

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 2

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. 2. / Ф.Х. Камиров, 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 – 99 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 решение Редакционно-издательского совета ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России.

УДК 577(07)
ББК 28.072я7

© ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории.....	5
Принцип работы с центрифугой.....	7
Правила работы на фотоэлектроколориметре.....	8
Прибор для электрофореза.....	9
Примеры оформления результатов и выводов по выполненным лабораторным работам.....	12
ОБМЕН УГЛЕВОДОВ.....	13
Работа № 44. Определение концентрации глюкозы в крови и моче глюкозооксидазным методом.....	13
Работа № 45. Определение глюкозы крови по цветной реакции с орто-толуидином.....	15
Работа № 46. Выделение гликогена из мышечной ткани.....	17
Работа № 47. Действие фруктозо-1-фосфатазы дрожжей.....	18
Работа № 48. Обнаружение продуктов спиртового брожения.....	19
Контрольные вопросы к разделу «Обмен углеводов».....	23
ОБМЕН ЛИПИДОВ.....	24
Работа № 49. Количественное определение концентрации триглицеридов в сыворотке (плазме) крови.....	24
Работа № 50. Количественное определение холестерина в сыворотке крови по методу Илька.....	26
Работа № 51. Определение общего холестерина в сыворотке (плазме) крови ферментативным методом.....	27
Работа № 52. Определение холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП).....	29
Работа № 53. Количественное определение содержания лецитина в сыворотке крови.....	31
Работа № 54. Полуколичественный экспресс-метод определения кетоновых тел в крови.....	33
Работа № 55. Качественные реакции на обнаружение кетоновых тел в моче.....	34
Работа № 56. Определение химических констант жира.....	35
Контрольные вопросы к разделу «Обмен липидов».....	37
ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ, БЕЛКОВ И НУКЛЕОТИДОВ.....	38
Работа № 57. Количественное определение протеолитической активности желудочного сока по Ансену.....	38
Работа № 58. Колориметрический метод определения активности аспартат- и аланинаминотрансфераз в сыворотке крови.....	40

Работа № 59. Определение активности аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы унифицированным ускоренным методом.....	42
Работа № 60. Количественное определение мочевины по Рашковану.....	44
Работа № 61. Определение содержания мочевины в сыворотке крови, слюне по цветной реакции.....	45
Работа № 62. Определение содержания мочевины в сыворотке крови ферментативным методом.....	46
Работа № 63. Количественное определение мочевой кислоты в сыворотке крови по методу Мюллера – Зейферта.....	47
Работа № 64. Количественное определение мочевой кислоты в моче.....	49
Работа № 65. Секвенирование – исследование последовательности нуклеотидов ДНК (симуляционно).....	50
Работа № 66. Полимеразная цепная реакция (симуляционно).....	52
Работа № 67. Клонирование - способ получения больших количеств идентичных молекул нуклеиновых кислот или фрагментов (симуляционно).....	55
Контрольные вопросы к разделу «Обмен аминокислот, белков и нуклеотидов».....	57
МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА.....	58
Работа № 68. Определение кальция в сыворотке крови титриметрическим методом с использованием мурексида.....	58
Работа № 69. Определение содержания кальция с индикаторным реактивом.....	59
Работа № 70. Комплексометрическое определение кальция в сыворотке крови.....	60
Работа № 71. Определение содержания неорганического фосфора в сыворотке крови.....	61
Контрольные вопросы к разделу «Водно-солевой обмен».....	62
МЕХАНИЗМЫ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ... 64	
Работа № 72. Определение активности каталазы (КФ1.11.1.6) крови методом А.Н. Баха и С.Р. Зубковой.....	64
Работа № 73. Определение активности пероксидазы крови (КФ1.11.1.7) по методу Н.И. Симаковой.....	65
Работа № 74. Определение скорости пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах тканей.....	66
Рекомендуемая литература.....	69
Список использованной литературы	71
Приложения.....	73

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 потушить 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 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 противоположные 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. Закрывать 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.

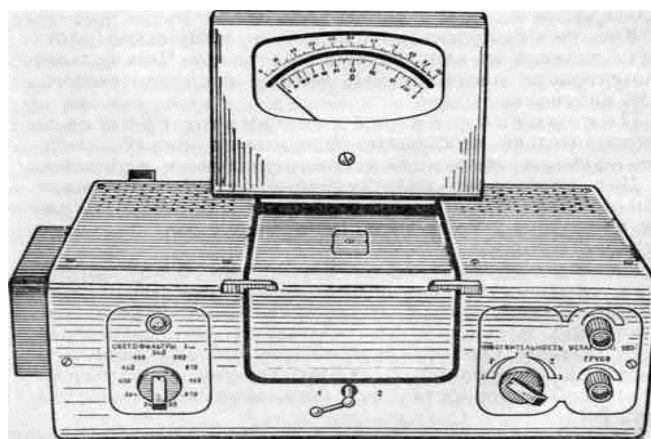


Рис. 2. Фотоэлектроколориметр КФК-2.

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).

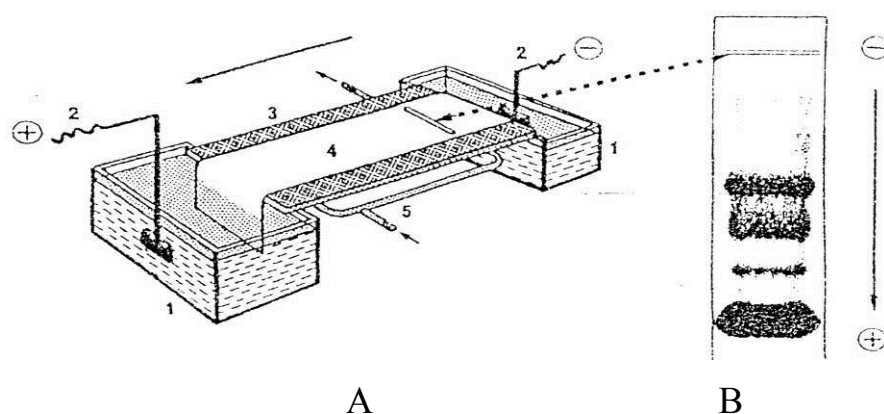


Рис. 3. Схема устройства камеры для электрофореза белков на бумаге (А) и внешний вид электрофореграммы (В):

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 полоски буфером, и на заранее отмеченные участки бумаги наносят разделяемую смесь со стороны катода или анода в зависимости от заряда частиц.

После нанесения на полоски разделяемой смеси камера герметично за-

крывается крышкой. На крышке камеры расположен прижим блокировки, служащий 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 № 9. 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 реакция 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 № 12. 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 гипопроотеинемии, 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).

