH, 3 % раствор.
5. Молибденовый реактив*.
6. Серная кислота концентрированная.
7. Уксусная кислота концентрированная.
8. CuSO₄, 1 % раствор.
9. Азотнокислое серебро, 1 % аммиачный раствор*.
10. Уксусная кислота, 10 % раствор.

А. Биуретовая реакция на белковую часть: основана на способности пептидной группы белков и полипептидов образовывать с ионами меди в щелочной среде комплексные соединения фиолетового цвета (см. работу 1).

Ход работы: К 5 каплям гидролизата добавить 10 капель 10 % NaOH и 1-2 капли 1 % раствора CuSO₄. Отметить появление фиолетового окрашивания.

Б. Реакция на пуриновые основания: пуриновые основания (аденин и гуанин) при взаимодействии с нитратом серебра образуют бурый осадок серебряных солей.

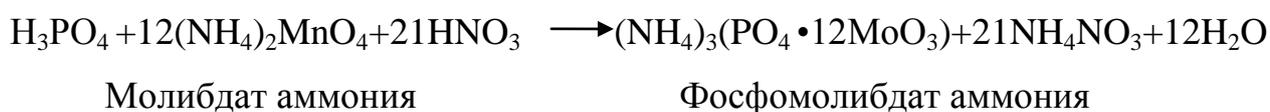


Ход работы: к 1-2 мл гидролизата добавить несколько капель 3 % раствора NH_4OH до слабощелочной реакции и 1 мл аммиачного раствора азотно-кислого серебра. При нагревании содержимого пробирки отметить выпадение бурого осадка.

В. Реакция Молиша на пентозы: реакция основана на дегидратации пентоз и образовании фурфурола при действии концентрированной серной кислоты. Образовавшийся фурфурол, в присутствии серной кислоты дает с тимолом продукт конденсации красного цвета (см. работу 7).

Ход работы: к 10 каплям гидролизата добавить 1 % спиртовой раствор тимола. Содержимое пробирки перемешать, по стенке осторожно, наклонив пробирку, наслоить концентрированную H_2SO_4 до появления окрашенного кольца розового цвета.

Г. Проба на фосфорную кислоту с молибденовым реактивом: при реакции фосфорной кислоты с раствором молибденовокислого аммония в азотной кислоте образуется окрашенное комплексное соединение аммония фосфомолибдата.



Ход работы: к 10 каплям гидролизата добавить 20 капель молибденового реактива, прокипятить. Отметить окрашивание жидкости в лимонно-желтый цвет. Пробирку охладить под струей воды. Отметить появление лимонно-желтого осадка фосфомолибдата аммония.

По результатам работы заполнить таблицу:

Вещество	Реакция	Окраска

Вывод.

Работа № 16. Выделение и определение фосфопротеинов (казеина) из молока.

К фосфопротеинам относятся казеиноген (казеин) молока, витин, вител-
ленин, вителин желтка яиц, ферменты – фосфоглюкомутаза, фосфорилаза и др.

Принцип метода: в молоке казеиноген содержится в виде растворимой
кальциевой соли. При подкислении достигается изоэлектрическая точка, и ка-
зеиноген выпадает в осадок. Избыток кислоты мешает осаждению, т.к. при рН
ниже изоэлектрической точки (ИЭТ казеиногена рН 4,7) молекулы белка пере-
заряжаются и казеиноген вновь переходит в раствор.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки капельные (глазные) и на
1 или 2 мл, спиртовка, держатели для пробирок, фильтры обеззоленные, ворон-
ки, стеклянные палочки.

Исследуемый материал: молоко, гидролизат казеина.

Реактивы:

1. Уксусная кислота, 10 % раствор.
2. NaOH, 10 % раствор.
3. CuSO₄, 1 % раствор.
4. Молибденовый реактив*.

Ход работы: молоко (2 мл) разбавить равным объемом дистиллирован-
ной воды и осадить казеиноген добавлением 2 капель 10 % раствора уксусной
кислоты. Казеиноген выделяется в виде хлопьевидного осадка, который от-
фильтровать и промыть на фильтре дистиллированной водой (2-3 раза). Не-
большие порции осадка снять с фильтра стеклянной палочкой, поместить в
пробирку и проделать биуретовую реакцию на белок. Для этого в пробирку до-
бавить 10 капель 10 % раствора NaOH и 1-2 капли 1 % раствора CuSO₄. Отме-

тить появление фиолетовой окраски.

С гидролизатом казеина провести молибденовую пробу на фосфорную кислоту: в пробирку налить 2-3 капли гидролизата казеина, добавить 20 капель молибденового реактива и кипятить несколько минут на пламени спиртовки. Отметить выпадение небольшого кристаллического осадка фосфорномолибденовокислого аммония (лимонно-желтого цвета).

Вывод.

Работа № 17. Проба Тейхмана на гемоглобин.

Гемоглобин является гемопротеином. К гемопротеинам относятся - миоглобин, цитохромы, каталаза, пероксидаза.

Принцип метода: проба основана на том, что при действии на гемоглобин концентрированных кислот происходит отщепление свободного гема, который в присутствии солей соляной кислоты переходит в гемин, выпадающий в форме характерных кристаллов ромбовидной формы.

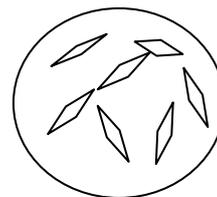
Проба позволяет обнаружить наличие небольших количеств крови в исследуемом материале. Широко используется в судебно-медицинской практике.

Оборудование: стекла предметные и покровные, стеклянная палочка, пипетки капельные (глазные), спиртовка, микроскоп.

Исследуемый материал: кровь.

Реактивы:

1. Уксусная кислота, концентрированная.
2. NaCl кристаллический.



Ход работы: приготовить мазок крови и осторожно подсушить его, держа стекло высоко над пламенем спиртовки. Прибавить 2-3 кристаллика NaCl и 1-2 капли концентрированной уксусной кислоты, тщательно перемешать стеклянной палочкой и нагреть до кипения на небольшом пламени.

После охлаждения стекла исследовать мазок под микроскопом. Кристаллы гемина зарисовать в протоколе.

Вывод.

Работа № 18. Количественное определение содержания гемоглобина в крови.

Принцип метода. Гемоглобин под действием трансформирующего раствора (раствора натрия додецилсульфата) превращается в окрашенный продукт-гемихром, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации гемоглобина.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки объемом 5 мл, микропипетки-дозаторы, наконечники, ФЭК, кюветы толщиной слоя 3 мм или 5 мм.

Реактивы: Набор реагентов «Гемоглобин-Ново» ЗАО «Вектор-Бест».

Состав. Реагент (Р)- раствор натрия додецилсульфата (100-кратный концентрат).

Калибратор - калибровочный раствор гемихрома, соответствующий концентрации гемоглобина около 140 г/л, готовый к использованию.

Исследуемый материал: цельная кровь.

Приготовление рабочего реагента. Содержимое флакона с Реагентом количественно перенести в мерную колбу вместимостью 1000 мл, объем колбы довести до метки дистиллированной водой, перемешать, избегая вспенивания. Рабочий реагент стабилен в плотно закрытом виде не более 3 мес. Калибратор после вскрытия ампулы можно хранить в холодильнике в плотно закрытом виде 5-6 суток.

Ход работы.

В пробирку отмерить 5 мл рабочего реагента и добавить 20 мкл (0,02 мл) крови. Перемешать, выдержать 5 мин при комнатной температуре и измерить оптическую плотность пробы против рабочего реагента в кюветах длиной оптического пути 3 мм или 5 мм при длине волны 540 (520-560) нм. Измерить оптическую плотность калибратора. Окраска стабильна до 5 часов.

Расчет. Концентрация гемоглобина в пробе г/л рассчитать по формуле:

$$C = A/A_k \times 140 \text{ г/л, где}$$

A - оптическая плотность пробы,

A_к- оптическая плотность калибратора.

Нормальные величины содержания гемоглобина в крови:

- мужчин 130-160 г/л;

- женщин 120-140 г/л.
- новорожденные – 201-225 г/л
- дети в возрасте – 145-165 г/л
- дети в возрасте 1 год – 110-120 г/л
- дети в возрасте 14-15 лет – 130-150 г/л

Клинико-диагностическое значение. Определение концентрации гемоглобина в крови играет важную роль в диагностике анемий. При анемиях содержание гемоглобина снижается и варьирует в широких пределах: при железодефицитной анемии - умеренно, значительно - при острой кровопотере, гемолитической анемии после гемолитического криза, В₁₂-дефицитной анемии.

Концентрация гемоглобина может повышаться (180-220 г/л) при эритроцитозе, симптоматических эритрозах, обезвоживании, длительном пребывании на больших высотах.

Вывод.

Работа № 19. Качественное открытие липопротеинов.

Липопротеины в сыворотке крови осуществляют транспорт липидов – триацилглицеридов, холестерина, фосфолипидов.

Принцип метода: липиды липопротеинов со спиртовым раствором судана образуют характерное окрашивание (с суданом III – розовое, с суданом IV – черное).

Оборудование: чашки Петри с крышкой, полоски фильтровальной бумаги, термостат или сушильный шкаф, пипетки капельные (глазные), пинцеты.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы:

1. Судан III или судан IV, 0,1 % спиртовый раствор*;
2. Спирт этиловый, 80 % раствор по объему.

Ход работы: Каплю сыворотки крови нанести на фильтровальную бумагу, высушить при температуре 80-90 °С. Поместить бумагу в чашку Петри, залить раствором судана, накрыть крышечкой и оставить на 60 минут. После этого достать бумагу, дать стечь реактиву. В чистой чашке Петри промыть бумагу

80 % раствором этанола. На месте нанесения сыворотки крови отметить пятно окрашенных липопротеинов.

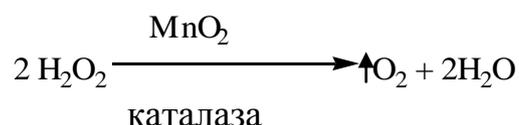
Вывод.

Общие свойства ферментов

Ферменты, или энзимы — биологические катализаторы, содержащиеся во всех тканях, клетках, субклеточных органоидах и биологических жидкостях. Подавляющее большинство ферментов являются белками простыми или сложными. У простых белков-ферментов функции каталитического и контактного участков активного центра выполняют радикалы аминокислот. Чаще это радикалы гистидина, цистеина, серина, глутаминовой и аспарагиновой кислот. У сложных белков в состав активного центра фермента входят коферменты и катионы металлов, и они без кофактора не проявляют активность. Белковую природу ферментов и наличие кофактора необходимо учитывать при выделении, очистке, идентификации и определении активности. Поэтому при извлечении ферментов из биологического материала необходимо создавать щадящие условия с соблюдением температуры, pH среды, наличия примесей тяжёлых металлов и других соединений, которые инактивируют ферменты. Многие ферменты синтезируются тканями в неактивном состоянии (проферменты) и активируются под действием специальных активаторов.

Работа № 20. Сравнение действия ферментов и минеральных катализаторов.

Ферменты обладают большей эффективностью по сравнению с минеральными катализаторами. Перекись водорода является нестабильным веществом. Разложение H_2O_2 ускоряется под действием света, нагревания или действия катализаторов. Роль катализаторов могут выполнять соединения меди, железа, кобальта, диоксид марганца, специфический фермент каталаза, содержащаяся в эритроцитах крови. Во всех случаях реакция идет с выделением молекулярного кислорода, при действии каталазы крови перекись разлагается «вскипает» быстрее и с меньшей концентрацией катализатора.



Оборудование: штатив с пробирками, пипетки объёмом 1 и 2 мл.

Реактивы:

1. Перекись водорода (H_2O_2), 1 % раствор.
2. Оксид марганца (MnO_2), порошок.

Исследуемый материал. Кровь, гемолизированная разведением 1:1000 дистиллированной водой.

Ход работы. В 2 пробирки налить по 2-3 мл 1 % раствора H_2O_2 . В одну пробирку прибавить небольшое количество порошка MnO_2 , во вторую — 1-2 мл гемолизированной разведенной крови. Обе пробирки встряхнуть и отметить выделение пузырьков молекулярного кислорода.

Вывод.

Работа № 21. Определение специфичности действия ферментов.

Наиболее характерное свойство ферментов — специфичность. Ферменты специфичны как в отношении типа катализируемых реакций, так и в отношении субстратов, на которые они воздействуют.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, термостат на 38°C , спиртовки, держатели для пробирок.

Реактивы:

1. Крахмал, 0,1 % раствор.
2. Сахароза, 1 % раствор.
3. Фелинга реактив*.
4. Люголя реактив*.

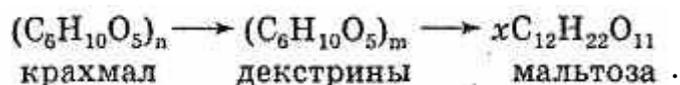
Исследуемый материал. Раствор слюны; экстракт пекарских дрожжей.

Специфичность действия амилазы.

Фермент α -амилаза слюны (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ: 3.2.1.1) катализирует гидролитическое расщепление полисахаридов (крахмала) с образованием мальтозы и не оказывает действия на дисахариды (сахарозу). Промежуточными продуктами в реакции расщепления крахмала являются раз-

личные декстрины (амино-, эритро-, ахро- и мальтодекстрины).

Степень гидролиза крахмала можно контролировать по цветной реакции с йодом. Крахмал дает с йодом синее окрашивание, декстрины, в зависимости от размеров молекул, при взаимодействии с йодом окрашиваются в разные цвета (сине-фиолетовый, красно-бурый, желто-бурый), а конечные продукты гидролиза крахмала с йодом окраски не дают. Второй контрольной пробой может быть реакция Фелинга на наличие свободных альдегидных групп. Конечные продукты гидролиза крахмала — мальтоза и изомальтоза — имеют свободные альдегидные группы и дают положительную реакцию Фелинга. Схема гидролиза крахмала под влиянием амилазы слюны:



Ход работы. В две пробирки внести по 5 капель разведенной слюны. В качестве субстратов используют для амилазы 2 вещества: крахмал и сахарозу. В первую пробирку добавить 10 капель 0,1 % раствора крахмала, во вторую — 10 капель 1 % раствора сахарозы. Пробы выдержать в термостате в течение 15 мин при 38 °С. Содержимое первой пробирки разделить на две части и проделать 2 реакции: Фелинга и реакцию с йодом. Со второй пробой проделать реакцию Фелинга.

Реакция с йодом. К 10 каплям пробы добавить 1-2 капли раствора Люголя. При наличии крахмала отмечают появление темно-синего окрашивания.

Реакция Фелинга. К пробе добавить 5 капель реактива Фелинга и кипятить в течение 2-5 мин. Положительную реакцию отметить по появлению красного осадка закиси меди (Cu_2O).

Вывод.

Работа № 22. Определение термолабильности ферментов на примере амилазы слюны.

Скорость ферментативных реакций, как и неферментативных, увеличивается при повышении температуры. Но в связи с белковой природой ферментов повышение температуры может привести к их денатурации и снижению скоро-

сти реакции. Большинство ферментов термолабильны — при нагревании до 60-80 °С утрачивают каталитическую активность.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, термостат на 38 °С, спиртовки, держатели для пробирок.

Реактивы:

1. Крахмал, 0,1 % раствор.
2. Фелинга реактив*.
3. Люголя реактив.

Исследуемый материал. Раствор слюны.

Ход работы. Готовят три инкубационные пробы. Во все три пробирки налить по 10 капель 0,1 % раствора крахмала. В первую пробирку добавить 10 капель разведенной слюны, во вторую — 10 капель прокипяченной слюны, в третью — 10 капель воды (контрольная проба). Пробы выдержать в термостате в течение 15 мин при 38 °С. Затем содержимое каждой пробы разделить на две части и проделать по 2 реакции: Фелинга и реакцию с йодом (см. работу № 26).

Результаты реакций внести в таблицу:

№ п/п	Субстрат	Фермент	Температура	Реакция с йодом (+/-)	Реакция Фелинга (+/-)
1.					
2.					
3.					

Вывод.

Работа № 23. Определение влияния реакции среды на активность ферментов и определение оптимума рН для α -амилазы слюны.

Для разных ферментов существует свой оптимум рН в кислой, щелочной или нейтральной среде, при которой фермент наиболее активен. Отклонение рН от оптимума влияет на степень ионизации фермента и субстрата, может нарушить связь между белковой частью фермента и их простетическими группами, может влиять на связывание субстрата с ферментами. Например, для пепсина оптимум рН составляет 1,5-2,5; липазы желудочного сока — 5,5-7,5; трипсина

— 8,0-9,0; каталазы — 6,0-8,0 и т.д. Для амилазы слюны оптимум рН 6,8-7,2. В кислой и щелочной среде активность амилазы снижается.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, пипетки объёмом 1 или 2 мл, термостат на 38 °С, спиртовки, держатели для пробирок.

Реактивы:

1. Крахмал, 0,5 % раствор.
2. Двухзамещенный фосфорнокислый натрий (Na_2HPO_4), 0,2 м раствор*.
3. Лимонная кислота, 0,1 м раствор*.
4. Люголя реактив.

Исследуемый материал: раствор слюны.