Концентрации компонентов в реакционной смеси:

- фосфатный буфер – 0,1 ммоль/мл;
- фенол-0,724 мг/мл;
- глюкозооксидаза – 2,0 Е/мл;
- пероксидаза – 0,5 Е/мл;
- 4-аминоантипирин – 0,104 мг/мл;
- альбумин бычий сывороточный – 0,2 мг/мл.

Приготовление рабочего реагента.

Растворить содержимое одного флакона реагента 2 в дистиллированной воде и количественно перенести в мерную колбу вместимостью 500 мл. Туда же количественно перенести содержимое одного флакона с реагентом 1. Объем раствора довести до метки дистиллированной водой, перемешать. При t 2-8°C рабочий раствор стабилен в течение 3-х месяцев.

Исследуемый материал: негемолизированная сыворотка, моча.

Ход работы. В две пробирки (опыт и калибровочная проба) внести реагенты в мкл согласно таблице:

Отмерить (мл)	Опытная проба	Калибровочная проба
Рабочий реагент	1,0	1,0
Проба	0,01	-
Калибратор	-	0,01

Содержимое пробирок перемешать и выдержать 25 мин при температуре 37°C. Измерить оптическую плотность опытной (А) и калибровочной (Ак) проб против рабочего реагента на ФЭК при длине волны 510 (490-540) нм в кюветах с длиной оптического пути 3 мм.

Расчет. Концентрацию глюкозы в сыворотке крови (С) в ммоль/л рассчитать по формуле:

$$C = \frac{A \cdot 10}{A_k}$$

Содержание глюкозы в суточной моче (ммоль/сут) определить по формуле:

$$C = \frac{A \cdot 10 \cdot V}{A_k}, \text{ где } V - \text{объем мочи (л), собранный за сутки.}$$

Норма. В сыворотке крови – 3,9-5,8 ммоль/л.

В моче – менее 2,8 ммоль/сут (0,8 ммоль/л).

Клинико-диагностическое значение определения содержания глюкозы в крови. В норме содержания глюкозы в сыворотке крови у взрослых составляет 3,9-5,8 ммоль/л или 0,7 – 1,0 г/л. Увеличение концентрации глюкозы в крови – гипергликемия наблюдается после приёма пищи, содержащей большое количество углеводов (алиментарная гипергликемия), при клинически выраженной форме сахарного диабета, остром панкреатите, травмах и опухолях мозга, гипертиреозе, гиперфункции коры и мозгового слоя надпочечников, гипофиза, сильном эмоциональном и психическом возбуждении.

Уменьшение уровня глюкозы в крови – гипогликемия наблюдается при передозировке или необоснованном назначении инсулина, некоторых формах гликогенозов, нарушении всасывания углеводов, заболеваниях поджелудочной железы, сопровождающихся гиперсекрецией инсулина (инсулиноме и др.), при недостаточной выработке контринсулярных гормонов, длительном голодании и др.

Вывод.

Работа № 45. Определение глюкозы крови по цветной реакции с орто-толуидином.

Принцип метода. Белки крови осаждаются трихлоруксусной кислотой и отделяются центрифугированием. Центрифугат обрабатывается орто - толуидиновым реактивом.

Глюкоза при нагревании с орто - толуидином в кислой среде даёт зелёное окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации глюкозы в крови и определяется колориметрически на ФЭКе.

Оборудование: ФЭК, кюветы толщиной 10 мм, штатив с пробирками, пробирки центрифужные, центрифуга лабораторная, весы центрифужные, баня водяная кипящая, пипетки объемом 0,1 мл, 1 мл и 5 мл.

Реактивы:

1. Орто-толуидин – жидкость желтого цвета обязательно подлежит перегонке в колбе-реторте при температуре 200° (на песочной бане). Свежеперегнан-

ный орто-толуидин должен быть бесцветным или слабо-желтого цвета. Реактив стоек при хранении в посуде тёмного стекла без доступа воздуха.

2. Ледяная уксусная кислота.

3. Трихлоруксусная кислота, 3 %-ный раствор.

4. Тиомочевина, порошок.

5. Орто-толуидиновый реактив: В 94 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,15 г тиомочевины и добавляют 6 мл орто-толуидина. Реактив стоек при хранении в холодильнике.

6. Стандартный раствор глюкозы 100 мг/л или 5,55 ммоль/л: в мерной колбе на 100 мл в 0,2 %-ном растворе бензойной кислоты растворяют 100 мг высушенной до постоянного веса при 100°C глюкозы. Раствор бензойной кислоты готовят следующим образом: 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в небольшом количестве воды, нагревая на водяной бане до полного растворения. После охлаждения до комнатной температуры переносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки дистиллированной водой. Бензойная кислота увеличивает стабильность стандартного раствора глюкозы.

Можно пользоваться водным раствором глюкозы, однако время хранения такого стандарта значительно меньше. Экстинкция стандарта не должна давать резких колебаний. Хранить в холодильнике.

Исследуемый материал: кровь, взятая из пальца.

Ход определения. В центрифужную пробирку (опыт) налить 0,9 мл 3 % раствора трихлоруксусной кислоты и выдуть на стенку пробирки 0,1 мл крови, взятой из пальца, в стандартную пробу – 0,9 мл 3 % раствора ТХУ и 0,1 мл стандартного раствора глюкозы. Содержимое пробирок взболтать и центрифугировать 5-7 минут при 1500 об/мин.

Взять три пробирки. В первую (опыт) прилить 0,5 мл центрифугата, во вторую (стандарт) – 0,5 мл центрифугата из стандартной пробы, в третью (контроль) – 0,5 мл 3% раствора трихлоруксусной кислоты и во все пробирки добавить по 4,5 мл ортотолуидинового реактива. Пробирки поместить на 8 минут (точно!) в кипящую водяную баню. Вода должна непрерывно кипеть. Пробирки после кипячения сразу охладить под водопроводной водой до комнатной температуры.

Опытную и стандартную пробы колориметрировать против контроля или дистиллированной воды на ФЭКе в кювете толщиной слоя 10 мм при красном (600-650 нм) или желтом (595 нм) светофильтре.

Стандартная проба. Стандартную пробу проводят, как опытные, но вместо крови используют стандартной раствор глюкозы с концентрацией 5,55 мМ (1,0 г/л), а в случае высокого содержания сахара в крови 16,65 мМ (3,0 г/л) или 27,75 мМ (5,0 г/л).

Расчёт произвести по формуле:

$C_{\text{оп}} = (C_{\text{ст}} \times E_{\text{оп}}) / E_{\text{ст}}$ = мМоль или г/л глюкозы, где

$C_{\text{оп}}$ – концентрация глюкозы в опытной пробе,

$C_{\text{ст}}$ – концентрация глюкозы в стандарте, в ммоль/л или г/л;

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы;

$E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта.

Вывод.

Работа № 46. Выделение гликогена из мышечной ткани.

Принцип метода. При экстракции используется способность гликогена к растворению в кислой среде. Применение трихлоруксусной кислоты или хлорной кислот в качестве экстрагирующего реагента одновременно даёт возможность освобождения раствора от примесей белков, нуклеиновых кислот и других полимерных соединений. Гликоген, подобно белкам, обладает резко выраженными гидрофильными свойствами, поэтому его можно осадить из раствора при высаливании солями щелочных и щелочно-земельных металлов, солями тяжёлых металлов, спиртом.

Оборудование: штативы с пробирками, центрифужные пробирки, пипетки объемом 1 и 2 мл; пипетки капельные (глазные), центрифуга лабораторная, фарфоровые ступки, ножницы.

Реактивы:

1. Трихлоруксусная кислота, 5 % раствор.
2. Реактив Люголя.
3. Уксуснокислый свинец, 10 % раствор.

Исследуемый материал: свежая мышечная ткань.

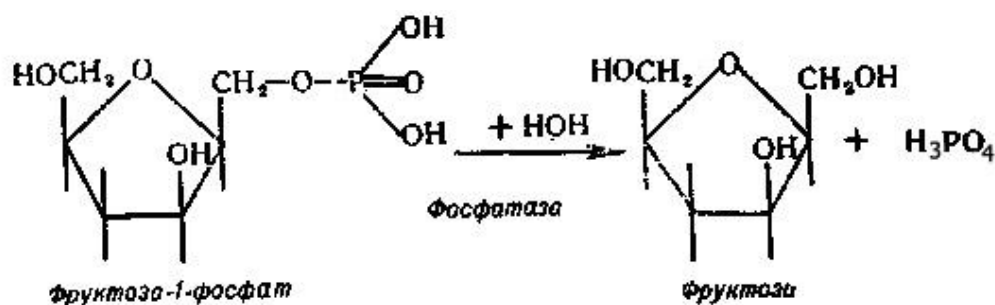
Ход работы. 5 г свежей мышечной ткани поместить в фарфоровую ступку, замороженную в лёд. Ткань измельчить, залить 2 мл 4 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и вновь тщательно растереть пестиком. Полученную кашицу перенести в центрифужную пробирку, отцентрифугировать при 3000 об/мин. в течение 8-10 мин. и по 1 мл надосадочной жидкости перенести в две пробирки. В первой из них провести йодную пробу на гликоген, добавив 2-3 капли реактива Люголя. Отметить проявление характерной красно-бурой окраски раствора, интенсивность которой зависит от концентрации глюкозы. Во вторую пробирку прилить 1 мл 10 %-ного раствора ацетата свинца и отметить выпадение осадка.

Вывод.

Работа № 47. Действие фруктозо-1-фосфатазы дрожжей.

Фосфатазы активируют гидролитическое отщепление фосфорной кислоты от ее органических эфирных соединений. Различают фосфатазы фосфомоноэфиров и фосфодиэфиров. В обмене углеводов фосфатазы играют большую роль, ускоряя гидролиз монофосфорных – эфиров – глюкозо-6-фосфата и глюкозо-1-фосфата, образующихся при распаде гликогена печени и почек. В результате образуются глюкоза и фосфорная кислота; глюкоза поступает в кровь. Это один из механизмов поддержания глюкозы в крови на постоянном уровне. Фосфатазы принимают участие в метаболизме фруктозы. Фруктоза в печени фосфорилируется, образуются фруктозо-6-фосфат и фруктозо-1-фосфат. При поражениях печени метаболизм фруктозы нарушается.

В дрожжах содержится фермент фруктозо-1-фосфатаза, ускоряющий гидролиз фруктозо-1-фосфата.



Если термостатировать раствор натриевой соли фруктозо-1-фосфата с суспензией дрожжей, можно наблюдать увеличение содержания минерального фосфора, количество которого нарастает благодаря распаду фруктозо-1-фосфата под действием фруктозо-1-фосфатазы дрожжей.

Оборудование: пробирки, пипетки капельные (глазные), термостат на 38°.

Реактивы:

1. 0,1% раствор натриевой соли фруктозо-1-фосфата.
2. 10% суспензия дрожжей.
3. 2,5% раствор молибденовокислого аммония.
4. 1% раствор свежей аскорбиновой кислоты.

Исследуемый материал: суспензия дрожжей.

Ход работы. Для работы нужны три сухие пробирки. В 1-ю, опытную, пробирку приливают 4 капли 0,1% раствора натриевой соли фруктозо-1-фосфата и 4 капли 10% суспензии дрожжей. 2-я и 3-я пробирки являются контрольными. Во 2-ю пробирку добавляют 4 капли фруктозо-1-фосфата и 4 капли воды. В 3-ю пробирку приливают 4 капли суспензии дрожжей и 4 капли воды. Все 3 пробирки помещают в термостат при 38° на 10 минут. По истечении этого времени с содержимым каждой пробирки прodelьывают реакцию на минеральный фосфат: добавляют в каждую пробирку по 1 капле 2,5% раствора молибденовокислого аммония и по 1 капле 1% раствора свежей аскорбиновой кислоты. Сравнивают интенсивность развития синей окраски в опытной и контрольной пробах.

Вывод.

Работа № 48. Обнаружение продуктов спиртового брожения.

Брожение – это окисление органических веществ, в том числе и углеводов, различными микроорганизмами в анаэробных условиях с целью получения энергии. Брожение происходит в окружающей среде, в пищевых продуктах. В отраслях пищевой промышленности чаще всего используется молочнокислое и спиртовое брожение. В данных видах брожения окислению подвергается глюкоза, и их химизм до образования пировиноградной кислоты совпадает с гликолизом.

Молочнокислое брожение – это процесс получения энергии молочно-кислыми бактериями. По характеру различают два вида молочнокислого брожения: гомоферментативное и гетероферментативное, которые осуществляются соответствующими группами молочнокислых бактерий. Гомоферментативные (однотипнобродящие бактерии), в процессе брожения образуют в основном молочную кислоту и очень мало побочных продуктов. Они окисляют углеводы молока по пути гликолиза в анаэробных условиях, где пируват служит акцептором водорода от НАДН+Н⁺ и восстанавливается в конечный продукт брожения – лактат. Суммарное уравнение этого типа брожения можно записать так:



Лактат, накапливаясь, вызывает скисание молока до рН 4,8-4,6. Этот процесс лежит в основе квашения капусты, огурцов, помидор и других продуктов растительного происхождения, силосования кормов для животных. Образующийся лактат предотвращает развитие гнилостных бактерий, плесневых грибов, т.е. служит консервантом.