Ход работы. В 7 предварительно пронумерованных пробирок налить 0,2 м раствор двухзамещенного фосфорнокислого натрия и 0,1 м раствор лимонной кислоты в соотношениях, указанных в таблице. Получают буферные растворы с рН от 5,6 до 8,0. В каждую пробирку добавить по 10 капель 0,5 % раствора крахмала, по 10 капель разведенной слюны. Перемешать содержимое пробирок и выдержать в термостате в течение 15 мин при 38 °С. Затем во все пробирки добавить по 1 капле раствора йода в йодистом калии (р-р Люголя) и перемешать. Оценить окраску и определить рН, при котором амилаза действует наиболее активно. В зависимости от активности слюны ее можно разводить в 100, 50 или 10 раз.

Результаты реакций внести в таблицу:

№ п/п	Na_2HPO_4 , мл	Лимонная кислота, мл	рН смеси	Субстрат	Фермент	Окрашивание с йодом
1.	0,58	0,42	5,6			
2.	0,63	0,37	6,0			
3.	0,69	0,31	6,4			
4.	0,77	0,23	6,8			
5.	0,87	0,13	7,2			
6.	0,94	0,06	7,6			
7.	0,97	0,03	8,0			

Вывод.

Кинетика ферментативных реакций.

Количественное определение активности некоторых ферментов

Работа № 24. Количественное определение активности амилазы слюны по Вольгемуту.

Принцип метода Вольгемута основан на определении наибольшего разведения слюны, в котором полностью расщепляется добавленный крахмал. Амилазная активность слюны выражается количеством мл 0,1 % раствора крахмала, которое может расщеплять 1 мл слюны при температуре 38°С в течение 30 минут. В норме активность амилазы слюны равна 160-320 единицам.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки объёмом 1 или 2 мл, термостат, пипетки глазные.

Реактивы:

1. Крахмал, 0,1 % раствор;
2. Люголя реактив.

Исследуемый материал: раствор слюны.

Ход определения. В 8 пронумерованных пробирок налить по 1 мл воды. В первую пробирку добавить 1 мл слюны (разведенной в 10 раз). Содержимое первой пробы перемешать и 1 мл раствора перенести во вторую, содержимое второй пробы перемешать и 1 мл раствора перенести в третью. Таким образом поступить до восьмой пробирки. Из последней пробы 1 мл смеси вылить. Таким образом, получается ряд разведенной слюны в 20, 40, 80 и т. д..

После этого во все пробы добавить по 1 мл дистиллированной воды и по 2 мл 0,1 % раствора крахмала, перемешать и поместить пробирки в термостат на 30 минут при 38°С. Через 30 минут пробирки вынуть, охладить, добавить по 1-2 капле реактива Люголя и перемешать. Жидкость в пробирках может окраситься в желтый, розовый, красный и фиолетовый цвета. Раствор желтого цвета свидетельствует о полном расщеплении крахмала, фиолетовый – что крахмал в растворе еще сохранился.

Результаты реакций вносят в таблицу:

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8
H ₂ O, мл								
Разведение слюны (1:10)	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
Крахмал, мл								
Инкубация при 38 ⁰ С, 30 минут								
Реактив Люголя								
Окрашивание								

Расчет. Отметить ту пробу, начиная с конца, где появилась желтая окраска, например, желтоватая окраска имеется в четвертой пробирке, где слюна была разведена в 160 раз:

1/160 мл слюны расщепила 2 мл 0,1 % раствора крахмала,

1 мл слюны расщепил X мл 0,1 % раствора крахмала,

$$2 \times 160$$

$$X = \frac{2 \times 160}{1} = 320 \text{ мл } 0,1 \% \text{ раствора крахмала.}$$

$$1$$

Следовательно: активность амилазы 320 условных единиц.

Клинико-диагностическое значение. Амилазная активность слюны повышается при воспалении околоушной слюнной железы, при панкреатитах, сахарном диабете. Активность α -амилазы снижается при повышенном содержании органических кислот вследствие снижения рН, у больных пародонтозом.

Вывод.

Работа № 25. Количественное определение амилазной активности мочи.

Исследование амилазной активности мочи по Вольгемуту основано на определении времени, необходимого для расщепления 2 мг крахмала амилазой, содержащейся в одном мл свежей мочи. Активность амилазы в моче увеличивается при панкреатитах. Амилазная активность мочи также отражает и величину клубочковой фильтрации. Снижение активности этого фермента в моче наблюдается при почечной недостаточности. В норме амилазная активность

мочи по Вольгемуту составляет от 16 до 64 единиц.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, пипетки объёмом 1 или 2 мл, чашки Петри, водяная баня.

Реактивы:

1. Крахмал, 0,1 % раствор.
2. Люголя реактив.
3. Физиологический раствор*.

Исследуемый материал: моча.

Ход работы. На сухую чашку Петри заранее капнуть в разных местах по 1 капле раствора Люголя (всего 8-10 точек). В пробирку внести 2 мл 0,1 % раствора крахмала, 1 мл физиологического раствора и поместить на водяную баню при 38°C на 2 минуты. Затем по истечении 2 минут, не вынимая пробирку из бани, добавить в неё 0,5 мл мочи, перемешать и отметить время начала реакции. Затем каждые 2-3 минуты переносить каплю реакционной смеси на чашку Петри в раствор Люголя до тех пор, пока не произойдет полное разложение крахмала (желтое окрашивание).

Расчет. Активность амилазы мочи рассчитывают по формуле:

$$X_{\text{ед.}} = 15 / T \cdot 0,5, \text{ где}$$

X — активность амилазы в 1 мл мочи;

15 — время, необходимое для полного расщепления 2 мг крахмала;

0,5 — количество мочи, взятое на анализ, мл;

T — время реакции, мин.

Вывод.

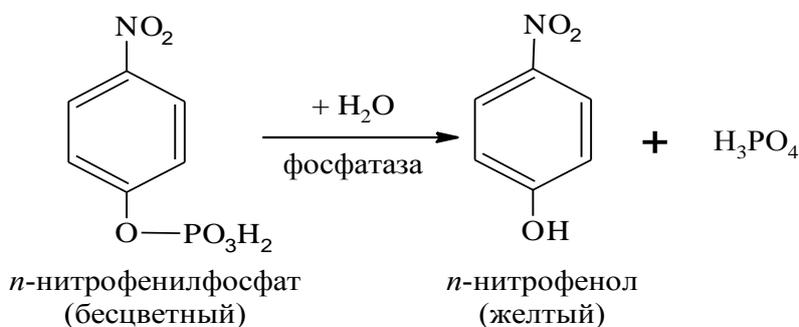
Работа № 26. Количественное определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу п-нитрофенилфосфата (метод Бессей-Лоури-Брока).

Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1) содержится в тканях и крови, гидролизует эфиры фосфорной кислоты и в норме поступает в кровь из печени, костной ткани, селезенки, почек, тонкого кишечника и плаценты.

Принцип метода. Щелочная фосфатаза катализирует гидролиз органиче-

ских моноэфиров ортофосфорной кислоты в щелочной среде. В качестве субстрата используют бесцветный раствор *n*-нитрофенилфосфата. В результате реакции освобождается *n*-нитрофенол, окрашенный в щелочной среде в желтый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.

Реакция протекает по уравнению:



Оборудование: штатив с пробирками; пипетки объемом 0,1; 0,2; 1,0; 2,0 и 10 мл; термостат на 38 °С; кюветы толщиной слоя 3 мм или 5 мм; фотоэлектроколориметр; калибровочный график.

Реактивы:

1. Субстратно-буферный раствор*.
2. Раствор щелочи*.
3. Дистиллированная вода.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Ход работы. В опытную и контрольную пробирку внести по 1 мл субстратно-буферного раствора, прогреть при 38⁰ С в течение 5 мин. Затем в опытную пробирку добавить 0,1 мл сыворотки крови, перемешать и инкубировать обе пробирки в течение 30 минут в термостате при 38⁰ С.

После инкубации пробирки охладить под струей холодной воды (!) и в контрольную пробу добавить 0,1 мл сыворотки крови. Затем в обе пробирки интенсивной струей внести по 10 мл 0,02 н раствора щелочи. Через 5 минут содержимое опытной пробы колориметрировать против контрольной пробы на фотоэлектроколориметре при длине волны 400-420 нм (синий светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Расчет. Найти по калибровочному графику результат, выраженный в мкмоль *n*-нитрофенола, образованного из натриевой соли *n*-нитрофенил-

фосфата под действием содержащейся в 0,1 мл сыворотки крови щелочной фосфатазы.

Активность фермента выражают в мкмоль/час на 1 мл сыворотки или в мкмоль-сек на литр сыворотки крови. Для этого данные, полученные по калибровочному графику, умножают на 20 или на 5,56 соответственно.

Клинико-диагностическое значение. Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови возрастает при тяжелом рахите, заболеваниях печени (механическая желтуха, острые гепатиты, циррозы), различных заболеваниях костной системы и снижается при хроническом гломерулонефрите, квашиоркоре, гипотиреозе и цинге. *Норма активности щелочной фосфатазы в крови женщины — до 240 Ед/л, мужчины — до 270 Ед/л.*

Вывод.

Регуляция активности ферментативных реакций.

Изоферменты, мультиэнзимные комплексы

Работа № 27. Определение влияния активаторов и ингибиторов на активность ферментов амилазы слюны.

На каталитическую активность ферментов влияют различные ионы, оказывая усиливающие или ингибирующее действие. Так, например, ионы натрия и хлора стимулируют активность амилазы слюны, а ионы меди, наоборот, тормозят ее.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, пипетки объемом 1 или 2 мл, термостат на 38 °С, спиртовки, держатели для пробирок.

Реактивы:

1. Крахмал, 0,5 % раствор
2. Фелинга реактив*.
3. Сульфат меди (CuSO_4), 1 % раствор.
4. Хлорид натрия (NaCl), 1 % раствор.
5. Люголя реактив.

Исследуемый материал: раствор слюны.

Ход работы. Готовят три инкубационные пробы. В три пробирки внести по 1 мл разведенной слюны. В первую пробирку добавить 2 капли 1 % раствора NaCl, во вторую — 2 капли 1 % раствора CuSO₄, в третью — 2 капли дистиллированной воды (контрольная проба). После этого в каждую пробирку прилить по 10 капель 0,5 % раствора крахмала, пробирки встряхнуть и поместить в термостат с температурой 38 °С на 10 мин. Затем содержимое пробирок разделить на две части и с каждой пробой проделать 2 реакции: реакцию Фелинга и реакцию с йодом (см. работу №26). Можно в каждую пробирку добавить воды (примерно 2 мл) и перемешать (окраска будет нагляднее).

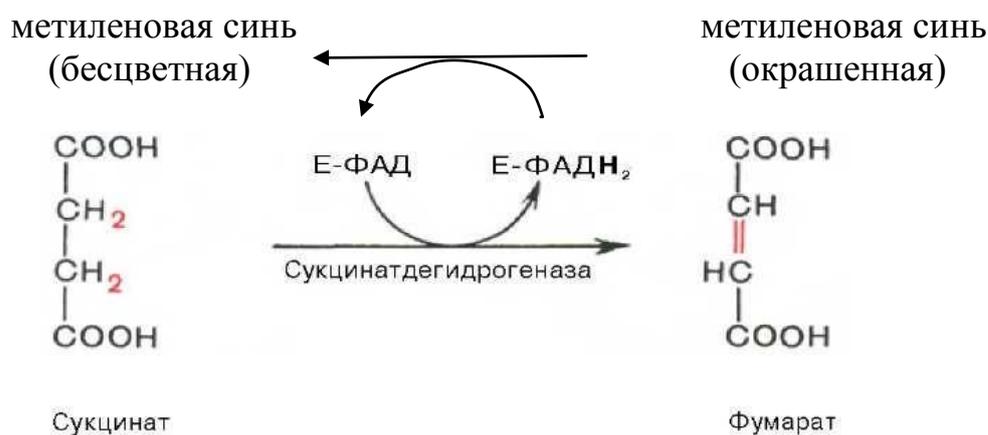
Результаты реакций внести в таблицу:

№ п/п	Субстрат	Фермент	Добавляемое вещество	Реакция с йодом (+-)	Реакция Фелинга (+-)
1.					
2.					
3.					

Вывод.

Работа № 28. Определение конкурентного торможения сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой.

Принцип метода основан на изменении окраски метиленовой сини при восстановлении его в ходе окислительно-восстановительной реакции. При дегидрировании янтарной кислоты сукцинатдегидрогеназой акцептором водорода является метиленовая синь, которая при восстановлении обесцвечивается. Чем выше активность сукцинатдегидрогеназы, тем быстрее обесцвечивается метиленовая синь. Ингибирование фермента замедляет скорость обесцвечивания метиленовой сини. Малоновая кислота является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы.



Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, термостат на 38 °С, ступка, пестик, держатели для пробирок, ножницы.

Реактивы:

1. Малоновая кислота, 1 % раствор.
2. Янтарная кислота, 1 % раствор.
3. Метиленовая синь, 1 % раствор.
4. Вазелиновое масло.

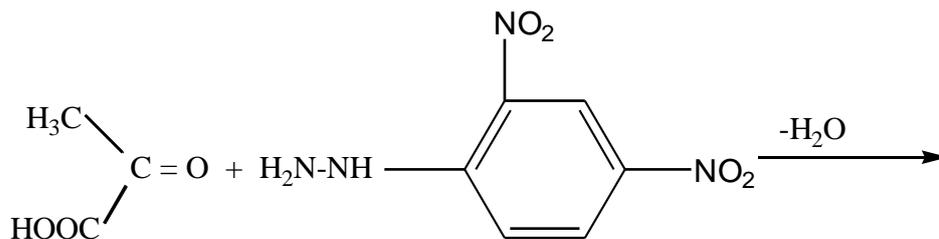
Исследуемый материал: мышечная кашица, полученная после забоя лабораторного животного. Около 500 мг мышцы измельчить ножницами и растереть с добавлением 8-10 капель дистиллированной воды в фарфоровой ступке.

Ход работы. Готовят три пробы. Во все три пробирки добавить по 5-6 капель мышечной кашицы. В первую пробирку прилить 0,8 мл дистиллированной воды, во вторую — 0,2 мл 1% раствора малоновой кислоты и 0,6 мл дистиллированной воды, в третью — 0,8 мл 1% раствора малоновой кислоты. Во все три пробирки добавить по 1 мл 1% раствора янтарной кислоты и по 1 капле 1% раствора метиленовой сини, после перемешивания внести по 3 капли вазелинового масла. Пробы поместить в термостат с температурой 38 °С и через 5 минут отметить изменение окраски в растворах. Сравнить степень уменьшения голубого окрашивания в трех пробирках.

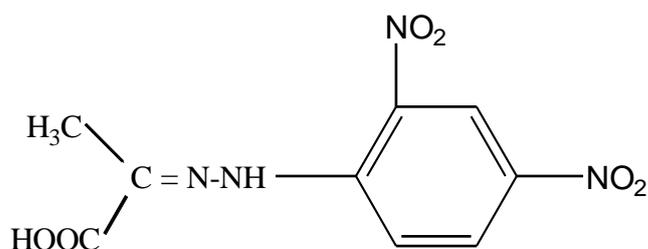
Вывод.

Работа № 29. Фотокolorиметрический метод исследования активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови по Севелу и Товареку.

Принцип метода. Метод основан на определении скорости образования пирувата в ходе окисления лактата с участием лактатдегидрогеназы сыворотки крови. Пируват с 2,4-динитрофенилгидразином образует соответствующий гидразон, имеющий красно-бурое окрашивание в щелочной среде, интенсивность которого прямо пропорциональна содержанию кетокислоты:



пвк 2,4-динитрофенолгидразин



2,4-динитрофенолгидразон ПВК

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки, водяная баня на 37°C, ФЭК.

Реактивы:

1. Сыворотка крови.
2. Дистиллированная вода.
3. Раствор НАД⁺.
4. Раствор пирофосфата натрия.
5. Раствор лактата натрия.
6. Раствор 2,4-ДНФГ.
7. Раствор гидроксида натрия.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Ход работы. Сыворотку крови разводят в 3 раза дистиллированной водой. Вносят в пробирку 0,1 мл разведенной сыворотки, 0,3 мл раствора НАД⁺ и

ставят на 5 мин в водяную баню при 37⁰С (для прогрева смеси).

Во вторую пробирку добавляют 0,8 мл раствора пирогосфата натрия и 0,2 мл раствора лактата натрия и нагревают на водяной бане при 37⁰С.

Выливают содержимое второй пробирки в первую, быстро перемешивают стеклянной палочкой, не вынимая пробирки из бани, и отмечают время начала инкубации. Через 25 мин реакцию останавливают, прибавляя 0,5 мл раствора 2,4-ДНФГ, и оставляют пробирку на 20 мин при комнатной температуре (для образования гидразона).

К смеси приливают 5 мл раствора гидроксида натрия, содержимое перемешивают стеклянной палочкой и через 10 мин (после развития окраски) измеряют экстинкцию опытной пробы против контрольной на ФЭКе при длине волны 520-560 нм (светофильтр зеленый) в кювете с толщиной слоя 1 см. Контрольную пробу готовят как опытную, но разведенную сыворотку добавляют после инкубации.

Расчет. Активность фермента рассчитывают по калибровочному графику.

Клинико-диагностическое значение. Определение активности лактатдегидрогеназы используется в клинико-биохимических лабораториях для диагностики и установления прогноза заболевания. В норме активность фермента составляет 0,8- 4,0 ммоль/ ч л и возрастает, как правило, у больных с повреждением миокарда, скелетных мышц, почек, а также при анемиях, опухолевых поражениях, остром гепатите и т.д.