Гетероферментативные бактерии (разнотипнобродящие) – наряду с молочной кислотой образуют значительное количество других веществ: этанола, СО₂, уксусной кислоты. Окисление углеводов молока гетероферментативными молочнокислыми бактериями осуществляется своеобразной ферментативной системой в которой нет фермента альдолазы, но есть ферменты пентозофосфатного цикла и других типов брожения. После фосфорилирования гексоза окисляется дегидрогеназой и декарбоксилируется, превращаясь в пентозофосфат. Последний расщепляется на глицеральдегид-3-фосфат и ацетилфосфат. Глицеральдегид-3-фосфат, как и у гомоферментативных молочнокислых бактерий, окисляется до пирувата, который затем восстанавливается в лактат, а НАДН+Н⁺ окисляется в НАД⁺. Ацетилфосфат дефосфорилируется и превращается в ацетат (уксусную кислоту), частично восстанавливается (через уксусный альдегид) в этанол. Таким образом, конечными акцепторами водорода в этом типе брожения служат пируват и уксусный альдегид.

Культуры гетероферментативных молочнокислых бактерий используют в производстве кефира, кумыса, курунги, мацони и других продуктов.

Спиртовое брожение осуществляется клетками дрожжевых грибов для получения энергии в анаэробных условиях. Большинство дрожжей сбраживает моносахариды, а именно глюкозу по пути гликолиза до образования пирувата. В анаэробных условиях, фермент дрожжей пируватдекарбоксилаза, превращает пируват в уксусный альдегид. Последний восстанавливается ферментом алкогольдегидрогеназой в этанол с окислением НАДН+Н⁺:

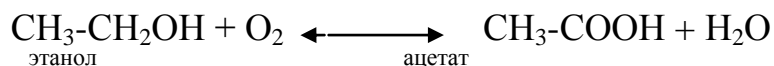


Суммарное уравнение спиртового брожения:

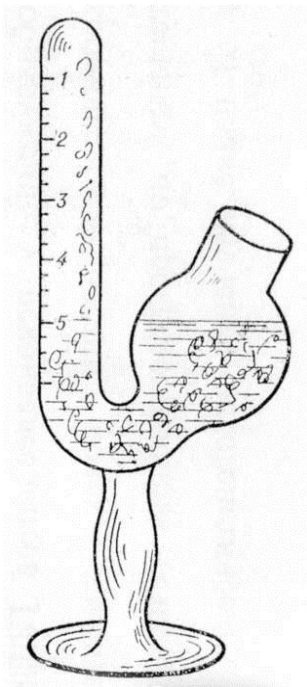


Пропионовокислые бактерии сбраживают углеводы до пропионовой, уксусной кислот и углекислого газа. Одна молекула пирувата окисляется до уксусной кислоты и СО₂ и две молекулы пирувата превращаются в пропионовую кислоту.

Уксуснокислые бактерии окисляют этанол и другие спирты до уксусной кислоты:



Есть микроорганизмы осуществляющие маслянокислое, лимоннокислое и другие виды брожения. Многие типы брожения используются в пищевых технологиях и не менее важную роль они выполняют в природе.



Бродильный аппарат Эйнгорна

Анаэробную стадию окисления глюкозы наиболее удобно изучать на спиртовом брожении.

Принцип метода. Глюкоза под влиянием ферментов, содержащихся в дрожжах, превращается в спирт и углекислый газ. Углекислый газ, выделившийся при сбраживании глюкозы, можно открыть в специальных приборах для брожения (бродильный аппарат Эйнгорна), где собирается выделившийся CO_2 . Затем проделывают количественные реакции на CO_2 и спирт.

Оборудование: бродильный аппарат (трубка) Эйнгорна, штатив с пробирками, пипетки объемом 5 мл и 10 мл, пипетки глазные, спиртовки, держатели для пробирок, фарфоровая ступка, термостат при 37° ; воронки, фильтры обезжиренные.

Реактивы.

1. Глюкоза, 5 % раствор.
2. Гидроксид натрия (NaOH), 10 % раствор.
3. Раствор Люголя.

Исследуемый материал: дрожжи.

Ход работы.

А. Заполнение бродильного аппарата:

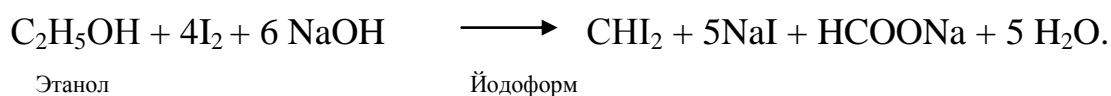
1 г свежих пекарских дрожжей или 0,5 г сухих дрожжей растереть в ступке, приливая небольшими порциями 5 % раствор глюкозы в количестве 20 мл. Затем смесь перенести в бродильный аппарат (аппарат Эйнгорна), так, чтобы закрытое колено было заполнено полностью, а расширенная его часть только до половины. С заполненной трубкой прибор поместить в термостат при температуре 37°C на 30-50 мин. Когда произойдет накопление газа в верхней части закрытого колена прибора, проделать качественные реакции на CO_2 и спирт.

Б. Обнаружение углекислого газа.

В бродильный аппарат налить 10 % раствор гидроксида натрия до краев сосуда и, закрыв отверстие большим пальцем, перемешать содержимое прибо-

ра. CO₂ поглощается щелочью, создавая вакуум, и кожа пальца присасывается к отверстию прибора.

В. Обнаружение этилового спирта с помощью йодоформной пробы:



3-5 мл жидкости из бродильного аппарата отфильтровать в пробирку, добавить несколько капель 10 % раствора йода до получения желтого окрашивания и слегка нагреть. Через некоторое время ощущается характерный запах йодоформа.

Вывод.

Контрольные вопросы к разделу

«Обмен углеводов»

1. Почему уровень содержания глюкозы в крови является интегральным показателем состояния углеводного обмена?

2. Каковы референтные значения содержания глюкозы в сыворотке крови взрослого человека?

3. При каких состояниях наблюдается а) гипергликемия; б) гипогликемия?

4. Представьте принцип глюкозооксидазного метода определения содержания глюкозы в крови.

5. Обоснуйте, почему анаэробную стадию окисления глюкозы наиболее удобно изучать на спиртовом брожении.

ОБМЕН ЛИПИДОВ

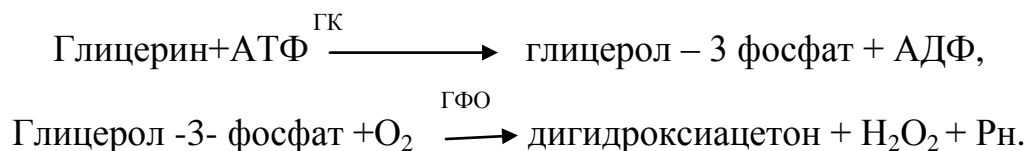
Показателями липидного обмена наиболее часто определяемыми в клинике являются транспортные липопротеины плазмы крови (ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП), холестерин, как общий так и холестерин различных классов липопротеинов (ЛПНП-β- и ЛПВП – α – холестерин), общие триглицериды, кетоновые тела.