Вывод.

Контрольные вопросы к разделам

«Введение в энзимологию. Механизмы регуляции ферментов»

1. С помощью какой реакции можно обнаружить наличие пептидной связи в белках? Почему эта реакция универсальна для всех белков?
2. Почему метионин, являясь серусодержащей аминокислотой, не дает реакцию Фоля?
3. На чем основана ксантопротеиновая реакция Мульдера? Напишите структуру аминокислот, обнаруживаемых этой реакцией.
4. Напишите структуру аминокислоты, обнаруживаемой в белках реакцией Миллона.
5. Почему проба Тейхмана позволяет обнаружить наличие небольших количеств крови в исследуемом материале? Поясните ее принцип.
6. С помощью каких реакций можно обнаружить составные части нуклеопротеинов в гидролизате дрожжей?
7. При каких состояниях отмечается изменение содержания белка в сыворотке крови: а) гипопроотеинемия; б) гиперпротеинемия?
8. Перечислите методы очистки белков от низкомолекулярных примесей? Укажите, какое свойство белков лежит в основе метода диализа.
9. Какими методами можно выделить белки в осадок без потери ими биологических свойств?
10. Объясните, почему глобулины осаждаются в полунасыщенном растворе сернокислого аммония, а альбумины в насыщенном. Какое практическое значение имеет это свойство?
11. Объясните, почему при нагревании в сильно кислых и сильно щелочных растворах белок не выпадает в осадок.
12. Какие методы осаждения белков используются для его обнаружения в биологических жидкостях?
13. На чем основано количественное определение белка в моче по методу Робертса-Стольников-Брандберга?

14. Поясните принцип разделения и количественного определения белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге и представьте протеинограмму здорового человека.

15. Охарактеризуйте клинико-диагностическое значение определения соотношения белковых фракций сыворотки крови.

16. Каково содержание белка в сыворотке белка у здорового человека? При каких состояниях наблюдается гипопроотеинемия, гиперпротеинемия?

17. Какой опыт позволяет сравнить эффективность действия фермента по сравнению с неорганическим катализатором?

18. Каково практическое значение качественных реакций на ферменты?

19. Каковы промежуточные и конечные продукты гидролиза крахмала α -амилазой слюны и какими реакциями можно их обнаружить?

20. Какие реакции позволяют доказать специфичность действия α -амилазы слюны?

21. Почему с помощью реакции Фелинга можно обнаружить действие сахарозы? Объясните отсутствие восстанавливающих свойств у сахарозы.

22. Объясните, почему отклонение рН от оптимума влияет на изменение активности ферментов.

23. Каково значение оптимума рН для α -амилазы слюны? Какой опыт позволяет в этом убедиться?

24. Объясните разницу в степени уменьшения голубого окрашивания в трех пробирках в опыте определения конкурентного торможения сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой.

25. На чем основан принцип количественного определения активности α -амилазы слюны по Вольгемуту?

26. Каковы нормальные значения амилазной активности мочи по Вольгемуту?

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ

Биологическое окисление. Общие пути катаболизма

Процессы жизнедеятельности сопровождаются преобразованием энергии в живом организме. Существуют два основных типа получения энергии живыми организмами – фототрофный и хемотрофный. Фототрофами являются растения и фотосинтезирующие микроорганизмы. Они преобразуют энергию солнечного света в энергию фосфатных связей АТФ. Хемотрофы (человек, животные) используют энергию, высвобождающуюся при окислительном распаде (катаболизме) органических веществ. В ходе катаболизма большее число пищевых веществ – аминокислоты, жирные кислоты, моносахариды превращаются в небольшое количество более простых молекул – субстратов окисления, таких как пируват, ацетилКоА, субстраты цикла Кребса. Именно на стадии общих путей катаболизма – окислительного декарбоксилирования ПВК и окисления ацетильного остатка (цикл Кребса) – высвобождается большая часть энергии, заключенной в пищевых веществах. Общие пути катаболизма являются основным источником восстановленных эквивалентов – НАДН+Н⁺ и ФАДН₂, поставляющих богатые энергией электроны для системы тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования.

Работа № 30. Количественное определение пировиноградной кислоты в моче.

Принцип метода. Пировиноградная кислота взаимодействует с 2,4-динитрилфенилгидразином в щелочной среде с образованием 2,4-динитрофенилгидразона пирувата желто-оранжевого цвета. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации пировиноградной кислоты. Гидразоны других кетокислот неустойчивы и быстро разлагаются.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки на 1 мл или 2 мл, фотоэлектроколориметр, кюветы толщиной слоя 5 мм, стаканчики для сбора мочи; калибровочный график для определения пировиноградной кислоты.

Реактивы:

1. Едкий калий (KOH), 2,5 % спиртовой раствор*.
2. 2,4 – динитрофенилгидразин, 0,1 % раствор.
3. Дистиллированная вода.

Исследуемый материал: моча.

Ход работы. В две сухие пробирки контрольную и опытную прилить 1 мл воды (контроль) и 1 мл мочи (опыт) и по 1 мл 2,5 % спиртового раствора KOH. Перемешивать в течение 1 минуты и добавить по 0,5 мл 1 % раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Оставить пробирки на 15 мин при комнатной температуре. Колориметрировать на ФЭКе опыт против контроля в кюветах толщиной слоя 5 мм с синим светофильтром (490 нм). Расчет выполнить по калибровочному графику. Найденную величину содержания пировиноградной кислоты в мкг/мл необходимо умножить на объем суточной мочи (суточный диурез для мужчин - 1500-2000 мл, для женщин – 1200-1500 мл) и получить величину суточной экскреции пировиноградной кислоты.

В физиологических условиях суточная экскреция пировиноградной кислоты составляет 10-25 мг в сутки, или 113,7-283,9 мкмоль/сут.

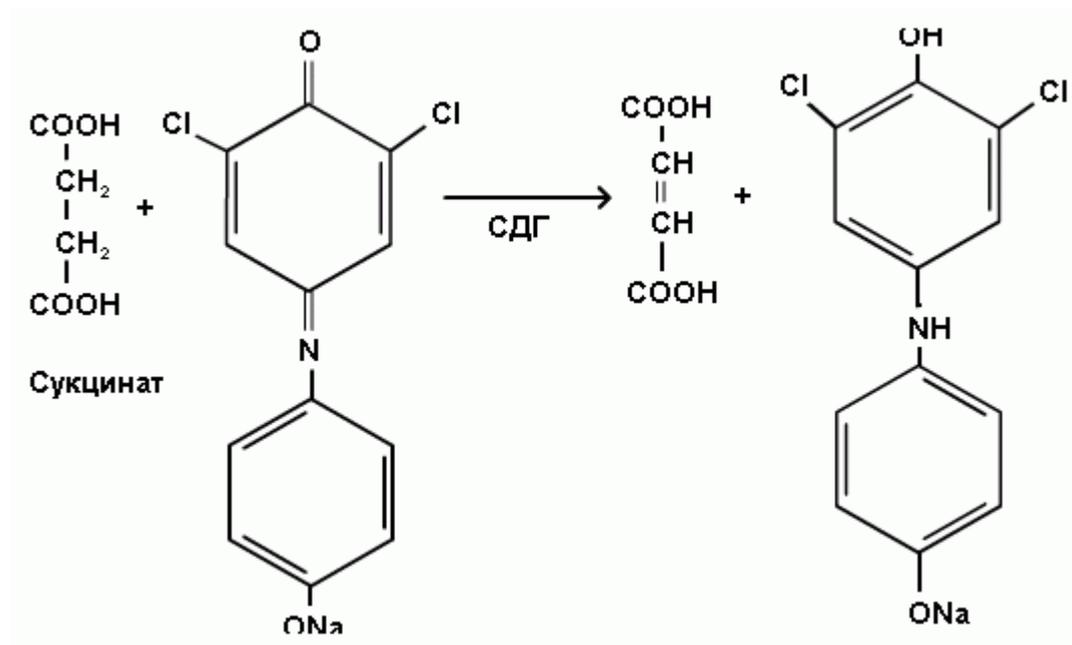
Клинико-диагностическое значение. Экскреция пирувата с мочой увеличивается при гиповитаминозе и авитаминозе В₁, возрастает при сахарном диабете, сердечной недостаточности, гиперфункции гипофизарно-адреналовой системы.

Вывод.

Работа № 31. Обнаружение сукцинатдегидрогеназы в мышечной ткани.

Принцип метода. Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) окисляет янтарную кислоту в фумаровую. Акцептором водородов при этом является кофермент флавинадениндинуклеотид (ФАД). Для обнаружения активности СДГ в условия опыта в качестве акцептора водородов используется натриевая соль 2,6-дихлорфенолиндофенола, которая в окисленной форме в щелочной среде окрашена в синий цвет, а при восстановлении – обесцвечивается.

Химизм реакции:



Окисленная форма
2,6-дихлорфенолиндофенола
(синий)

Восстановленная форма
2,6-дихлорфенолиндофенола
(бесцветный)

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, пипетки на 1 мл и 5 мл, термостат при 37°C, ножницы, фарфоровые чашечки.

Реактивы:

1. Фосфатный буфер, 0,66М рН 7,4*.
2. Янтарная кислота, 5 % раствор.
3. 2,6 – дихлорфенолиндофенол, 0,001н раствор*.
4. Едкий калий (KOH), 0,1н раствор*.

Исследуемый материал. Свежая мышца забитого животного.

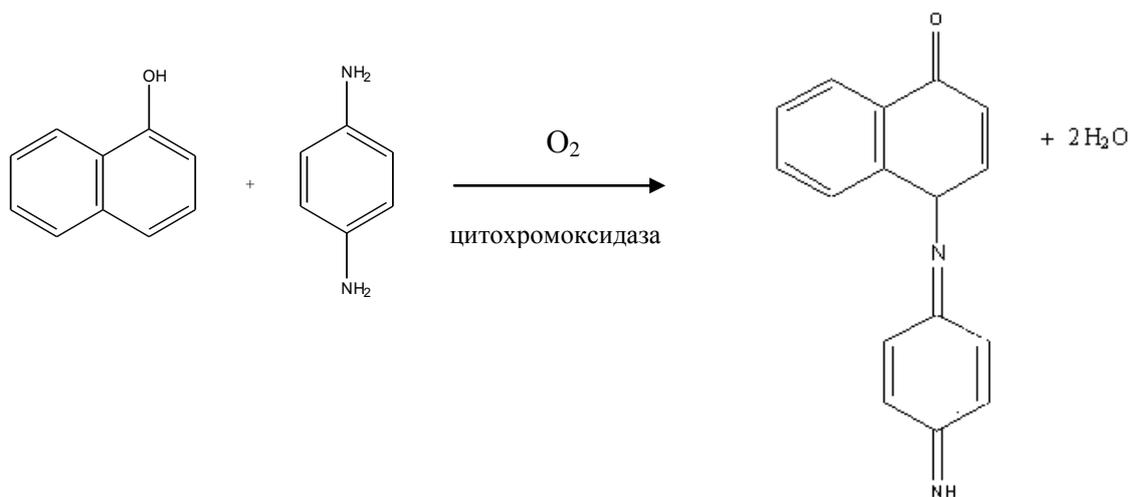
Ход работы. В две пробирки (контроль, опыт) внести по 3 мл фосфатного буфера рН 7,4. В опытную пробирку прилить 5 капель 5 % раствора янтарной кислоты и 5 капель 0,1н раствора KOH. В контрольную пробирку прилить 10 капель дистиллированной воды. В обе пробирки добавить по 1мл 0,001н раствора 2,6 – дихлорфенолиндофенола и по 50 мг хорошо измельченной свежей мышечной ткани. Обе пробирки поместить в термостат на 20 минут при 37°C. Затем сравнить интенсивность окраски в контрольной и опытной пробирках.

Вывод.

Работа № 32. Обнаружение в ткани цитохромоксидазы.

При добавлении к срезам тканей α -нафтола и парафенилендиамина происходит окрашивание тканей вследствие образования индофеноловой сини. Эта реакция катализируется цитохромоксидазой.

Химизм реакции:



α -нафтол + п-фенилен- диамин

индофеноловая синь

Оборудование: часовое стекло, пипетки глазные, ножницы или скальпель.

Реактивы:

1. п-фенилендиамин, 1 % раствор.
2. α -нафтол, 1 % спиртовой раствор.

Ход работы. На часовое стекло взять срез свежей ткани, например печени или мышцы, на него нанести по 1 капле 1% спиртового раствора α -нафтола и 1% водного раствора парафенилендиамина. Появление синего окрашивания на срезе ткани указывает на присутствии в ней активной цитохромоксидазы.

Исследуемый материал: мышечная ткань или печень (свежие) забитого животного.

Вывод.

Работа № 33. Определение активности пероксидазы в растительном материале по методу А. Н. Бояркина.

Принцип метода. Метод основан на непрерывном измерении светопоглощения бензидиновой сини, образующейся при окислении бензидина под действием пероксидазы.

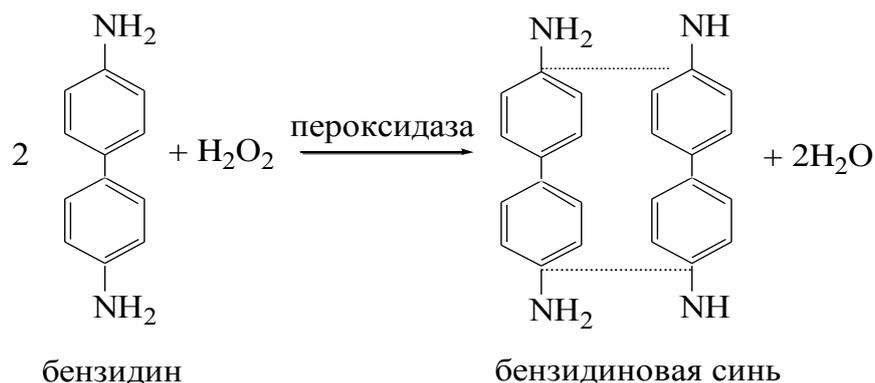
Оборудование: ступка с пестиком, центрифужные пробирки, мерная колба на 25 мл, центрифуга, пипетка на 2 мл, секундомер, ФЭК, кюветы.

Реактивы:

1. Дистиллированная вода.
2. Пероксид водорода 33%.

Исследуемый материал. Свежие листья растений.

Реакция описывается уравнением:



Ход работы. Навеску 100 мг растительного материала (свежие листья растений) помещают в ступку и растирают, прибавляя порциями 10 мл дистиллированной воды. Растертую массу переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят водой до метки. Содержимое колбы настаивают 10 мин, а затем сливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин.

Ставят кюветы в кюветодержатель ФЭКа: слева контрольную и справа опытную. Шкалу правого отсчетного барабана устанавливают на нулевую отметку и с помощью оптических клиньев приводят стрелку гальванометра в нулевое положение.

Правый отсчетный барабан ставят на деление 0,250 (исходная экстинкция), при этом стрелка гальванометра отклоняется в сторону.

В левую (контрольную) кювету добавляют 2 мл воды, а в правую (опытную) вносят 2 мл раствора пероксида водорода пипеткой с широким носиком (чтобы сильная струя перемешала жидкость в кювете). Одновременно с первой каплей жидкости включают секундомер.

В опытной кювете раствор синеет, по мере нарастания интенсивности

окраски, стрелка гальванометра приближается к нулевому положению. Отмечают время от начала приливания раствора пероксида водорода до достижения стрелкой гальванометра нулевого положения. Повторяют определения трижды и берут среднее значение времени.

Расчет. Активность фермента рассчитывают по формуле

$$X = \frac{\Delta E \cdot 25 \cdot 1000}{t \cdot d \cdot 0,1 \cdot 2},$$

где X-активность пероксидазы, $E \cdot c^{-1} \cdot кг^{-1}$ (E-единица экстинкции); ΔE – изменение экстинкции, равное 0,250; t-время реакции, с; d-толщина слоя кюветы, равная 2; 1000-коэффициент перерасчета граммов в килограммы; 0,1-навеска, г; 2-объем пробы, мл.

$$X = \frac{15625}{t}$$

Клинико-диагностическое значение работы. Пероксидаза выполняет две функции: собственно пероксидазную, т.е. окисляет вещества с участием пероксида водорода, и оксидазную, т.е. катализирует окисление субстратов за счет молекулярного кислорода без участия пероксида водорода. Этот фермент проявляет пероксидазную активность в отношении практически всех фенолов (пирокатехин, пирогаллон, галлоновая кислота, гваякол и др.), ароматических аминов (бензидин, п-фенилендиамин и др.), аскорбиновой кислоты, нитритов и т.д.

В то же время пероксидаза, обладая оксидазной функцией, способна участвовать в окисление флороглюцина, НАД·Н₂, НАДФ·Н₂, индолилуксусной кислоты, оксалата, фенилпирувата и т.д.

В практике широко используют определение активности пероксидазы для оценки метаболизма ростовых веществ, лигнина и других вторичных продуктов обмена при физиологических и патологических процессах. Пероксидаза, выделенная из хрена, широко используется как аналитический реагент при проведении клинико-биохимических исследований. Поэтому метод измерения активности фермента необходим для контроля качества продажного препарата фермента.

Вывод.

Контрольные вопросы к разделу

«Биологическое окисление. Общие пути катаболизма»

1. В чем заключается принцип метода количественного определения пировиноградной кислоты в моче?
2. При каких состояниях увеличивается экскреция пировиноградной кислоты с мочой?
3. Какие вещества можно использовать в качестве акцепторов водорода для обнаружения активности сукцинатдегидрогеназы в мышечной ткани в условиях опыта?
4. Представьте химизм реакции, на которой основано обнаружение активности сукцинатдегидрогеназы в мышечной ткани в условиях опыта (с использованием натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола).
5. На чем основано обнаружение в ткани цитохромоксидазы?

ВИТАМИНЫ

Витамины – органические вещества различной химической природы, эссенциальные факторы питания животных и человека. Они содержатся в пище в малых количествах (мг, мкг), но необходимы для нормального протекания различных химических процессов в организме. В зависимости от биологической роли витамины разделяют на коферментные (витамины группы В, витамины К, Н) гормоноподобные регуляторы (витамины Д, А) и антиоксиданты (витамины Е, С). Витамины были открыты Н.И. Луниным в 1880г. Отсутствие или недостаток в пище отдельных витаминов или нарушения их обмена – всасывания в кишечнике, транспорта, тканевых превращений вызывают специфические и неспецифические нарушения обмена веществ – авитаминозы и гиповитаминозы. Некоторые витамины (фолиевая кислота, биотин, витамин К, липоевая кислота) могут синтезироваться микрофлорой кишечника. В зависимости от растворимости витамины разделяются на жиро - и водорастворимые.

Практический интерес представляют определение витаминов в продуктах питания, микробиологических средах, стандартизации препаратов витаминов, в крови и моче для выяснения обеспеченности организма витаминами.

Работа № 34. Качественное открытие витамина А в рыбьем жире.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные.

Реактивы:

1. Хлороформ.
2. Уксусная кислота ледяная, насыщенная сульфатом железа*.
3. Кислота серная, концентрированная.
4. Хлорид железа, (III) 1 % раствор.

34.1. Реакция с серной кислотой.

Принцип метода. Метод основан на способности витамина А при действии концентрированной серной кислоты дегидратироваться с образованием продукта фиолетово -красного окрашивания, быстро переходит красно - бурое.

Ход работы: В сухую пробирку внести 4-5 капель рыбьего жира и доба-

вить 1 каплю концентрированной серной кислоты. Отметить появление окрашивания.

Вывод.

34.2. Реакция с сульфатом железа.

Принцип метода. Продукт дегидратации витамина А при действии концентрированной серной кислоты образует с ионами железа Fe^{+3} окрашенное соединение.

Ход работы. В сухую пробирку налить 2 капли рыбьего жира, 10-15 капель хлороформа, перемешать. Затем в пробирку внести 5-10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа, и 1 – 2 капли концентрированной серной кислоты. Пробирку встряхнуть, отметить появление голубой окраски, переходящей в розово-красную.

Вывод.

34.3. Реакция с хлорным железом.

Принцип метода. Витамин А с хлорным железом (III) даёт продукт зелёного окрашивания.

Ход работы. В сухую пробирку налить 1-2 капли рыбьего жира, 10-15 капель хлороформа. Перемешать и добавить 5 капель 1 % раствора хлорного железа. Отметить появление ярко-зеленого окрашивания.

Вывод.

Работа № 35. Качественное открытие витамина Д в рыбьем жире.

35.1. Реакция с раствором брома.

Принцип метода. Метод основан на способности витамина Д при взаимодействии с раствором брома в хлороформе приобретать зеленовато-голубую окраску.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные.

Реактивы:

1. Бром, 1 % хлороформный раствор (готовить под вытяжкой!)*;

2. Хлороформ.

Исследуемый материал: рыбий жир.

Ход работы. В сухую пробирку внести 2-3 капли рыбьего жира и 2-4 капли раствора брома в хлороформе. Встряхнуть. Отметить образование окраски.

Вывод.

35.2. Анилиновая проба на витамин Д.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, спиртовки, держатели для пробирок.

Реактивы:

1. Хлороформ;

2. Анилиновый реактив (15 частей анилина и 1 часть концентрированной соляной кислоты)*.

Исследуемый материал: рыбий жир.

В сухую пробирку налить 5 капель рыбьего жира, 15 капель хлороформа и 5 капель анилинового реактива. Осторожно нагреть на спиртовке и отметить появление красного окрашивания.

Вывод.

Работа № 36. Качественная реакция на витамин Е с азотной кислотой.

Принцип метода. Метод основан на образовании соединений хиноидной структуры, окрашивающихся в красный цвет, при действии сильных окислителей (концентрированной азотной кислоты) на токоферол.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные.

Реактивы:

1. Токоферол (витамин Е), 1 % масляный раствор;

2. Кислота азотная, концентрированная.

Ход работы: В сухую пробирку налить 5 капель 1% раствора токоферола, прибавить 10 капель концентрированной азотной кислоты и встряхнуть. После отстаивания эмульсии отметить появление красного окрашивания в верхнем слое.

Вывод:

Работа № 37. Качественная реакция на викасол с щелочным раствором цистеина.

Принцип метода. Викасол – синтетический аналог витамина К₁ - в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, часовое стекло.

Реактивы:

1. Цистеин, 0,025 % водный раствор;
2. Викасол, 0,05 % раствор;
3. Едкий натр, 10 % раствор.

Ход работы. На сухое часовое стекло наносят 5 капель раствора викасола, добавляют 5 капель 0,025 % раствора цистеина и 1 каплю 10 % раствора едкого натра. Появляется лимонно-желтое окрашивание.

Вывод.

Работа № 38. Качественные реакции на витамин РР.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки на 1,0 или 2,0 мл, скальпель.

Реактивы:

1. Витамин РР, сухой порошок;
2. Бикарбонат натрия, 10 % раствор;
3. Гидросульфат натрия ($\text{NaHSO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0,5 % раствор свежеприготовленный;
4. Витамин РР, 0,1 % раствор;
5. Уксуснокислая медь $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$, 5 % раствор.

38.1. Реакция с гидросульфитом натрия.

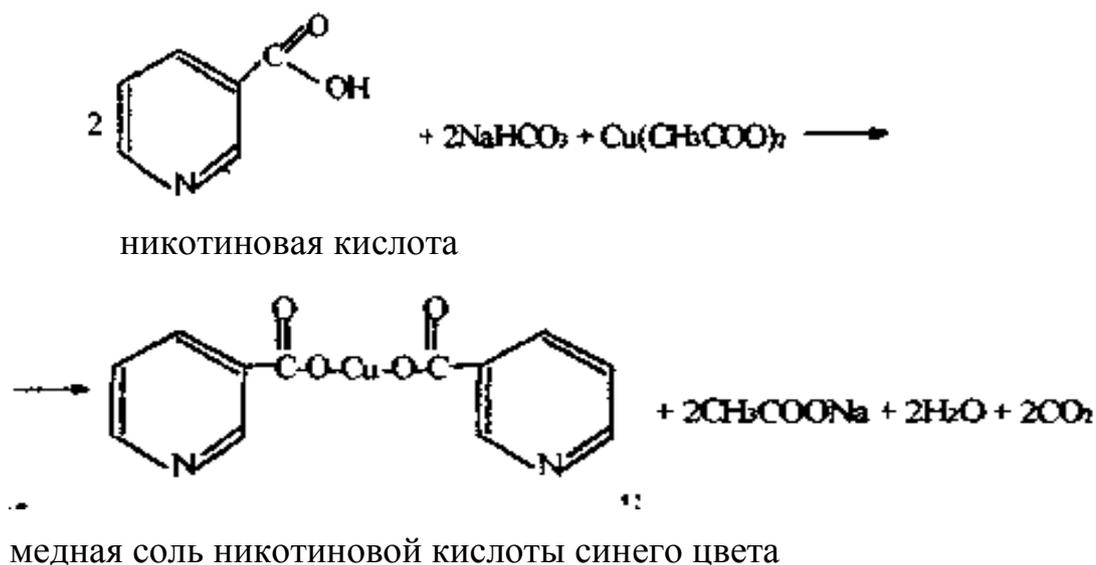
Принцип метода. Под действием гидросульфита натрия происходит частичное восстановление никотинамида с образованием 1,4-дигидропиридинпроизводного, окрашенного в желтый цвет.

Ход работы. В пробирку на кончике скальпеля поместить порошок витамина РР, прилить 0,5-1,0 мл 10 % раствора бикарбоната натрия и 0,5-1,0 мл свежеприготовленного 5 % раствора гидросульфита натрия. Отметить появление продукта восстановления витамина РР желтого цвета.

38.2. Реакция с раствором уксуснокислой меди.

К 1 мл 0,1% раствора никотиновой кислоты добавить 1 мл 10 % раствора бикарбоната натрия, прилить равный объем 5 % раствора уксуснокислой меди.

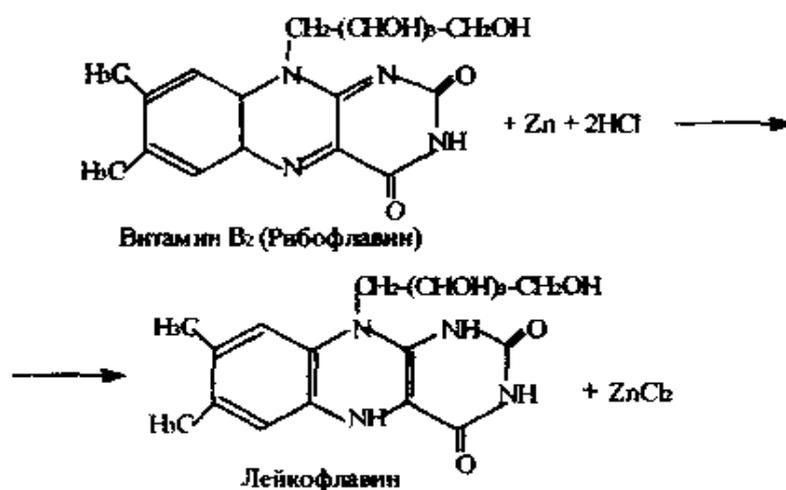
Отметить появление голубого окрашивания и выпадения осадка медной соли синего цвета, образующегося по следующей реакции:



Вывод.

Работа № 39. Реакция восстановления рибофлавина.

Принцип метода. Реакция основана на способности рибофлавина восстанавливаться. Окрашенный в желтый цвет рибофлавин при восстановлении приобретает вначале розовый цвет, а затем обесцвечивается, так как восстановленная форма витамина В₂ бесцветна. Механизм реакции может быть представлен следующим уравнением:



Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные.

Реактивы:

1. Рибофлавин, 0,025 % раствор;
2. Кислота соляная, концентрированная;
3. Цинк металлический, гранулированный.

Ход работы. 10 капель 0,025 % раствора рибофлавина налить в пробирку, добавить туда же 5 капель концентрированной соляной кислоты и поместить небольшой кусочек металлического цинка. Выделяющийся водород восстанавливает рибофлавин, и раствор изменяет окраску из желтой в красную и розовую, а затем обесцвечивается.

Вывод.

Работа № 40 . Качественная реакция на витамин В₆.

Принцип метода. Витамин В₆ при взаимодействии с раствором хлорного железа образует комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные.

Реактивы:

1. Витамин В₆ , 1 % раствор;
2. Хлорное железо (FeCl₃), 1 % раствор

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора витамина В₆ приливают равное количество 1% раствора хлорного железа и перемешивают. Развивается красное окрашивание.

Вывод.

Работа № 41. Определение тиамина и рибофлавина флуориметрическим методом в поливитаминных препаратах.

Оборудование: штатив с пробирками, мерный цилиндр вместимостью 50 мл; пипетки на 2 и 5 мл, ступка с пестиком, флуороскоп или флуориметр.

Реактивы:

1. Соляная кислота, 0,1 М раствор*;
2. Окислительная смесь (к 8 мл 1 %-ного гексацианоферрата(III) калия

(красная кровяная соль) приливают 20 мл 30 % раствора едкого натра, перемешивают);

3. н-бутанол;

4. Тиамин, стандартный раствор в концентрации 10 мкг/мл*;

5. Рибофлавин, стандартный раствор в концентрации 0,005 мг/мл.

Исследуемый материал: драже поливитаминов.

41.1. Определение рибофлавина.

Принцип метода. Метод основан на способности рибофлавина давать в ультрафиолетовых лучах желто-зеленую флюоресценцию, интенсивность которой зависит от концентрации рибофлавина.

Ход работы. Экстракт готовится как в предыдущей работе.

В 3 пробирки добавить:

1. Контроль - 7 мл воды.

2. Опыт - 2 мл экстракта драже + 5 мл воды.

3. Стандарт - 1 мл стандартного р-ра + 5 мл воды.

Поместить пробирки в штатив флуороскопа и сравнить флюоресценцию в 3-х пробирках.

Клинико-диагностическое значение работы. Флуориметрические методы определения тиамина и рибофлавина применяются для определения этих витаминов в пищевых продуктах, лекарственных растениях и готовых лекарственных препаратах, а также для изучения обеспеченности ими организма. Обеспеченность этими витаминами может быть определена по их уровню в крови и по экскреции с мочой. Низкое содержание витаминов в организме наблюдается при гиповитаминозах, болезнях печени, сердечно-сосудистых заболеваниях, заболеваниях желудочно-кишечного тракта и других патологических состояниях.

Вывод.

Работа № 42. Количественное определение аскорбиновой кислоты по Тильмансу.

Принцип метода. Метод основан на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в кислой среде имеет красную окраску, а при восстановлении обесцвечивается, в щелочной среде окраска синяя. Реакцию проводят в кислой среде для предотвращения разрушения витамина С.

Оборудование: пипетки вместимостью 5 и 10 мл, мерная колба на 100 мл; воронка, вата, аптечные весы с разновесом, микробюретка, скальпель, ступки с пестиком, колбы для титрования.

Реактивы:

1. Соляная кислота, 2 % раствор;
2. Соляная кислота, 10 % раствор;
3. 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ), 0,001М раствор.

Исследуемый материал: капуста, картофель, лекарственные растения, моча.

Химизм реакции:



А. Определение содержания аскорбиновой кислоты в капусте.

Отвешивают 1 г капусты на весах, растирают в ступке с 2 мл 10% раствора HCl, приливают 8 мл дистиллированной воды и гомогенат фильтруют. Отмеряют в колбочку для титрования 2 мл фильтрата, добавляют 10 капель 10% раствора HCl и титруют 0,001 н раствором 2,6-дихлорфеиолиндофенола до розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 сек.

Производят расчет содержания витамина С в 100 г капусты по формуле:

$$X = \frac{0,088 \times A \times \Gamma \times 100}{B \times B}, \text{ где}$$

X - содержание аскорбиновой кислоты в мг на 100 г продукта;

0,088- содержание аскорбиновой кислоты, мг;

A - результат титрования 0,001 н раствором 2,6-дихлорфеиолиндофенолом, мл;

B - объем экстракта, взятый на титрование, мл;

B - количество продукта, взятое для анализа, г;

Г - общее количество экстракта;

100- пересчет на 100 г продукта.

Вывод.

Б. Определение витамина С в картофеле.

Отвешивают 5 г картофеля на весах, растирают в ступке с 20 каплями 10% раствора HCl (чтобы картофель не темнел), постепенно приливают 15 мл дистиллированной воды. Полученную массу сливают в колбочку для титрования, ополаскивают ступку водой, сливают ее в колбочку для титрования и титруют 0,001 н раствором 2,6-дихлорфеиолиндофенола до розовой окраски.

Вычисляют содержание аскорбиновой кислоты по формуле, приведенной выше.

Содержание аскорбиновой кислоты в 100 г капусты составляет 25-60 мг, в 100 г шиповника - 500-1500 мг, в 100 г хвои - 200-400 мг, в 100 г картофеля - 1-5 мг.

Вывод:

В. Определение витамина С в лекарственных растениях.

Ход работы. На аптечных весах берут навески лекарственного сырья (листья крапивы, цветы тысячелистника и др.) по 0,5 г, шиповник, очищенный от семян – 0,2 г. Исследуемый материал растирают в ступке с 5 мл 2 % раствора НС1. Вытяжку фильтруют через тонкий слой ваты в мерную колбу на 100 мл. Извлечение витамина С из той же навески повторяют 3 раза с 5 мл соляной кислоты, фильтруя каждый раз полученную вытяжку в ту же мерную колбу. Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой. Для титрования отбирают 10 мл вытяжки в стаканчик и титруют 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски, сохраняющейся в течение 90 сек.

Содержание витамина С в растительном сырье (кг) производят по формуле:

$$X = \frac{0,088 \times A \times 100 \times 1000}{10 \times B}, \text{ где}$$

X – содержание аскорбиновой кислоты в мг/кг;

0,088- масса аскорбиновой кислоты, соответствующая 1 мл 0,001н раствора 2,6 - ДХФИФ, мг;

A - результат титрования 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолом, мл;

B - навеска исследуемого материала, г;

100- разведение взятой пробы;

1000 – коэффициент пересчета на 1 кг сырья;

10 – объем жидкости, взятый на титрование, мл.

Результаты исследования оформить в виде таблицы и сделать вывод о значении исследованного растительного материала как источника витамина С. В выводе указать, целесообразно ли применение данного лекарственного растения с целью профилактики С-витаминной недостаточности.

Материал	Навеска, г	Объем 2,6-ДХФИФ	Содержание аскорбиновой кислоты, мг/кг

Вывод:

Г. Определение содержания аскорбиновой кислоты в моче.