Работа № 49. Количественное определение концентрации триглицеридов в сыворотке (плазме) крови.

Принцип метода. Триацилглицериды (ТАГ) расщепляются липопротеинлипазой (ЛПЛ) до глицерина и жирных кислот:



Глицерин с помощью глицеролкиназы (ГК) превращается в глицерол-3-фосфат и окисляется глицерофосфатоксидазой (ГФО) до дигидроксиацетона и пероксида водорода:



Пероксид водорода с 4 - аминоантипирином (4-ААП) и 3,5-дихлор-2-гидроксибензолсульфонатом натрия (ДГБС) дает окрашенный хинонимин:



Образовавшийся окрашенный продукт колориметрируют при длине волны 546 (490-550) нм.

Оборудование: штатив с пробирками, фотоколориметр, кюветы толщиной на 3 или 5 мм, пипетки объемом 1 мл и 2 мл, микропипетки – дозаторы, накопечники.

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

1. Реагент 1 – буферный раствор, готовый к использованию
2. Реагент 2 – смесь лиофильно высушенных ферментов.
3. Калибратор – раствор глицерина, эквивалентный концентрации триг-

лицеридов 2,29 ммоль/л, готовый к использованию. Срок хранения при t 2-8°C один месяц в плотно закрытом виде.

Приготовление рабочего реагента: растворить содержимое флакона реагента 2 в банке реагента 1. Рабочий реагент стабилен 1 месяц при t 2-8°C.

Исследуемый материал: сыворотка или плазма крови.

Ход работы. Добавить в две пробирки реагенты согласно таблице, предварительно перед проведением анализа выдержав реагенты при комнатной температуре 30 мин:

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба
Калибратор	-	0,02
Проба	0,02	-
Рабочий реагент	2,0	2,0

Перемешать выдержать 10 мин при комнатной температуре (20-25 °C). Измерить оптическую плотность опытной (А) и калибровочной (К) проб против рабочего реагента при длине волны 546(490-550) нм. Окраска стабильна в течение часа.

Расчет. Рассчитать концентрацию (С) триглицеридов в ммоль/л по формуле:

$$C = \frac{A}{K} \times 2,29.$$

Клинико-диагностическое значение.

Норма содержания триглицеридов до 1,71 ммоль/л.

Группа риска: 1,71-2,28 ммоль/л

Патологическая гипертриглицеридемия: более 2,28 ммоль/л.

Наибольшее значение имеет определение содержания триацилглицеридов (ТАГ) в крови для установления типов дислипидемии. Повышение содержания ТАГ в крови (гипертриацилглицеринемия) отмечается при гиперлипидемии I, IIb, III, IV и V типов, беременности, ожирении, вирусном гепатите, гипертонической болезни, ишемической болезни сердца, геморрагической лихорадке, нефротическом синдроме, алкоголизме, гипотериозе, жировой инфильтрации печени, алкогольном и билиарном циррозе печени, панкреатите, гликогенозах I, III и VI типов, сахарном диабете, гипотериозе и др. Снижение

содержания ТАГ в крови (гипотриацилглицеринемия) может быть выявлено при гипо- β -липопротеинемии, хронической обструктивной болезни легких, инфаркте мозга, гипертиреозе, лактозурии, недостаточности питания, синдроме мальабсорбции, терминальной стадии поражения паренхимы печени.

Вывод.

Работа № 50. Количественное определение холестерина в сыворотке крови по методу Илька.

Принцип метода. Холестерин, содержащийся в сыворотке крови, обрабатывается реактивом Либермана – Бурхарда (смесь уксусного ангидрида, ледяной уксусной кислоты и концентрированной серной кислоты). При этом холестерин теряет воду и превращается в непредельный углеводород, который с уксусным ангидридом образует зеленое окрашивание. Интенсивность полученной окраски определяется на ФЭЖе.

Оборудование: термостат, фотоэлектроколориметр, кюветы толщиной 3 мм или 5 мм, штатив с пробирками, пипетки объемом 0,1 мл и 5 мл, калибровочный график для определения холестерина.

Реактивы: 1. Реактив Либермана-Бурхарда*.

Исследуемый материал: негемолизированная сыворотка крови.

Ход определения: В сухую пробирку поместить 2,1 мл реактива Либермана – Бурхарда и осторожно по стенке пробирки добавить 0,1 мл сыворотки крови. Пробирку тот час же встряхнуть энергичными движениями 8-10 раз и поместить в термостат при температуре 30°C на 20-25 минут.

Измерить оптическую плотность содержимого пробирки при красном светофильтре против дистиллированной воды в кюветах толщиной слоя 5 мм.

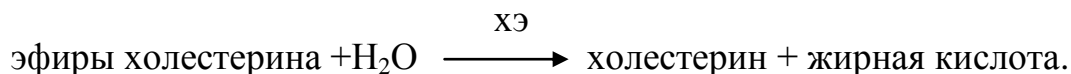
Расчет: Концентрацию холестерина в г/л определить по калибровочному графику.

Содержание холестерина в сыворотке крови у человека зависит от возраста. В сыворотке крови здорового взрослого человека содержится 1,5-2,4 г/л холестерина, у детей 1,0-1,3 г/л, юношей 1,3-1,8 г/л, у людей пожилого возраста более 2,4 г/л.

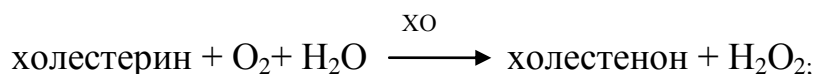
Вывод.

Работа № 51. Определение общего холестерина в сыворотке (плазме) крови ферментативным методом.

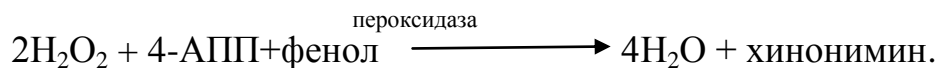
Принцип метода. Метод основан на сопряженных реакциях с участием ряда ферментов: а) холестеролэстеразы (ХЭ), катализирующий гидролиз эфира холестерина до свободного холестерина:



б) холестеролоксидазы (ХО), катализирующий окисление холестерина в холестенон с образованием пероксида водорода:



в) пероксидазы, катализирующей взаимодействия пероксида водорода с 4-аминоантипирином (4-АПП) и фенолом с образованием хенонимина розово-малинового цвета с максимумом поглощения при 500 нм:



Интенсивность окраски образовавшегося хинонимина пропорциональна концентрации холестерина.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки объемом 2 мл, микропипетки-дозаторы, наконечники, фотоэлектроколориметр, кюветы толщиной слоя 3 мм или 5 мм, термостат при температуре 37°C.