В колбочку отмеривают 10 мл мочи, приливают 10 мл дистиллированной воды, перемешивают, подкисляют 20 каплями 10% раствора HCl и титруют 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски, устойчивой в течение 30 сек.

Содержание аскорбиновой кислоты в моче рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{0,088 \times A \times B}{B}, \text{ где}$$

X - содержание аскорбиновой кислоты, мг/сут.; 0,088- содержание аскорбиновой кислоты, мг;

A - результат титрования 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, мл;

B - объем мочи, взятый для титрования, мл;

B - среднее суточное количество мочи. Для женщин среднее суточное количество мочи составляет 1200 мл, для мужчин – 1500 мл. При нормальной обеспеченности организма витамином С содержание витамина в суточном объеме мочи в среднем 20-40 мг.

Вывод.

Д. Определение содержание аскорбиновой кислоты в слюне.

В колбочку вносят 2 мл исследуемой слюны, 20 мл дистиллированной воды, 0,5 мл ледяной уксусной кислоты, содержимое перемешивают. Смесь отфильтровывают 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до слабо розовой окраски.

Содержание аскорбиновой кислоты вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0,088 \times A \times 100}{2}, \text{ где}$$

X - содержание аскорбиновой кислоты в мг/100 мл.

A - количество мл индикатора, пошедшего на титрование (1 мл 0,001 н раствора индикатора соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты).

Содержание аскорбиновой кислоты в слюне в норме составляет 0,1 мг/100 мл.

Вывод.

Работа № 43. Количественное определение витамина Р в чае по Левенталю.

Принцип метода. В основе метода лежит способность рутина окисляться перманганатом калия. В качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом калия после того, как окислится весь рутин (флавоноид).

Оборудование: стаканчики или колбочки, пипетка вместимостью 10 мл, микробюретка.

Реактивы:

1. Перманганат калия, 0,05 н. раствор;

2. Индикатор индигокармин, 0,1 % раствор.

Исследуемый материал: чай или готовый экстракт.

Ход работы. К 100 мг чая приливают 50 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию в течение 5 мин. 10 мл экстракта чая отмеривают в колбочку, добавляют 10 мл дистиллированной воды, 5 капель 0,1 % раствора индигокармина (появляется синее окрашивание). Титруют из микробюретки 0,05 н раствором $KMnO_4$ до появления устойчивой желтой окраски.

Содержание витамина Р в чае рассчитывают по следующей формуле:

$$X = \frac{3,2 \times A \times V \times 100}{V_2 \times P \times 1000}, \text{ где}$$

X - содержание витамина Р в образце, в %;

3,2 - стандартный пересчетный коэффициент (экспериментально установлено, что 1 мл 0,05 н раствора KMnO_4 окисляет 3,2 мкг рутина);

A - результат титрования 0,05 н раствором перманганата калия, мл;

V - объем, в котором растворена взятая для анализа навеска, мл;

100 - общее количество вещества для расчета процентного содержания, г;

V_2 - объем раствора, взятого для титрования, мл;

P - навеска, мг;

1000 - перевод микрограммов в миллиграммы.

Практическое значение определения витаминов С и Р. Определение содержания аскорбиновой кислоты и рутина в пищевых продуктах и лекарственных растениях необходимо для составления правильного рациона, удовлетворяющего потребность организма в этих витаминах. Богаты витамином С и Р плоды шиповника, чёрной смородины, цитрусовых и т.д. Аскорбиновая кислота применяется для профилактики гиповитаминоза и простудных заболеваний, для лечения воспалительных процессов, атеросклероза. Она способствует усилению регенеративных процессов. Определение аскорбиновой кислоты в крови и моче используется для выявления состояния гиповитаминоза. Аскорбиновая кислота участвует в окислительно-восстановительных процессах при синтезе стероидных гормонов, обмене ароматических аминокислот, созревании коллагена. Витамины С и Р являются эффективными водорастворимыми антиоксидантами и защищают клетки от повреждения свободными радикалами. Терапевтическое действие витамина С гораздо более эффективно в присутствии витамина Р. При недостатке витамина Р у человека повышается проницаемость и ломкость капилляров, что проявляется точечными кровоизлияниями, кровоточивостью дёсен.

Вывод:

**Контрольные вопросы к разделу
«Витамины»**

1. С помощью каких реакций можно провести качественное открытие витамина А в рыбьем жире?
2. В чем заключается принцип метода количественного определения аскорбиновой кислоты по Тильмансу?
3. Каково практическое значение определения витаминов С и Р в пищевых продуктах и лекарственных растениях?
4. Охарактеризуйте практическое значение определения витамина С в крови и моче.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная:

1. Биологическая химия: учебник для студ. мед. вузов Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М.: Медицина, 2004. - 704 с. - (Учебная литература для студентов медицинских вузов). - Библиогр.: с. 679. - Предм. указ.: с. 680-704. - ISBN 5-225-04685-1 (в пер.)
2. Биологическая химия: руководство к самостоятельной работе студентов: в 2-х ч.: Ч. 1. Ф. Х. Камилов, Ш. Н. Галимов, Н.Т. Карягина и др. Авт. коллектив.- Уфа: БГМУ, 2010. - Рек. УМО по мед. и фармац. образованию вузов России в качестве учебного пособия. Ч. 1. - 2010. - 176 с.
3. Биологическая химия: руководство к самостоятельной работе студентов: в 2-х ч.: Ч. 2. Ф. Х. Камилов, Ш.Н. Галимов, Н.Т. Карягина и др. Авт. коллектив.- Уфа: БГМУ, 2010. - Рек. УМО по мед. и фармац. образованию вузов России в качестве учебного пособия. Ч. 2. - 2010. - 173 с.
4. Биологическая химия: учебник для студ. мед. вузов А. Я. Николаев - М.: МИА, 2004. - 565 с. - Предм. указ.: с. 551-565. - ISBN 5-89481-219-4 (в пер.)

Дополнительная:

1. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами: учеб. пособие для студентов мед. и фармац. вузов. Под ред. Е.С. Северина, А.Я. Николаева.- М.: ГЭОТА МЕДИЦИНА, 2001.-448 с.- (XXI век).- ISBN 5-9231-0053-3 М. 2008.
2. Биохимия: Учебник Под ред. Е.С. Северина.М.: ГЭОТАР-МЕД, 2006, 2008.-768 с.
3. Номенклатура и классификация ферментов. Коферменты и кофакторы: учеб. пособие //А.А. Байгильдина, Т.Г. Терегулова, Ф.Х. Камилов Уфа: Здравоохранение Башкортостана, 2005. - 72 с. - Библиогр.: с. 72. - ISBN 5-8372-0114-9
4. Клиническая биохимия: учебное пособие для вузов В.Н. Бочков и др. (ред. В. А. Ткачук). М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. - 506 с. : табл. - Авт. указ. на обороте тит. л. - Библиогр.: с.478 . - Предм. указ.: с. 503-506. - Термин. словарь: с. 479-502. - ISBN 5-9231-0413-X (в пер.)

5. Биологическая химия: руководство к самостоятельной работе студентов: в 2-х ч.: Ч. 1,2. [Электронный ресурс]: учебное пособие ГОУ ВПО БГМУ сост.: Ф. Х Камиллов, Ш. Н. Галимов, Н. Т. Карягина и др. // Электронная учебная библиотека: полнотекстовая база данных / ГОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет; авт.: А.Г. Хасанов, Н.Р. Кобзева, И.Ю. Гончарова. Электрон. дан. – Уфа: БГМУ, 2009. – URL: <http://92.50.144.106/jirbis/>.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справочник: В 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.
2. Биохимия: руководство к практическим занятиям: учебное пособие / Под ред. проф. Н.Н. Чернова – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2009. – 240с.
3. Строев Е.А., Макарова В.Г., Матвеева И.В. Практикум по биологической химии: учебное пособие.-М.: ООО «Издательство» Медицинское информационное агентство», 2012. – 384с.
4. Терехина Н.А., Боровик Г.А., Поносов В.Л., Реук С.Э., Созинова Г.М. Биологическая химия: учебное пособие.- 2-е изд., стереот.-Пермь: ГОУ ВПО ПГМА им. акад. Е.А. Вагнера, 2010.-91с.
5. Поступаев В.В., Рябцева Е.Г., Литонян З.М., Кузнецова С.В. Руководство к практическим занятиям по биохимии: учебное пособие, в 2-х частях. – Хабаровск: Изд-во ДалГМУ, 2005.
6. Корочанская С.П., Сторожук П.Г., Быков И.М. Методические разработки к лабораторным занятиям по биологической химии, в 2-х частях.- Краснодар, 2005.
7. Биохимический практикум: учебное пособие / Под ред. Д.М. Никулиной – Астрахань, 2007 – 145с.

Журналы по биохимии:

1. Биомедицинская химия: Науч.- практ. журнал РАМН. – Основан в 1956 г. – 6 номеров в год.- М.: ГУНИИ биомедхимии. до 2003 г. «Вопросы мед. химии».
2. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии: Науч.- практический журнал. – Основан в 1998 г. – М.:Медицина. – 12 номеров в год.
3. Клиническая лабораторная диагностика: Научно-практ. ж. МЗ РФ; науч. Общество клин. лаб. диагн. РФ. - Ежемес. ж. Основан в 1955 г. До 1992 г. - Лабораторное дело. - М.: Медицина.

Интернет сайты:

1. Электронный ресурс: <http://en.wikipedia.org/>.
2. Электронный ресурс: <http://revjlution.allbest.ru/>
3. Электронный ресурс: <http://www.eridition.ru/>

4. Электронный ресурс: <http://fk.kture.kharkov.ua/>
5. Электронный ресурс: [http:// revjlution.allbest.ru/](http://revjlution.allbest.ru/)
6. Электронный ресурс: <http://www.5ballov.ru/>
7. Электронный ресурс: <http:// www.eridition.ru/>
8. Электронный ресурс: <http://www.bulanoff.ru/>
9. Электронный ресурс: <http://www.ruzcircus.ru/>
10. Электронный ресурс: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
11. Электронный ресурс: <http:// pubs.rsc.org/>
12. Электронный ресурс: <http:// www.medscape.com>
13. Электронный ресурс:
<http://www.btec.cmu.edu/reFramed/main/mainPage.html>
14. Электронный ресурс: <http:// www.la-press.com>
Электронный ресурс: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzym>
15. Lippincott Proprietary Title Collection [Electronic resource]: data base of electronic journals.- Electronic text data. New York: Ovid Technologies, Inc., [2012]. – URL: <http://ovidsp.ovid.com>
16. LWW Medical Book Collection 2011 [Electronic resource]: data base of electronic books in medicine and nursing. – Electronic text data. New York: Ovid Technologies, Inc., [2011]. – URL: <http://ovidsp.ovid.com>

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Некоторые референтные значения биохимических показателей жидких сред организма

Показатели крови:	
Белок, общий (в сыворотке крови)	60 – 85 г/л
Альбумин (в сыворотке крови)	35-50 г/л
Протеинограмма сыворотки крови:	
Альбумины	52-62 %
Альфа-1-глобулины	2,7 – 5,1 %
Альфа-2-глобулины	7,3 – 10 %
Бета-глобулины	11 – 15 %
Гамма-глобулины	15 – 21,4 %
Липопротеины плазмы крови:	
ХМ	0,1 – 0,5 г/л
ЛПОНП	0,8 – 1,5 г/л
ЛПНП	3 – 4,5 г/л
ЛПВП (общая фракция):	
Мужчины	1,7 – 3,5 г/л
Женщины	2,2 – 4,7 г/л
Холестерин, общий:	
нормальный (желаемый)	< 5,2 ммоль/л
погранично-высокий	5,2 – 6,2 ммоль/л
высокий: мужчины	> 6,2 ммоль/л
женщины	> 6,7 ммоль/л
Холестерин ЛПНП	<3,4 ммоль/л
Холестерин ЛПВП	>1,2 ммоль/л
Триглицериды (в сыворотке)	
Норма	до 1,7 ммоль/л 1,7-2,3
Погранично-высокий уровень	ммоль/л
Жирные кислоты свободные	0,08-0,2 г/л 0,3-0,9 ммоль/л
Сиаловые кислоты	2,0-2,36 ммоль/л
С-реактивный белок	<1,5 мг/л
Гаптоглобин	0,15 – 2,0 г/л
Церулоплазмин	1,3 – 3,3 ммоль/л 0,3-0,58 г/л

Показатели крови:	
Фибриноген	2,0 – 4,0 г/л
Иммуноглобулины:	
Ig G	8,0 – 18,0 г/л
Ig M	0,6 – 3,5 г/л
Ig A	0,9 – 4,5 г/л
Альфа-1-антитрипсин: мужчины	2,1-3,5 кЕД/л
Женщины	2,4-3,8 кЕД/л
Гемоглобин	130 – 160 г/л
Гликозилированный гемоглобин (Hb A1c)	4-6% от общего Hb
Глюкоза в цельной крови (артериальной, капиллярной)	
до 14 лет	3,3 – 5,5 ммоль/л
взрослые	3,9-5,8 ммоль/л
Мочевина, ммоль/л	2,5 – 8,3 ммоль/л
Мочевая кислота	
Мужчины	0,25 – 0,47 ммоль/л
Женщины	0,19-0,43 ммоль/л
Креатинин, мкмоль/л	
Мужчины	45 -115 мкмоль/л 0,7-1,4 мг/дл
Женщины	40 – 85 мкмоль/л 0,5-1,1 мг/дл
Билирубин общий	8,5 – 20,5 мкмоль/л
Аммиак	11,0 – 32,0 мкмоль/л
Са общий	2,25 – 2,6 ммоль/л
Na ⁺ (в сыворотке)	135-145 ммоль/л
K ⁺ (в сыворотке)	3,5 – 5,0 ммоль/л
Активность ферментов в сыворотке крови:	
Аланинаминотрансферазы (АлАТ)	7-40 МЕ/л
Аспартатаминотрансфераза (АсАТ)	10-40 МЕ/л
Альфа-Амилазы	25-220 МЕ/л
Лактатдегидрогеназа	90-280 МЕ/л
Щелочная фосфатаза	39-117 МЕ/л
Кислая фосфатаза	0-6,5 МЕ/л
Активность ферментов в моче:	
Уроамилаза	10-400 МЕ/л

Содержание в моче:	
Мочевины	20 -35 г/сут 430-710 ммоль/сут
Мочевой кислоты	250-750 мг/сут 1,48-4,43 ммоль/сут
Креатинина:	
Мужчины	7,1 – 17,7 ммоль/сут 0,8-2,0 г/сут
Женщины	5,3-13,3 ммоль/сут 0,6-1,8 г/сут
Показатели желудочного сока:	
рН	1,5-2,0
Общая кислотность	40-60 титр. ед.
Свободная НСІ	20-40 титр. ед.
Связанная НСІ	10-20 титр. ед.

**Некоторые референтные значения биохимических показателей
жидких сред организма у детей**

Показатели крови:	
Белок, общий (в сыворотке крови)	
до 1 года	46-76 г/л
≥ 1 года	60-80 г/л
Протеинограмма сыворотки крови:	
Альбумины:	
до 1 года	21-51 г/л
≥ 1 года	37-52 г/л
α ₁ -глобулины	1-4,4 г/л
α ₂ -глобулины	
до 1 года	2,4-12 г/л
≥ 1 года	5-10 г/л
β-глобулины	
до 1 года	1,6-13 г/л
≥ 1 года	6-12 г/л
γ-глобулины	
до 1 года	2,3-9,5 г/л
≥ 1 года	6-16 г/л
Холестерин, общий:	
до 1 года	1,3-4,9 ммоль/л
≥ 1 года	2,8-6,0 ммоль/л
Триглицериды (недоношенные дети)	≤ 0,7 ммоль/л
Жирные кислоты свободные:	
новорожденные	1,2-2,2 ммоль/л
до 14 лет	0,3-1,0 ммоль/л
Гаптоглобин	0,250-1,38 г/л
Церулоплазмин:	
новорожденные	0,05-0,40 г/л
≥ 1 года	0,20-0,60 г/л
Фибриноген:	
новорожденные	1,25-3,0 г/л
≥ 1 года	1,8-3,5 г/л
Иммуноглобулины:	
Ig G	1,8-14,0 г/л
Ig M	0,12-1,7 г/л
Ig A	0,07-4,0 г/л

Показатели крови:	
Гемоглобин:	
новорожденные	150-245 г/л
до 1 года	90-130 г/л
≥ 1 года	108-156 г/л
Глюкоза в артериальной / капиллярной крови:	
до 1 года	2,2-4,4 ммоль/л
≥ 1 года	3,0-5,5 ммоль/л
Мочевина	≤ 8,0 ммоль/л
Мочевая кислота	≤ 370 мкмоль/л
Креатинин	≤ 88 мкмоль/л
Билирубин общий:	
новорожденные	≤ 205 мкмоль/л
дети	≤ 17 мкмоль/л
Аммиак:	
новорожденные	64-107 мкмоль/л
дети	21-50 мкмоль/л
Са общий	2,1-2,6 ммоль/л
Na ⁺ (в сыворотке)	132-147 ммоль/л
K ⁺ (в сыворотке)	3,6-6,1 ммоль/л

Приготовление реактивов

(все реактивы готовятся на дистиллированной воде)

1. *Аммиачный раствор серебра.* К 1-3% раствору нитрата серебра прибавляют концентрированный раствор аммиака до растворения образовавшегося осадка; образуется так называемый аммиачный раствор гидроксида серебра.
2. *Азотнокислое серебро, нитрат серебра, 0,1 н. раствор.* Отвешивают на аналитических весах 16,988 г нитрата серебра, помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют и доливают водой до метки. 0,01 н. раствор готовят из 0,1 н. раствора непосредственно перед употреблением. Титр нитрата серебра устанавливают по 0,01 н. раствору NaCl (0,585 г растворяют в 1 л воды).
3. *Азотнокислое серебро, нитрат серебра, 2% раствор.* К 2 г нитрата серебра добавляют 100 мл воды, затем приготавливают аммиачный раствор серебра.
4. *Азотная кислота, 10% раствор.* В фарфоровую чашку наливают 89 мл дистиллированной воды и осторожно при помешивании стеклянной палочкой вливают из мерного цилиндра 11 мл концентрированной азотной кислоты (удельного веса 1,4).
5. *Анилиновый реактив.* Смешивают 15 частей анилина с 1 частью концентрированной соляной кислоты.
6. *Аммоний молибденовокислый, раствор в азотной кислоте (для качественной реакции на H_3PO_4).* Первый способ (из молибденовокислого аммония): 75 г $(NH_4)MoO_4$ растворяют в 500 мл воды и прибавляют 500 мл концентрированной HNO_3 . Полное растворение наступает после добавления HNO_3 . Второй способ (из молибденовой кислоты): получают в 200 мл 10% раствора аммиака. В полученный раствор небольшими порциями при сильном встряхивании вливают 750 мл концентрированной HNO_3 (удельный вес 1,2). Через несколько дней реактив сливают с осадка.
7. *Аммоний молибденовокислый, раствор в H_2SO_4 (молибденовый реактив для колориметрического определения H_3PO_4).* 50 г (или 25 г) молибденовокислого аммония растворяют приблизительно в 600 мл дистиллированной воды и, если нужно, фильтруют. Раствор переносят в мерную колбу

- на 1 л. В другой колбе к 250 мл дистиллированной воды приливают 150 мл концентрированной серной кислоты. Второй раствор соединяют с первым и по охлаждении доливают водой до метки.
8. *Ацетатный буфер, pH 5,0.* Отвешивают на технических весах 45 г сухого х. ч. едкого натра и растворяют его сначала в 400-500 мл воды. Этот раствор щелочи после охлаждения количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1 л, добавляют 115 мл ледяной уксусной кислоты и доводят водой до метки.
 9. *Ацетатный буфер, pH 4,8.* Готовят два раствора: ацетат натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 0,2 н. раствор, и уксусную кислоту, 0,2 н. раствор. Смешивают 480 мл 0,2 н. раствора ацетата натрия и 520 мл 0,2 н. раствора уксусной кислоты и проверяют pH. Ацетат натрия, 0,2 н. раствор: растворяют в мерной колбе вместимостью 1 л 27,22 г ацетата натрия и доводят объём до метки водой.
 10. *Бензидин, 0,2% спиртовой раствор.* 0,2 г бензидина растворяют в 100 мл 96°С этилового спирта. Хранят в темной склянке не более недели.
 11. *Бензидиновый реактив.* 0,2 г бензидина растворяют в 20 мл ледяной уксусной кислоты (1% раствор бензидина в ледяной уксусной кислоте).
 12. *Бензидин, 1% раствор.* 1 г бензидина растворяют в ледяной уксусной кислоте и доводят объём до 100 мл; хранят в холодильнике в тёмной склянке с притертой пробкой (для растворения используют бензидин основной ($\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$)).
 13. *Бромная вода.* Воду насыщают бромом. Бром берут из расчёта 3,1 г (1мл) на 100 мл воды. Растворение производят под тягой!
 14. *Биуретовый реактив.* Растворяют 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (виннокислый натрий – калий, или сегнетова соль) в 50 мл воды при энергичном перемешивании, приливают 30 мл 10% раствора NaOH (свободного от Na_2CO_3), добавляют 0,1 г KI для предотвращения самопроизвольного восстановления и доводят раствор водой до объёма 100 мл (хранят в холодильнике в парафинированной склянке).
 15. *Бромфеноловый синий.* В 1 л 5% раствора уксусной кислоты растворяют 2 г хлорида аммония, затем вносят 10 г каломели и 1 г кристаллического бромфенолового синего, тщательно перемешивают и оставляют стоять на сутки, периодически перемешивая, а на следующий день фильтруют.

- Другие способы приготовления растворов для окраски электрофореграмм: 1) бромфеноловый синий – 0,5 г, сулема – 10 г, уксусная кислота ледяная – 20 мл, дистиллированная вода - 980 мл (лучший способ); 2) бромфеноловый синий – 0,1 г, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 50 г, уксусная кислота ледяная – 50 мл, дистиллированная вода – 900 мл, 3) кислый сине-черный краситель (аналогичный амидо черному 10 Б) – 0,2 г, уксусная кислота ледяная – 100 мл, метиловый спирт – 900 мл.
16. *Бария гидроокись, насыщенный раствор.* 38 г гидроокиси бария растворяют в 1 л дистиллированной прокипяченной (для удаления CO_2) воды.
 17. *Белок яичный неразведенный.* Белок куриного яйца фильтруют через марлю. После фильтрования теряется тягучесть белка (обработку желтка см. № 33).
 18. *Белок яичный, 1% раствор* белок куриного яйца фильтруют через марлю. Один объём профильтрованного белка смешивают с 10-12 объёмами дистиллированной воды, тщательно перемешивают и фильтруют. Белок куриного яйца содержит от 10 до 13% альбумина и глобулина. При разведении водой глобулин выпадает в осадок и его отделяют путём фильтрования.
 19. *Вытяжка из хрена.* 100 г измельченного на терке хрена настаивают в течение 3-4 часов со 100 мл дистиллированной воды (или со 100 мл 0,05% раствора углекислого натрия.) Вытяжку время от времени встряхивают и фильтруют через двойной слой марли.
 20. *Вероналовый барбиталовый буфер, рН 8,6, с ионной силой 0,05.* В 300 мл воды растворяют 10,32 г барбитал-натрия, добавляют 1,84 г барбитала и, помешивая, нагревают на водяной бане до растворения барбитала. Затем объём раствора доводят водой до 1 л.
 21. *Веронал – ацетатный, барбитал– ацетатный буфер, рН 8,6.* В 300 мл воды растворяют 4,3 г барбитала, 0,95 г едкого натра и 3,24 г ацетата натрия. К раствору приливают 30 мл 0,1 М раствора HCl и доводят объём водой до 1 л.
 22. *Гипосульфит (тиосульфит) натрия, 0,005 н. раствор.* Готовят перед употреблением из 0,1 н. фиксаля. Отмеривают 5 мл 0,1 н. раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. При отсутствии фиксаля берут 25 г тиосульфата натрия, растворяют в 1 л хо-

рошо прокипяченной и охлажденной воды. Разведение и установку титра делают через 10 дней после получения раствора. Титра проверяют каждый раз по титрованному раствору $KJ\text{O}_3$. Для приготовления 0,005 н. раствора йодата калия отвешивают 0,1782 г $KJ\text{O}_3$, растворяют в мерной колбе вместимостью 1 л бидистиллированной водой и приливают до метки. Проверка титра раствора тиосульфата натрия: к 2 мл $KJ\text{O}_3$ прибавляют 2 мл 3% раствора тройного хлор-цинк-йодистого раствора, 2 капли раствора крахмала и титруют выделившийся йод раствором тиосульфата из микробюретки до обесцвечивания.

23. *Гипобромит натрия (NaOBr)*, 2 % раствор: 2 г брома (0,65 мл) под тягой растворить в 100 мл 5 % раствора NaOH при охлаждении льдом (снегом).
24. *Гваяковая смола, 1% спиртовой раствор*. 1 г гваяковой смолы растворяют в 100 мл 50% спирта и сохраняют в склянке из темного стекла.
25. *Гидрохинон, 1% раствор*. 1 г гидрохинона растворяют в 100 мл дистиллированной воды и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Раствор должен быть почти бесцветным. При длительном стоянии он приобретает коричневую окраску и тогда уже не годен к употреблению.
26. *Глюкоза, стерильный 40% раствор*. 40 г глюкозы растворяют при нагревании в 60 мл дистиллированной воды. Раствор фильтруют через складчатый фильтр и переливают в баночку с притертой пробкой. Пробку обвязывают пергаментной бумагой. Раствор стерилизуют в течение 30 минут. Если нет стерилизатора, пользуются водяной баней.
27. *Диметиламинобензол, 0,5 % раствор (индикатор)*. 0,25 г п-диметиламинобензола растворяют в 50 мл этилового спирта. Зона перехода при $\text{pH}=2,9 - 4,0$ (красный – желтый).
28. *Дифениламин, раствор в H_2SO_4* . 2 г дифениамина растворяют в 100 мл концентрированной H_2SO_4 .
29. *Дифениаминовый реактив*. Отвешивают 100 мг дифениламина и растворяют в 10 мл концентрированной уксусной кислоты, добавляют 0,28 мл концентрированной серной кислоты. Чтобы знать, сколько капель серной кислоты нужно добавить, поступают так: в мерную сухую пробирку капают из глазной пипетки 1 мл концентрированной H_2SO_4 и записывают количество капель, то же повторяют еще раз, берут среднее, т.е. опреде-

ляют сколько капель в 1 мл концентрированной H_2SO_4 ; рассчитывают, сколько капель H_2SO_4 в 0,28 мл концентрированной H_2SO_4 , и это количество добавляют в реактив.

30. *Дифениламинный реактив*. 1 г дифениламина, дважды перекристаллизованного из 70% спирта или петролейного эфира, растворяют в смеси 2,75 мл концентрированной H_2SO_4 и 100 мл ледяной уксусной кислоты.
31. *Диазореактив* для количественного определения билирубина. Диазореактив №1 : 5 г сульфаниловой (чистой, безводной) кислоты растворяют в небольшом количестве воды (300 – 400 мл) при легком нагревании (под струей горячей воды), приливают 15 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и только после полного растворения и охлаждения доводят водой до объёма 1 л. Диазореактив № 2: 0,5% раствор нитрата натрия $NaNO_2$ готовят *ex tempore*.
32. *2,4-Динитрофенилгидразин*, 0,1 % раствор. 20 мл концентрированной хлористоводородной кислоты доводят водой до объёма 100 мл (приблизительно 2 н. HCl). К 100 мг 2,4-динитрофенилгидразина добавляют постепенно 100 мл приготовленного 2 н. раствора хлористоводородной кислоты до полного растворения 2,4-динитрофенилгидразина. Раствор фильтруют и хранят в холодильнике; если 2,4-ДНФГ плохо растворяется, то оставляют раствор на сутки, затем взбалтывают и нагревают под струей горячей воды.
33. *2,6 – Дихлорфенолиндофенол, натриевая соль*, 0,001 н. раствор. Для приготовления этого реактива применяют буферную фосфатную смесь реактива применяют буферную фосфатную смесь (1/15 М) по Серенсену, так как индикатор в водном растворе довольно быстро разрушается. Для этого берут водные растворы KH_2PO_4 – 9,078 г в 1 л и $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ – 11,867 г в 1 л. Растворы хранят отдельно. Затем их смешивают в соотношении 2:3; рН смеси 6,9-7,0. Отвешивают 0,25 г красителя, приливают 700 мл воды, взбалтывают и добавляют 300 мл буферной смеси. На следующий день раствор отфильтровывают и тщательно перемешивают. Определяют титр по титрованному раствору соли Мора. Для этого точно отмеривают в маленькую коническую колбочку в 10 мл индикатора, добавляют 5 мл насыщенного раствора оксалата аммония и титруют из микробюретки 0,01 н. раствором соли Мора до тех пор, пока голубой цвет

- индикатора не сменится соломенно-желтым. Для получения 0,01 н. раствора соли Мора 3,92 г соли растворяют в 1 л 0,02 н. раствора серной кислоты. Титр соли Мора устанавливают по 0,01 н. раствору перманганата калия.
34. *2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,001 Н раствор.* 0,5 г мелкоистолченного 2,6-дихлорфенолиндофенола растворяют в 700 мл горячей дистиллированной воды. После охлаждения или на следующий день фильтруют и добавляют 300 мл фосфатного буфера с рН 6,98-7,0. Титр раствора устанавливают по аскорбиновой кислоте. Раствор хранят в склянке из темного стекла. При продолжительном хранении раствор изменяется. Окисление аскорбиновой кислоты происходит замедленно и затрудняется определение конца титрования.
35. *Желток яичный (порошок).* Желток куриного яйца намазывают тонким слоем на стеклянные пластинки размером 20×20 см или 30×20 см и высушивают на воздухе. Сухую массу соскабливают ножом и порошок сохраняют в сухом прохладном месте. Вместо сухого желтка можно пользоваться продажным яичным порошком.
36. *Желудочный сок активный (1% раствор пепсина в 0,5% растворе НСІ)* 10 г продажного пепсина растворяют в 1 л 0,5% раствора НСІ. Для приготовления 0,5% раствора НСІ отмеривают цилиндром 11 мл концентрированной НСІ и разбавляют дистиллированной водой до 1 л.
37. *Желудочный сок (нормальный).* На 1700 мл воды берут 37 г хлорида натрия, 7 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, 2 мл молочной концентрированной кислоты (40%) и 12г пептона. Фильтруют желудочный сок через два слоя марли и хранят в холодильнике.
38. *Желудочный сок (патологический).* К 1л желудочного сока, но без НСІ добавляют 10 мл молочной кислоты (40%) и 13,6мл цитратной крови, добавляя перед каждым определением по 10 капель. Раствор патологического желудочного сока хранят в темной склянке в холодильнике.
39. *Желудочный сок для титрования.* Для приготовления желудочного сока с нормальной, повышенной и пониженной кислотностью и с отсутствием соляной кислоты заготавливают следующие реактивы: 1) 100 мл НСІ в разведении 1:10; для этого к 10 мл концентрированной НСІ добавляют 90 мл дистиллированной воды; 2) 25 мл молочной кислоты в разведении

- 1:10; для этого к 2,5 мл концентрированной молочной кислоты добавляют 22,5 мл дистиллированной воды; 3) 2 л 1% раствора желатина растворяют сначала при нагревании в небольшом количестве воды и полученный раствор разбавляют дистиллированной водой до 2 л; 4) 5 г кристаллического однозамещенного фосфорнокислого натрия (Na_2HPO_4).
40. *Желудочный сок с нормальной кислотностью.* Смешивают приготовленные реактивы в следующих соотношениях: 0,5% раствора желатины 500 мл, HCl (1:10) 22,5, молочной кислоты (1:10) 5 мл, Na_2HPO_4 кристаллического 1,25 г. В результате анализа получают приблизительно следующие величины: общая кислотность 52-53, свободная HCl 29-30, связанная HCl 14-15.
41. *Желудочный сок с повышенной кислотностью.* Смешивают приготовленные реактивы в следующих соотношениях: 0,5% раствора желатины 500 мл, HCl (1:10) 35 мл, молочной кислоты (1:10) 5 мл, Na_2HPO_4 0,5 г. В результате анализа получают приблизительно следующие величины: общая кислотность 74-76, свободная HCl 54-55, связанная HCl 14-15.
42. *Желудочный сок с пониженной кислотностью.* Смешивают приготовленные реактивы в следующих соотношениях: 0,5% раствора желатины 500 мл, HCl (1:10) 11 мл, молочной кислоты (1:10) 5 мл, Na_2HPO_4 0,5 г. В результате анализа получают приблизительно следующие величины: общая кислотность 25-26, свободная HCl 11-12, связанная HCl 8-9.
43. *Желудочный сок с отсутствием HCl и наличием молочной кислоты.* Смешивают приготовленные реактивы в следующих соотношениях 0,5% раствора желатины 500 мл, молочной кислоты (1:10) 7,5 мл, Na_2HPO_4 0,5 г. В результате анализа получают приблизительно следующие величины: общая кислотность 9,0, свободной HCl нет. Качественная реакция на молочную кислоту положительная.
44. *Желчь.* Свежая желчь может быть заменена продажной сгущенной желчью. К 20 мл продажной сгущенной желчи добавляют 80 мл дистиллированной воды.
45. *Желчь, разведенная 1:2.* Желчь, разведенная 1:2, может быть заменена разведенной продажной желчью. Для этого к 20 мл сгущенной продажной желчи добавляют 280 мл дистиллированной воды.
46. *Железосинеродистый калий, феррицианид калия (красная кровяная соль).* 0,01н. раствор для определения мочевого кислоты. К 3,292 г красной кро-

- вяной соли добавляют 2 г едкого натра и растворяют в 1 л воды. Реактив оттитровывают по мочевой кислоте. Для этого к 1,5 мл стандартного раствора мочевой кислоты приливают 1 мл 20% Na_2CO_3 и 1 мл фосфорновольфрамового реактива. Титруют до исчезновения синего окрашивания и находят, какое количество мочевой кислоты соответствует 1 мл $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.
47. *Инсулин*. Для экономии можно использовать препарат инсулина, срок годности которого окончился.
48. *Йода основной раствор* для определения активности амилазы в сыворотке крови микроэкспресс – методом: 0,25 г кристаллического йода и 0,66 г йодида калия растворяют в 20 мл воды.
49. *Йода рабочий раствор*: основной раствор йода разводят в 50 раз 0,2 н. раствором хлористоводородной кислоты; раствор устойчив в течение 1 ч; готовят непосредственно перед определением.
50. *Йод в растворе йодистого калия. ($\text{I}_2 + \text{KI}$) Люголя раствор*. 1 г йода и 2 г KI растворяют в небольшом количестве воды. После растворения объём жидкости доводят до 100 мл. Для получения 10% или 0,1 % раствора йода количество йода и йодистого калия соответственно увеличивают или уменьшают в 10 раз.
51. *Кадмий хлористый, спиртовой раствор*. Хлористый кадмий (CdCl_2) растирают в ступке и высушивают до постоянного веса в сушильном шкафу при 105-120 °С. Высушенный порошок растворяют в 96 °С спирте из расчета 1,5 г на 100 мл спирта (получают насыщенный раствор).
52. *Калий йодистый, 1% раствор*. 0,1 г KI растворяют в 10 мл дистиллированной воды.
53. *Калий марганцовокислый (насыщенный раствор)*. 10 г KMnO_4 растворяют в 100 мл дистиллированной воды, нагретой до 70° С {растворимость в 100 весовых частях холодной воды (0°С) равна 2,83; в горячей воде (75°С) – 32,35 г; молекулярная масса =158,08}.
54. *Калий железосинеродистый, 0,005 н. раствор*. 1,65 г химически чистого $\text{K}_3\{\text{Fe}(\text{CN})_6\}$ точно отвешивают на аналитических весах, переносят в мерную колбу емкостью 1 л, растворяют в дистиллированной свежeproкипяченной и охлажденной воде, прибавляют 10,6 г безводного углекислого натрия (прокаленного в фарфоровом тигле и охлажденного в эксикаторе)

и объём жидкости доводят водой до метки. Раствор хранят в тёмной бутылке на холоду, титр его не изменяется в течение 2 месяцев. Химически чистый препарат $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ не должен содержать трехвалентного железа и железистосинеродистых соединений. До приготовления титрованного раствора препарат $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ проверяют на чистоту. Для этого 0,250 г $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ растворяют в 5 мл H_2O .