Реактивы: набор реагентов «Новохол» (ЗАО «Вектор-Бест»)

1. Реагент 1 – фосфатный буферный раствор, готовый к использованию;
2. Реагент 2 – смесь лиофильно высушенных ферментов;
3. Калибратор, содержащий раствор холестерина в концентрации 4,65 ммоль/л, готовый к использованию.

Приготовление рабочего реагента: растворить содержимое флакона с реагентом 2 в содержимом флаконе с реагентом 1. Раствор стабилен в течение 3 месяцев при хранении при температуре 2-8° С.

Исследуемый материал. Сыворотка или плазма крови.

Ход работы. В три пробирки внести реагенты согласно таблице:

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Калибратор	-	0,02	-
Сыворотка (плазма)	0,02	-	-
Дистиллированная вода	-	-	0,02
Рабочий реагент	2,0	2,0	2,0

Пробирки встряхнуть и поставить в термостат при 37°С на 25 мин. Затем измерить оптическую плотность опытной пробы (Еоп) и калибровочной пробы (Ек) против холостой пробы в кюветах толщиной слоя 5 мм при длине волны 500 (490-550) нм.

Окраска стабильна в течение двух часов.

Расчет. Рассчитать концентрацию холестерина (С) в ммоль/л по формуле: $C = E_{оп} / E_{к} \times 4,65$

При результате концентрации холестерина выше 13 ммоль/л пробу необходимо развести дистиллированной водой в два раза и повторить операцию.

Клинико-диагностическое значение.

Уровни холестерина в сыворотке (плазме) крови:

- нормальный (желаемый) - < 5,2 ммоль/л;
- погранично – высокий – 5,2 – 6,2 ммоль/л;
- высокий – более 6,2 для мужчин и 6,7 ммоль/л для женщин.

Тяжелая гиперхолестеринемия – более 7,5 ммоль для женщин и 7,8 ммоль для мужчин.

Гиперхолестеринемия (повышенное содержание холестерина в крови) отмечается при атеросклерозе, гипертонической болезни, ишемической болезни сердца, дислипотеинемиях, сахарном диабете, гипотиреозе, подагре, хроническом алкоголизме, заболеваниях печени, почек и др. Гиперхолестеринемия – наиболее документированный фактор риска коронарного атеросклероза.

Гипохолестеринемия (снижение содержания холестерина в крови) возникает при гипертиреозе, голодании, синдроме мальабсорбции, поражении центральной нервной системы, хронических обструктивных заболеваниях легких.

Вывод.

Работа № 52. Определение холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП).

Принцип метода. Липопротеины низкой и очень низкой плотности (ЛПНП, ЛПОНП) осаждаются под действием фосфорновольфрамовой кислоты в присутствии ионов магния. Фракция ЛПВП при центрифугировании остается в растворе. Холестерин, содержащийся в этой фракции, определяется ферментативным методом (см. предыдущую работу № 70 по определению общего холестерина).

Оборудование: штатив с пробирками, пробирки центрифужные, пипетки объемом на 1 мл, 0,1 мл, центрифуга лабораторная, фотоэлектроколориметр, кюветы толщиной слоя 3 мм или 5 мм, термостат на 37⁰С.

Реактивы: набор реагентов «Новохол» (ЗАО «Вектор-Бест»).

1. Реагент 1 – раствор реагентов фосфорновольфрамовой кислоты и магния хлористого готовый к употреблению.

2. Калибратор – калибровочный раствор холестерина (1,29 ммоль/л), готовый к использованию. Хранить при t 2-8⁰С в плотно закрытом виде не более 3 месяцев.

Исследуемый материал: сыворотка крови негемолизированная.

Ход работы.

1. Реакция осаждения. В две сухие центрифужные пробирки внести реагенты согласно таблице:

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба
Реагент осаждающий	0,5	0,5
Сыворотка	0,2	-
Калибратор	-	0,2

Содержимое пробирок хорошо перемешать, выдержать 10 мин при комнатной температуре, центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин. Отделить супернатант в чистую пробирку. Супернатант и калибратор разбавленный использовать для определения.

2. Определение ЛПВП – холестерина. В две сухие пробирки отмерить реагенты согласно таблице:

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба
Рабочий реагент	1,0	1,0
Супернатант	0,1	-
Калибратор разбавленный	-	0,1

Содержимое пробирок перемешать, выдержать 25 мин в термостате при температуре 37⁰С. Измерить оптическую плотность опытной (А) и калибровочной проб (Ек) против рабочего реагента. Окраска стабильна в течение одного часа.

Расчет. Рассчитать концентрацию ЛПВП – холестерина (С) в ммоль/л по формуле: $C=A/E_k \times 1,29$.

По разнице содержания общего холестерина (работа № 70) и холестерина ЛПВП (хол-ЛПВП) рассчитать уровень холестерина ЛПНП и ЛПОНП (хол-ЛПНП+ЛПОНП). Кроме того рассчитать холестериновый коэффициент атерогенности (Кхс) согласно формуле:

$$K_{xc} = (\text{Общий ХС} - \text{хол-ЛПВП}) / \text{хол-ЛПВП}.$$

Клинико–диагностическое значение.

Нормальные величины холестерина ЛПВП соответствуют у мужчин 0,90 – 1,8 ммоль/л, у женщин – 1,0 – 2,1 ммоль/л. Определение уровня ЛПВП – холестерина важно для оценки риска развития ишемической болезни сердца (ИБС). Снижение уровня ЛПВП – холестерина приводит к повышению риска развития ИБС. Повышенный уровень ЛПВП – холестерина расценивается как антиатерогенный фактор. Следует учитывать, что изменения содержания холестерина ЛПВП – ХС может наблюдаться при ряде заболеваний и состояний. Так, повышение уровня ЛПВП – ХС отличается при первичном билиарном циррозе печени, хроническом гепатите, алкоголизме, хронических интоксикациях. Снижение уровня ЛПВП – ХС наблюдается при сахарном диабете, заболеваниях почек и печени, гиперлипопротеинемии IV типа, острых бактериальных и вирусных инфекциях.

Для определения тактики лечения и профилактики возникновения ИБС важно одновременно оценивать как уровень общего холестерина, так и холе-

стерина ЛПВП, рассчитать коэффициент атерогенности (Кхс), который в норме у здоровых лиц варьирует в пределах 2–4 и более точно отражает благоприятное и неблагоприятное сочетание липопротеинов с точки зрения риска развития ИБС и атеросклероза. Он характеризует отношение атерогенных ЛП к содержанию антиатерогенных ЛП в сыворотке крови. Этот коэффициент у новорожденных не более 1, достигает 2,5 у здоровых мужчин 20–30 лет и 2,2 – у здоровых женщин того же возраста; у мужчин 40–60 лет без клинических проявлений атеросклероза повышается до 3–3,5; у лиц с ИБС он больше 4, нередко достигая 5–6; у лиц старше 90 лет превышает 3.

Вывод.