а) К 1 мл 5% раствора $\text{K}_3\{\text{Fe}(\text{CN})_6\}$ добавляют 2 капли 1% раствора H_2SO_4 и 2 капли 1% раствора H_2SO_4 и 2 капли 1% раствора $\text{K}_4\{\text{Fe}(\text{CN})_6\}$. В присутствии трехвалентного железа жидкость окрашивается в синий цвет.

б) К 1 мл 5% раствора $\text{K}_3\{\text{Fe}(\text{CN})_6\}$ добавляют 1 каплю 5% раствора FeCl_3 и 1-2 капли 10% раствора HCl . В присутствии $\text{K}_4\{\text{Fe}(\text{CN})_6\}$ жидкость приобретает синее окрашивание. Обе реакции должны быть отрицательными.

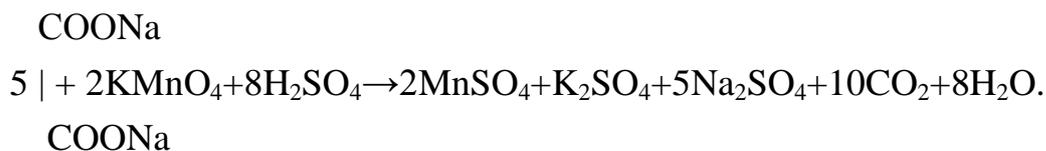
55. *Калий йодноватокислый, основной 0,01 н. раствор.* Готовят из фиксаля или отвешивают на аналитических весах 0,3567 г химически чистого KJO_3 высушенного до постоянного веса при температуре 102°C , растворяют в мерной колбе в 1 л дистиллированной воды.

56. *Калий йодноватокислый, рабочий 0,001 н. раствор.* 10 мл 0,01 н. раствора KJO_3 переносят точной пипеткой в мерную колбу на 100 мл и содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой.

57. *Калий марганцовокислый, 0,01н. и 0,05 н. растворы.* Готовят из фиксаля или из заранее приготовленного 0,1 н. раствора. Для приготовления 0,1 н. растворяют 3,3 г KMnO_4 в 1л дистиллированной воды в склянке из темного стекла. Склянку закрывают пробкой и оставляют на 10-15 дней. за этот срок обычно происходит полное окисление примесей, оказавшихся в растворе, и в дальнейшем раствор хорошо сохраняется, не меняя установившейся концентрации, близкой к 0,1 н. Растворы KMnO_4 меньшей концентрации (0,05 н. или 0,01 н) готовят путем точного разведения (в мерной колбе) исходного 0,1н. раствора хорошо прокипяченной и охлажденной дистиллированной водой. Нормальность полученного раствора устанавливают по раствору щавелевой кислоты или щавелевокислого натрия.

В колбочку отмеривают точно 2 мл 0,01 н. раствора щавелевой кислоты (или щавелевокислого натрия), добавляют 1 мл 10% раствора H_2SO_4 и содержимое колбочки нагревают до $70-90^\circ\text{C}$. Горячий раствор титруют испытуемым

раствором марганцевокислого калия до не исчезающего слабо розового окрашивания. Реакция протекает по следующему уравнению:



По результатам титрования и известной нормальности раствора щавелевокислого натрия (или щавелевой кислоты) вычисляют нормальность и фактор раствора KMnO_4 .

Пример расчета. На титрование 2 мл 0,01 н. раствора $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ с $F=1,07$ пошло в среднем 2,17 мл раствора KMnO_4 .

- а) 2 мл 0,01 н. раствора с $F=1,07=2 \cdot 1,07=2,14$ мл 0,01 н. раствора.
- б) 2,14 мл 0,01 н. раствор $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 2,17 мл – x н. раствор KMnO_4
- в) $x = \frac{0,01 \cdot 2,14}{2,17} = 0,00986$ н.

$$F - \text{KMnO}_4 \frac{2,14}{2,17} = 0,986.$$

Фактор поправки испытуемого раствора вычисляют, беря отношение количества миллилитров исходного раствора к количеству миллилитров испытуемого или беря отношение нормальности испытуемого раствора к нормальности исходного:

$$\text{KMnO}_4 = \frac{0,00986}{0,01} = 0,986.$$

58. *Конгорот, конго-бумага.* 0,2 г конгорот растворяют в 50 мл 50% этилового спирта. В полученный раствор погружают на короткий срок полоски фильтровальной бумаги и развешивают их в помещении с чистым воздухом. Приготовленная бумага должна окрашиваться в сине-фиолетовый цвет при pH 3,0 и ниже и в красный – при pH 5,2 и выше.

59. *Крахмал, 0,5 – 1% раствор (индикатор).* 0,5 или 1 г продажного растворимого крахмала размешивают в 10 мл воды и вливают в 90 мл кипящей воды, кипятят 1-2 минуты и охлаждают. Если пользуются обычным картофельным крахмалом, то раствор его обязательно фильтруют. Раствор хорошо сохраняется месяцами, если к нему прибавить до насыщения (35 г) химически чистого NaCl или 28 г KCl. Способ приготовления растворимого крахмала см. № 58.

60. *Крахмал растворимый, 0,1% раствор.* 1 г продажного растворимого крахмала размешивают в 10 мл дистиллированной воды и вливают в 1 л кипящей воды. Раствор переливают в склянки емкостью 100 мл, которые ставят около бюретки на 25 мл с надписью «Крахмал 0,1% для метода Вольгемута». Для приготовления растворимого крахмала 23 г воздушно-сухого картофельного крахмала помещают в 1 л 1н. раствора HCl и оставляют на 2 недели при комнатной температуре, время от времени помешивая. После настаивания крахмал отфильтровывают, тщательно промывают водой и высушивают при температуре не выше 50°C. Можно получить растворимый крахмал настаиванием с 7,5% раствором HCl при 40°C в течение 3 дней, но в этом случае имеется опасность освобождения редуцирующих групп.
61. *Крахмал, 0,1% раствор (рабочий раствор)* для определения амилазы в сыворотке крови: 100 мг растворимого крахмала суспендируют в 1 мл холодной воды и количественно переносят для растворения в кипящую воду. После охлаждения при комнатной температуре объём доводят до 100 мл водой. Раствор крахмала годен при хранении в холодильнике 5 дней.
62. *Кофеиновый реактив.* 5 г чистого кофеина, 7,5 г бензоата натрия и 12,5 г ацетата натрия растворяют в 70 мл воды при медленном подогревании (не выше 80°C), затем доводят объём до 100 мл водой; срок хранения 2 недели.
63. *Лимонная кислота, 0,1 М раствор (для приготовления фосфатно-цитратного буфера).* Растворяют 21,008 г лимонной кислоты в 1 л прокипяченной и охлажденной дистиллированной воды. Для сохранения в буферные растворы прибавляют несколько кристалликов тимола. Молекулярная масса $C_6H_8O_7 \cdot H_2O = 210,08$.
64. *Медь сернокислая, 7% раствор (для реакции Фелинга).* 70 г химически чистого свежеперекристаллизованного медного купороса растворяют в 1 л дистиллированной воды. Молекулярная масса $CuSO_4 \cdot 5H_2O = 249,69$.
65. *Метиленовая синь, 0,05% водный раствор.* а) 5 мл насыщенного спиртового (2%) раствора метиленовой сини растворяют в 195 мл дистиллированной воды; б) 100 мг метиленовой сини растворяют в 200 мл дистиллированной воды.
66. *Метиленовая синь с формальдегидом.* Растворяют 5 мл насыщенного (2%) спиртового раствора метиленовой сини и 5 мл формалина в 190 мл

- дистиллированной воды. Получают 0,05% раствор метиленовой сини в 1% растворе формальдегида (продажный формалин является 40% раствором формальдегида).
67. *Метиловый красный, 0,02% раствор.* 10 мг метилового красного (метилрот) растворяют в 50 мл водного спирта (30 мл спирта + 20 мл воды). Зона перехода при pH 4,2 – 6,3 (красная – желтая).
68. *α – нафтол 0,1 и 1%.* 0,1 г или 1 г α – нафтола растворяют в 100 мл 70% этилового спирта.
69. *Молибденовый реактив* для определения фосфор-бензоата натрия и 12,5 г ацетата натрия растворяют в 70 мл воды прибавляют 500 мл концентрированной азотной кислоты. Полное растворение наступает после добавления азотной кислоты.
70. *Молибдат аммония, 2,5% раствор* для количественного определения Р по Блюру: 2,5 г молибдата аммония растворяют в 50 мл 10 н. раствора серной кислоты и доводят объём раствора водой до 100 мл.
71. *Молочно-ацетатная смесь.* Свежее цельное молоко (относительная плотность 1,030) смешивают пополам с ацетатным буфером при pH 4,9. В закрытом виде на холоде эта смесь годна свыше 2 нед. Если оставить стоять эту смесь в большой делительной воронке, то можно легко отделить отстоявшийся жир, и смесь получится еще более удобной для работы. При использовании сухого молока (высший сорт, натуральное) берут 2 ½ столовой ложки его на 1 стакан теплой воды и кипятят; смешивают пополам с ацетатным буфером при pH 4,9.
72. *Миллона реактив.* 100 г ртути растворяют в 143 мл концентрированной HNO₃ (удельного веса 1,4) сначала при комнатной температуре, затем при нагревании на водяной бане. Раствор разводят 2 объёмами воды с небольшим количеством 1% раствора KNO₂ или NaNO₂. Через некоторое время жидкость сливают с отстоявшегося осадка. При долгом хранении реактив окисляется.
73. *Моча при алкаптонурии.* При отсутствии патологической в нормальную мочу добавить гидрохинон из расчета 20 г/л.
74. *Моча при мукополисахаридозе.* При отсутствии патологической в нормальную мочу добавить гепарин из расчета 0,05-0,1 г/л.
75. *Моча при фруктозурии.* При отсутствии патологической в нормальную мочу добавить фруктозу из расчета 0,4-0,5 г/л.

76. *Моча, содержащая гомогентизиновую кислоту.* При отсутствии гомогентизиновой кислоты в моче добавить гидрохинон в количестве 10 г на 500 мл.
77. *Мышечная кашица.* Мышечную кашицу готовят из мяса только что забитой крысы, кролика или другого животного. Мясо измельчают ножницами; при больших количествах мяса пользуются мясорубкой.
78. *Натр едкий, 0,1 н. раствор (приготовление из металлического натрия).* Куски металлического натрия очищают фильтровальной бумагой от керосина, срезают сухим ножом внешние части и быстро отвешивают на технических весах 2,5 г. Взвешенные куски немедленно разрезают на чистой бумаге на тонкие пластинки и бросают в колбу емкостью 1 л, в которую налито 2,5 мл этилового спирта (лучше абсолютного). При этом происходит образование алкоголята и жидкость сильно разогревается. Когда все кусочки полностью растворяются, добавляют сначала по каплям, а затем небольшими порциями воду, всего в количестве 1 л. Вода должна быть полностью освобождена от CO_2 . Воду готовят заранее путем длительного кипячения, после которого колбу с водой закрывают пробкой, снабженной отогнутой вниз трубкой, соединенной с хлоркальциевой трубкой с натронной известью, и в таком виде охлаждают. Раствор щелочи из колбы переливают в склянку емкостью 1 л с пробкой. В отдельных пробах устанавливают титр приготовленного раствора по янтарной или щавелевой кислоте. Для этого отмеривают точной пипеткой 5 мл янтарной или щавелевой кислоты, прибавляют 1 каплю фенолфталеина и титруют приготовленным 0,1 н. раствором щелочи до появления слабо розового окрашивания.
79. *Натр едкий, 0,1 н. раствор (приготовление из концентрированного раствора).* Чтобы избежать загрязнения карбонатами, титрованный раствор готовят из насыщенного раствора едкого натра. В фарфоровой чашке растворяют 50 г едкого натра в 50 мл дистиллированной воды. Жидкость сильно разогревается. По охлаждению раствор переливают в цилиндр или склянку и закрывают парафинированной пробкой. Углекислый натрий почти нерастворим в концентрированном растворе едкого натра и в течение нескольких дней выпадает на дно. Отстоявшийся прозрачный раствор употребляют для приготовления титрованного раствора. Отмеривают 7,5 мл прозрачной жидкости в мерную колбу емкостью 1 л и доводят дистил-

лированной водой до метки. Раствор щелочи переливают в склянку емкостью 1 л и закрывают парафинированной пробкой. Титр устанавливают по янтарной или щавелевой кислоте. В качестве индикатора пользуются фенолфталеином. Титр следует проверять не реже одного раза в месяц: более слабые растворы требуют более частой проверки.

80. *Натр едкий, 0,01 н. раствор.* Готовят из 0,1 н. раствора едкого натра путем точного разведения дистиллированной водой, не содержащей CO_2 . Хранят в склянке, обработанной паром в течение 15 минут. Для приготовления можно также пользоваться фиксагалом.
81. *Натрий щавелевокислый, 0,1н. раствор.* Раствор готовят из фиксагала или из химически чистой соли. Щавелевокислый натрий отличается большой стойкостью как в сухом виде, так и в растворе. Соль безводна. Для освобождения ее от гигроскопической влаги ее высушивают до постоянного веса в сушильном шкафу при температуре $105-110^\circ\text{C}$ или в эксикаторе над серной кислотой. 0,0670 г щавелекислого натрия растворяют в мерной колбе в 100 мл дистиллированной воды. Получают 0,01н. раствор. Молекулярная масса $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4=134,01$.
82. *Натрий бромноватистоокислый (гипобромит натрия), 2% раствор.* 2 г брома (0,65 мл) растворяют в 100 мл 5% раствора NaOH при охлаждении льдом (удельный вес брома 3,12). Растворение производят под тягой.
83. *Натрий бромноватистый, щелочной раствор.* 300 г NaOH растворяют в фарфоровой чашке в 1 л дистиллированной воды. После охлаждения щелочь переливают в бутылку, которую помещают под тягой в лёд, и небольшими порциями при тщательном взбалтывании добавляют заранее отмеренное количество (16 мл) жидкого брома (16 мл=50 мг). Раствор хранят в тёмной склянке. Годен к употреблению 2 – 3 месяца.
84. *Натрий углекислый, 10% раствор.* Растворяют 200 г безводного углекислого натрия в 2 литрах прокипяченной дистиллированной воды.
85. *Натрий уксуснокислый, 0,2 М раствор (для приготовления ацетатного буфера).* 27,2 г свежеперекристаллизованного уксуснокислого натрия растворяют в 1 л прокипяченной дистиллированной воды, не содержащей CO_2 (в мерной колбе). При перекристаллизации следует учесть, что растворимость кристаллического уксуснокислого натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) в холодной воде (при 0°C) равна 76,2 г, а в горячей воде (при 50°C) -138,8

- г. Растворимость безводного уксуснокислого натрия (CH_3COONa) в холодной воде (при 0°C – 119 г), в горячей воде (при 100°C) – 170 г. Молекулярная масса $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} = 136,09$.
86. *Натрий фосфорнокислый двузамещенный 0,2 М раствор (для приготовления фосфатно-цитратного буфера)*. Растворяют 35,603 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ или 71,634 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в 1 л хорошо прокипяченной и остуженной дистиллированной воды. Прокипяченную воду и приготовленный раствор закрывают пробкой с трубкой, наполненной натронной известью. Фосфат, содержащий две частицы кристаллизованной воды, получают из свежеперекристаллизованного путём двухнедельного выветривания его на воздухе (до постоянного веса), либо путем высушивания в течение 2 суток в термостате при температуре $36 - 38^\circ\text{C}$. Молекулярная масса безводного фосфата Na_2HPO_4 141,98, двухводного фосфата $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 178,01, свежеперекристаллизованного фосфата $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 358,17.
87. *Ниллендера реактив*. 4 г сегнетовой соли и 2 г основного азотнокислого висмута $\text{Bi}(\text{OH})_2\text{NO}_3$ растворяют в 100 мл 10% раствора едкого натра.
88. *Ортотолуидиновый реактив*. Растворяют 0,15 г тиомочевины в 94 мл х.ч. ледяной уксусной кислоты и смешивают с 6 мл бесцветного о-толуидина; реактив стоек; хранят в холодильнике.
89. *Пепсин для свертывания молочно-ацетатной смеси*: 100 мг пепсина растворяют в 0,1 н. растворе HCl и добавляют 10 – 20 капель 2 н. раствора HCl до pH 2,5. Раствору дают постоять 3-4 ч и доводят объём до 100 мл 0,1 н. раствором HCl . Получают 0,1 % раствор пепсина.
90. *Панкреатин, 5% раствор* 5 г сухого панкреатина растворяют в 40 – 50 мл 2% раствора NaHCO_3 и приливают 50-60 мл воды так, чтобы реакция среды на фенолфталеин была слабощелочной (pH 8,0). Раствор панкреатина готовят каждые 2 дня; хранят в холодильнике.
91. *Перекись водорода, 1% и 3% раствор*. 1% и 3% раствор H_2O_2 готовят перед употреблением из продажного 30% пергидроля. К 1 мл пергидроля добавляют 20 мл дистиллированной воды (или соответственно 3 мл H_2O_2 и 27 мл H_2O). По расчету на титрование 0,5 мл 1% раствора H_2O_2 должно пойти 5,88 мл 0,05 н. раствора KMnO_4 .
92. *Раствор гипобромита*. В 100 мл 30% раствора NaOH растворяют 5 мл брома на холоде под тягой. Перед определением раствор разводят ex tempore в 6 раз (1:5) 10% раствором NaOH .