Работа № 53. Количественное определение содержания лецитина в сыворотке крови.

Принцип метода. Лецитины извлекаются из сыворотки крови горячим спиртом, в спиртовом экстракте после минерализации колориметрическим методом определяется неорганический фосфор, содержащийся в составе лецитинов. Количество лецитина определяется по стандартному калибровочному графику.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, пипетки объемом 1 мл, 5 мл, водяная баня кипящая, спиртовки, держатели для пробирок, фотоэлектроколориметр, кюветы толщиной слоя 10 мм, воронки, фильтры обезжиренные, стеклянные палочки, резиновые пробки для пробирок, калибровочный график для определения лецитина в г/л.

Реактивы:

1. Кислота серная, концентрированная.
2. Пергидроль.
3. Этанол, 96⁰.
4. Едкий натр (NaOH), 33 % раствор.
5. Смесь Блюра*.
6. Ацетатный буфер, рН 4,0*.
7. Аскорбиновая кислота, 1 % раствор.

8. Молибденовокислый аммоний, 2 % раствор.

9. Вода дистиллированная.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Ход работы. В пробирку (опыт) поместить 1 мл сыворотки крови и добавить 2,5 мл этанола 96⁰. Содержимое пробирок перемешать стеклянной палочкой. Пробирку неплотно закрыть резиновой пробкой и поместить в водяную баню при температуре 80⁰С. Параллельно поставить контрольную пробу с 2,5 мл смесью Бюра. Содержимое обеих пробирок охладить, профильтровать через обезжиренный фильтр в сухие пробирки. Для полноты извлечения содержимого пробирки сполоснуть 1–1,5 мл смеси Бюра и вылить на фильтр.

Полученные фильтраты – опыт и контроль выпарить осторожно! над спиртовкой, добавить в каждую пробирку по 5 капель концентрированной серной кислоты и сжечь смесь на слабом пламени спиртовки до появления бурой окраски и тяжелых белых паров.

Пробирки охладить на воздухе, добавить по 5–6 капель пергидроля и содержимое пробирок вновь сжигать на слабом огне до обесцвечивания жидкости.

После охлаждения в каждую пробирку добавить по 2 мл дистиллированной воды, нейтрализовать содержимое 6-7 каплями 33 % раствора NaOH, прилить по 2,5 мл ацетатного буфера (рН 4,0), по 0,5 мл 2 % раствора молибденовокислого аммония и по 1 мл 1 % раствора аскорбиновой кислоты. Содержимое пробирок тщательно перемешать и через 10 мин. после развития окраски измерить оптическую плотность на фотоэлектроколориметре при красном свето-фильтре, опыт против контроля в кюветах толщиной слоя 10 мм.

Содержимое лецитина в г/л рассчитать по калибровочному графику.

Клинико-диагностическое значение. В норме содержания лецитина в сыворотке крови зависит от возраста, составляя 1,5-2,7 г/л. При ряде заболеваний наблюдается снижение уровня лецитина. Это атеросклероз, ишемическая болезнь миокарда, сахарный диабет, микседема и др.

Работа № 54. Полуколичественный экспресс-метод определения кетоновых тел в крови.

Принцип метода. Ацетон и ацетоуксусная кислота образуют с нитропруссидом натрия в щелочной среде соединения розово-фиолетовой окраски. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию кетоновых тел в крови. Тест в 3 раза чувствительнее по отношению к ацетоуксусной кислоте, чем к ацетону. Из всех кетоновых тел в крови ацетоуксусная кислота является преобладающей.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, пипетки на 0,1 и 1 мл, предметное стекло.

Реактивы:

1. Нитропруссид натрия, порошок.
2. Вода бидистиллированная.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Ход определения. На предметное стекло наносят 0,1-0,2 г порошка нитропруссиды натрия и 2-3 капли сыворотки крови и выдерживают 5 мин. Минимальный уровень кетоновых тел в крови, дающий положительную реакцию, составляет 10 мг/дл (10 мг %). Если фиолетовая окраска развивается немедленно, то концентрация кетоновых тел составляет 50 - 80 мг/дл и более, если через 1 мин - 30-50 мг/дл. Развитие слабой фиолетовой окраски через 3 мин свидетельствует о содержании в пробе кетоновых тел в концентрации 10-30 мг/дл.

После качественной реакции сыворотку крови разводят дистиллированной водой: при концентрации кетоновых тел выше 30-50 мг/дл делают разведения 1:3, 1:4, 1:5 и 1:6. Для этого взять 4 пробирки, в каждую прилить по 0,1 мл сыворотки крови, затем в первую прилить 0,3, во вторую - 0,4, в третью - 0,5 и в шестую - 0,6 мл дистиллированной воды. Затем провести качественную реакцию на кетоновые тела на предметном стекле, как это описано выше, только использовать не цельную, а разведенную сыворотку крови. В пробе с наибольшим разведением, дающим положительную реакцию, концентрация кетоновых тел составляет 10 мг/дл. Умножая степень разведения на 10, получают содержание кетоновых тел в неразведенной пробе.

Клинико-диагностическое значение. В норме концентрация кетоновых тел в крови составляет 1-3 мг/дл (до 0,2 мМ/л). При сахарном диабете концентрация кетоновых тел возрастает в десятки раз, что является следствием активации липолиза – мобилизации жирных кислот, торможения цикла лимонной кислоты Кребса, дефицита оксалоацетата, что приводит к накоплению ацетил-КоА. Кетонемия и кетонурия при сахарном диабете свидетельствуют о декомпенсации метаболических нарушений (развитие ацидоза). Увеличение концентрации кетоновых тел в крови - кетонемия, а также появление их в моче - кетонурия (при концентрации в крови более 20 мг/дл) наблюдаются также при голодании, лихорадке, алкогольной интоксикации, инфекционных заболеваниях. У новорожденных повышение кетонов почти всегда вызывается недокормленностью.

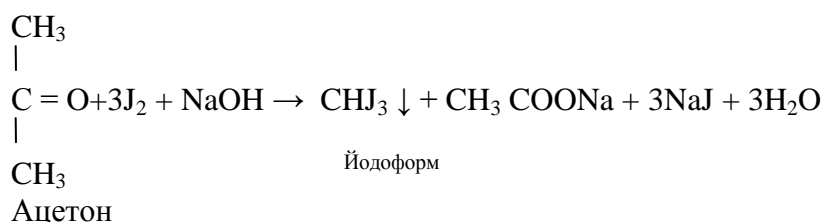
Выводы.

Работа № 55. Качественные реакции на обнаружение кетоновых тел в моче.

К кетоновым телам относятся ацетоуксусная (β -кетомасляная), β -гидрокси-масляная кислоты и ацетон. Появление кетоновых тел в моче (кетонурия) связано с увеличением их содержания в крови

55.1. Проба Либина.