93. *Реактив Фолья*. К 5% водному раствору ацетата свинца прибавляют 30% раствор едкого натра (равный объём до растворения образовавшегося мутного осадка).
94. *Реактив Фелинга*. Медный купорос х.ч. выкристаллизовывают из горячего раствора и высушивают на фильтровальной бумаге. Готовят отдельно два раствора: а) 200 г сегнетовой соли и 150 г едкого натра разводят в мерной литровой колбе и доводят водой до метки; б) 40 г медного купороса разводят в колбе вместимостью 1 л и доводят водой до метки. Перед употреблением смешивают равные объёмы этих растворов.
95. *Раствор белка для цветных реакций*: 10 г белка куриных яиц растворяют в 100 мл воды – получают 1% раствор белка (10 г яичного белка содержится в 1 г белка). Белок от 1 куриного яйца растворяют в 250 мл воды, фильтруют через слой марли и хранят в холодильнике. Можно взять лошадиную сыворотку и развести ее 0,85% раствором NaCl в 5 раз; хранят в холодильнике.
96. *Раствор яичного белка для реакций осаждения (не высаливанием)*. Белки куриных яиц отделяют от желтков, смешивают с 19-20 кратным объёмом воды и фильтруют через складчатый фильтр или несколько слоев марли. Раствор белка для высаливания: 3 белка куриных яиц смешивают с 700 мл воды и с 300 мл насыщенного раствора NaCl.
97. *Реактив «НАДИ»* (готовят за 1 ч до определения): 1% водный раствор диметилпарафенилендиамина смешивают с равным объёмом 1% раствора α -нафтола в спирте и 1,5% раствора карбоната натрия. Реактив «НАДИ» окрашен в темно-коричневый цвет и не должен иметь розового оттенка. Необходимо работать со свежеприготовленным раствором НАДИ, так как он быстро изменяется при хранении.
98. *Рибофлавин, 0,025% (раствор витамин B₂)*. 25 мг рибофлавина растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Часть рибофлавина остается в виде взвеси.
99. *Раствор аминокислот для хроматографического анализа*. Заготавливают растворы, состоящие из трех различных аминокислот, по следующей прописи:
Смесь №1: в 10 мл дистиллированной воды растворяют 60 мг глутаминовой кислоты, 40 мг аланина и 50 мг лейцина.

- Смесь №2: в 10 мл дистиллированной воды растворяют 60 мг глутаминовой кислоты, 40 мг гликокола и 40 мг аланина.
- Смесь №3: в 10 мл дистиллированной воды растворяют 60 мг аспарагиновой кислоты, в 40 мг серина и 40 мг лейцина.
- Смесь №4: в 10 мл дистиллированной воды растворяют 60 мг аспарагиновой кислоты, 40 мг гликокола и 60 мг лейцина.
100. *Серная кислота, 10% раствор.* В фарфоровую чашку наливают 94,3 мл дистиллированной воды и осторожно при помешивании стеклянной палочкой вливают 5,7 мл концентрированной серной кислоты удельного веса 1,84.
101. *Соляная кислота, 2% раствор, 10% и 0,2 растворы.* Для получения 2% раствора HCl в фарфоровую чашку наливают 95,5 мл дистиллированной воды и осторожно при помешивании стеклянной палочкой вливают из мерного цилиндра 4,5 мл концентрированной соляной кислоты удельного веса 1,19. Для получения 10% раствора таким же образом смешивают 77,3 мл H₂O с 22,7 мл концентрированной HCl; для получения 0,2% раствора смешивают 99,5 мл H₂O с 0,45 мл концентрированной HCl.
102. *Стандартный раствор мочевиной кислоты.* К 0,5 г чистой, хорошо высушенной в эксикаторе мочевиной кислоты прибавляют 0,5 г Li₂CO₃, 25 мл воды и нагревают при 50 – 60°C до растворения. После охлаждения доводят объем водой до 1 л (1 мл раствора содержит 0,5 мг мочевиной кислоты).
103. *Стандартная суспензия сульфата бария.* Производится смешиванием двух растворов: 1) 0,0962 н раствор хлористого бария (1,175 г. кристаллического BaCl₂·2H₂O растворить в 100 мл воды в мерной колбе; 2) 0,2 н раствор серной кислоты. Затем получить суспензию сульфата бария: 3 мл 0,0962 н раствора хлористого бария влить в мерную колбу на 100 мл и довести объем 0,2 н раствором серной кислоты при температуре +10°C (при данной температуре размеры частиц преципитированного сульфата бария дают относительно стабильный результат).
104. *Субстратно-буферный раствор для определения амилазы (pH 7,0).* 13,3 г Na₂HPO₄ и 2 г бензойной кислоты растворяют в 250 мл 0,9%-ного хлорида натрия и доводят до кипения. Суспендируют 0,2 г растворимого крахмала в небольшом количестве холодной воды и вводят в кипящий буферный раствор. Кипятят 1 мин, охлаждают и доводят водой до 500 мл. Суб-

- стратно-буферный раствор должен быть прозрачным. Стабилен при хранении при комнатной температуре в течение 10-12 дней.
105. *Стандартный раствор для определения креатинина*: 100 мг креатинина растворяют в 1 л воды (1 мл раствора содержит 0,1 мг азота).
106. *Сульфаниловая кислота, 1% раствор*. 1 г сульфаниловой кислоты растворяют в 100 мл 2% раствора соляной кислоты.
107. *Серебро азотнокислое, 0,01 н. раствор*. 1,6989 г химически чистого AgNO_3 растворяют в мерной колбе емкостью 1 л в дважды дистиллированной воде. Объем жидкости доводят до метки и перемешивают. Если нет уверенности в чистоте препарата, его титр устанавливают по 0,01 н. раствору хлористого натрия (см. приготовление). В качестве индикатора употребляют 5% раствор хромовокислого калия или натрия (K_2CrO_4). Молекулярная масса $\text{AgNO}_3 = 169,89$.
108. *Смазка для стеклянных кранов*: 1) готовится смесь из 3 ч. вазелина и 1 ч. парафина (T° пл. парафина 55°C); 2) 500 г вазелина и 10 г натурального каучука (нарезанного маленькими кусочками) нагревают на водяной бане при температуре 100°C до тех пор, пока каучук не растворится (приблизительно 6 дней). В горячий сплав прибавляют щепотку воска для густоты. Если смазка получается жидкой, добавляют вторую щепотку воска.
109. *Сегнетова соль (для реакции Фелинга)*. 346 г сегнетовой соли (двойная калийнатриевая соль виннокаменной кислоты) растворяют при нагревании в дистиллированной воде и добавляют 140 г едкого натра. После растворения и охлаждения раствор доводят водой до 1 л.
110. *Тирозин, 0,1% раствор в 0,01 н. растворе Na_2CO_3* . 0,5 г тирозина и 0,27 г безводной Na_2CO_3 растворяют в 500 мл дистиллированной воды при слабом нагревании. Вместо безводной соды можно пользоваться $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в количестве 0,58 г или $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ в количестве 0,72 г. Молекулярная масса: $\text{Na}_2\text{CO}_3 = 106,00$; $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} = 124,02$; $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 232,12$; $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O} = 286,16$.
111. *Уксусная кислота, 0,2 М раствор (для приготовления ацетатного буфера)*. 12 г уксусной кислоты (ледяной) растворяют в 1 л прокипяченной дистиллированной воды. Для получения кристаллов концентрированную уксусную кислоту ставят в холодильник. Уксусная кислота кристаллизуется. Оставшийся над кристаллами водный раствор уксусной кислоты

сливают в другой сосуд, а кристаллы употребляют для приготовления раствора. Температура плавления CH_3COOH равна $16,7^\circ\text{C}$. Молекулярная масса 60,05.

112. *Универсальный индикатор.* В 100 мл этилового спирта растворяют: бромтимоловой сини 80 мг, диметиламиноазобензола 60 мг, метилового красного 40 мг, тимоловой сини 100 мг, фенолфталеина 20 мг.

Окраска универсального индикатора при разных значениях рН

рН	2	4	6	8	10
Окраска универсального индикатора	Красная	Оранжевая	Желтая	Зеленая	Сине-фиолетовая

Зона перехода окраски каждого индикатора

Название индикатора	рН	Окраска индикатора
Диметиламиноазобензол	2,9-4,0	Красная-желтая
Метиловый красный	4,2-6,3	Красная –желтая
Бромтимоловый синий	6,0-7,6	Желтая – синяя
Фенолфталеин	8,3-10,0	Бесцветная – красная
Тимоловый синий	9,3-10,5	Бесцветная – синяя

113. *Фибрин.* Свежевыпущенную кровь непрерывно помешивают палочкой. На палочке оседают нити фибрина. Фибрин снимают и отмывают в проточной воде в течение нескольких дней. Сначала сгусток фибрина подвешивают в марлевой салфетке к водопроводному крану на несколько часов, а затем отмывают его руками в тазу с холодной водой до полной белизны. Хранят фибрин в спирте в закрытой банке. Перед употреблением тщательно отмывают от спирта.
114. *Фибрин окрашенный.* Волокна фибрина погружают в 0,1% глицириновый раствор кармина. Фибрин окрашивается в красный цвет. После окраски фибрин тщательно отмывают водой.
115. *Фолликулин, спиртовой раствор.* 10 ампул масляного раствора фолликулина тщательно взбалтывают со 100 мл этилового спирта. Получается нестойкая эмульсия. После отстаивания верхний спиртовой раствор сливают и употребляют для реакций.

116. *Фосфатный буфер М/15*. Отдельно растворяют 11,9 г двузамещенного фосфата натрия и 9,1 г однозамещенного фосфата калия в прокипяченной воде и доводят объём каждого раствора до 1 л. Для получения буферных растворов с нужным рН смешивают полученные растворы в следующих соотношениях.

Приготовление буферных растворов

рН смеси	Количество 1/15 М раствора, мл		рН смеси	Количество 1/15 М раствора, мл	
	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄		Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
5,59	0,5	9,5	6,98	6,0	4,0
5,91	1,0	9,0	7,17	7,0	3,0
6,24	2,0	8,0	7,38	8,0	2,0
6,47	3,0	7,0	7,72	9,0	1,0
6,64	4,0	6,0	8,04	9,5	0,5
6,81	5,0	5,0			

115. *Фосфатный буфер, 0,03 М раствор*, рН 6,9 0,1 М раствор двузамещенного фосфата натрия и 0,1 М раствор однозамещенного фосфата натрия смешивают в соотношении 1:1 и разводят в 3 раза 0,1 М раствором хлорида натрия; раствор устойчив в течение 5 -7 дней при хранении на холоде.

116. *Фосфорновольфрамовый реактив Фолина (для определения мочевой кислоты)*. Готовят смесь: 100 г вольфрамовокислого натрия, 80 мл 85% фосфорной кислоты и 900 мл воды. Кипятят в течение 2 ч в колбе с обратным холодильником, после охлаждения доводят объём до 1 л.

117. *Фракционирующий раствор* для гель-фильтрации представляет смесь трех веществ: насыщенного раствора рибофлавина (В₂), 20% раствора гемоглобина и насыщенного раствора голубого декстрана (500 мг на 100 мл воды). Смешивают три компонента в соотношении 1:1:1. Наносят на колонку, заполненную акрилексом Р-200, 2 капли данной смеси.

118. *Фолина реактив* (для определения фолликулина). В колбу с обратным холодильником вносят 100 г вольфрамата натрия, 20 г фосфорномолибденовой кислоты, 50 мл 85% раствора фосфорной кислоты и 750 мл воды. Закрыв колбу пробкой с обратным холодильником, содержимое колбы кипятят 10 ч, затем охлаждают и доводят водой объём реактива до 1 л.

119. *Фенолфталеин, 0,5% спиртовой раствор*: 1 г фенолфталеина рас-

творяют в 100 мл спирта и добавляют 100 мл воды. Зона перехода при pH 8,3-1,0 (бесцветная – красная).

120. *Фибрин*, окрашенный 0,5% раствором генцианового фиолетового или 0,5 раствором кармина. Волокна фибрина или порошок погружают в 0,5% глицериновый раствор кармина на 5 суток. Фибрин окрашивается в красный цвет. После окраски фибрин тщательно отмывают водой. Фильтруют через воронку с 3-4 слоями марли до бесцветной жидкости.

121. *Фолина реактив (для количественного определения адреналина)*. В колбе емкостью 1,5 мл смешивают 100 г вольфрамвокислого натрия, 20 г фосфорномолибденовой кислоты, 50 мл 85% фосфорной кислоты и 750 мл дистиллированной воды. В колбу вставляют воронку, которую сверху покрывают часовым стеклом. Смесь кипятят на сильном огне в течение 2 часов (кипение должно быть равномерным); получается жидкость, окрашенная в интенсивно желтый цвет. Жидкости дают остыть, по охлаждении переливают в цилиндр и доливают водой до 1 л (если нужно, фильтруют). Проверка качества реактива: 1 мл реактива подщелачивают насыщенным раствором или порошком углекислого натрия. Если не происходит посинения, реактив доброкачественный.

122. *Хромовая смесь для очистки стеклянной посуды*. 15 г тонко измельченного бихромата калия или бихромата натрия ($K_2Cr_2O_7$ или $Na_2Cr_2O_7$) растворяют в 500 мл концентрированной серной кислоты. Смесь хранят в банке, закрытой стеклянной пробкой.

123. *Цветной реактив на мочевины*. Таблетку из набора для определения мочевины, содержащую диацетилмонооксим и тиосемикарбазид, растворяют при нагревании в колбе на 50 мл. Раствор устойчив в течение 3 недель. Перед употреблением смешивают равные объемы приготовленного раствора и 9,6 % раствора серной кислоты.

124. *Цинк сернокислый, 0,45% раствор*. Заготавливают в запас 45% раствор сернокислого цинка и из него по мере необходимости на 10 – 14 дней готовят 0,45% раствор разведением в 100 раз.

125. *Янтарная кислота, 0,01 н. раствор*. 1,18 г янтарной кислоты растворяют в 1 л дистиллированной воды. Кислый раствор нейтрализуют 10% раствором Na_2CO_3 до амфотерной реакции на лакмус (10% раствора Na_2CO_3 расходуется на нейтрализацию не более 5 мл; прибавлять его следует небольшими порциями). Молекулярная масса янтарной кислоты 118,09.

126. *Эрлиха реактив*. 5 % раствор пара-диметиламинобензальдегида в пропанолe или изопропанолe.

Камилов Феликс Хусаинович,
Галимов Шамиль Нариманович,
Аглетдинов Эдуард Феликсович,
Князева Ольга Александровна,
Абдуллина Гузель Маратовна,
Карягина Наиля Тимерхатмулловна,
Байгильдина Асия Ахметовна,
Валиев Альберт Галиевич,
Сагидуллин Феликс Ахтямович,
Кулагина Ирина Геннадьевна,
Кидрасова Римма Салиховна,
Меньшикова Ирина Асхатовна,
Бикметова Эльвира Рафинатовна.

Биохимический практикум

Пособие для самостоятельной аудиторной работы студентов,
обучающихся по специальности 020400.62 – Биология,
профиль Микробиология
Часть 1

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.

Подписано к печати 25.06.2014 г.

Отпечатано на ризографе с готового оригинал-макета,
представленного авторами.

Формат 60x84 ¹/₁₆. Усл.-печ. л. 6,39.

Тираж 31 экз. Заказ № 70

450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3,

Тел.: (347) 272-86-31

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России