Принцип метода. Метод основан на превращении ацетона в йодоформ в присутствии йода в щелочной среде. Йодоформ, имеющий характерный болыничный запах, выпадает в осадок. Химизм реакции:



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

Реактивы:

1. Едкий натр, 10 % раствор.
2. Раствор Люголя.
3. Нитропруссид натрия, концентрированный раствор свежеприготовленный.

Исследуемый материал: моча, содержащая кетоновые тела.

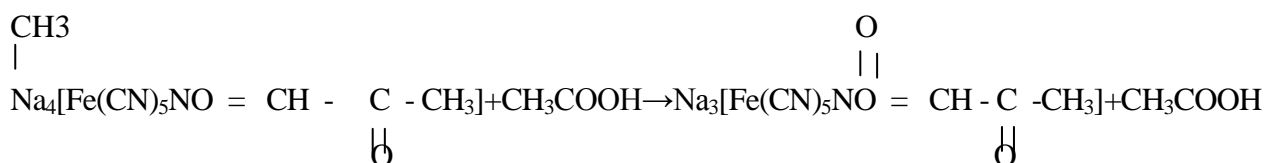
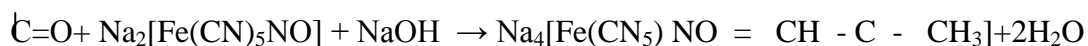
Ход работы. 1 мл исследуемой мочи внести в пробирку, добавить 3-4 капли раствора Люголя и 2-3 капли 10 % раствора NaOH. Отметить появление помутнения и осадка, с характерным запахом.

Вывод.

55.2. Проба Легалья.

Принцип метода. Ацетон и β-кетомасляная кислота в щелочной среде с нитропруссидом натрия образует соединение оранжево-красного цвета. При подкислении концентрированной уксусной кислотой окраска переходит в вишнево-красную.

Химизм реакции:



Ход работы. В пробирку поместить 1-2 капли исследуемой мочи, 1-2 капли 10 % раствора NaOH и 1-2 капли насыщенного свежеприготовленного нитропруссиды натрия. Отметить появление оранжево-красного окрашивания. Добавить 3-5 капель концентрированной уксусной кислоты и отметить изменение окраски на вишнево-красное.

Кетонурия наблюдается при голодании, углеводном голодании у детей, при длительной (изнуряющей) физической нагрузке, при сахарном диабете, при гликогеновых болезнях.

Вывод.

Работа № 56. Определение химических констант жира.

О природе и качестве жира можно судить по его физическим и химическим величинам, называемым константами. Среди физических констант жира наибольшее значение имеют: плотность, вязкость, температура плавления и

отвердевания; среди химических (называемых «числами» жира) - йодное число, кислотное число, число омыления и эфирное число.

Перед определением констант жир разогревают в термостате при 55-60°C, в этом же термостате его фильтруют через сухой бумажный фильтр. Затем охлаждают до комнатной температуры и используют для исследования.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, пипетки объемом 1 мл, 2 мл, 10 мл, колбы вместимостью 100 мл, бюретки объемом

25 мл для титрования, фильтровальная бумага, баня водяная кипящая, стеклянные палочки, держатели для пробирок.

Реактивы:

1. Гидроксид натрия (NaOH), 40 % раствор.
2. Гидроксид калия (KOH), 0,1 моль/л в этаноле*.
3. Этанол, 96⁰.
4. Эфир этиловый.
5. Фенолфталеин, 0,1 % спиртовый раствор.
6. Йод, 0,1N раствор в этаноле*.
7. Тиосульфат натрия, 0,1N раствор*.
8. Вода дистиллированная.

Исследуемый материал: маргарин, растительное масло.

56.1. Омыление жира.

Ход работы.

В пробирку поместить кусочек маргарина величиной с горошину, 1 мл этанола и 1 мл 40 % раствора гидроксида натрия. Нагреть пробирку при встряхивании или помешивании палочкой на кипящей водяной бане. Через 5-10 минут смесь становится однородной. Перенести 2-3 капли раствора в другую пробирку, добавить 1 мл воды и нагреть на бане. Если проба полностью растворяется, омыление можно считать законченным.

К густой однородной массе добавить раствор хлорид натрия, чтобы выделившийся слой мыла поднялся до верха пробирки. Дать смеси отстояться, погрузить пробирку почти целиком в стакан с холодной водой и извлечь мыло палочкой или шпателем. Отжать его между листами фильтровальной бумаги.

Вывод.

Контрольные вопросы к разделу

«Обмен липидов»

1. Объясните действие эмульгаторов и охарактеризуйте процесс эмульгирования жира.
2. Каково клинико-диагностическое значение определения общих липидов в сыворотке крови?
3. При каких состояниях отмечается а) гипертриацилглицеринемия; б) гипотриацилглицеринемия?
4. Представьте значение уровней холестерина в сыворотке крови в ммоль/л: а) нормального (желаемого); б) погранично-высокого; в) высокого для мужчин и для женщин; г) тяжелой гиперхолестеринемии для мужчин и для женщин.
5. На чем основан принцип ферментативного метода определения общего холестерина в сыворотке крови?
6. Представьте формулу расчета холестеринового коэффициента атерогенности, охарактеризуйте клинико-диагностическое значение его определения.
7. Почему определение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) является важным для оценки риска развития ишемической болезни сердца?
8. Представьте принцип метода количественного определения содержания лецитина в сыворотке крови.
9. Какие вещества относятся к кетоновым телам?
10. Чем характеризуются и при каких состояниях наблюдаются кетонемия и кетонурия?
11. Какие методы (пробы) позволяют обнаружить кетоновые тела в моче?
12. Какие физические и химические константы жира имеют наибольшее значение для определения природы и качества жира?

ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ, БЕЛКОВ И НУКЛЕОТИДОВ

Белки являются наиболее распространенными органическими веществами организма с разнообразием функций. Метаболизм простых белков принято рассматривать с метаболизмом аминокислот, а сложных белков – с метаболизмом простетической группы (например, нуклеиновых кислот, гемма и др.)

В данном разделе приведены лабораторные работы, которые, так или иначе, отражают этапы белкового обмена, начиная с процессов переваривания. Далее рассматривается обмен аминокислот путем измерения активности внутриклеточных ферментов в плазме крови. Конечный этап белкового обмена включает биохимические процессы, приводящие к образованию низкомолекулярных азотистых метаболитов, которые выводятся из организма. Определение данных показателей в сыворотке крови позволяет судить об уровне поступления пищевого азота, интенсивности азотистого катаболизма в тканях и уровне выведения азотистых продуктов из организма.

Освоение методов биохимического анализа, представленных в данном разделе, позволит будущему врачу понять функциональное состояние организма и правильно оценивать степень тех или иных отклонений в состоянии здоровья, следить за ходом лечения и своевременно обнаруживать побочные действия лекарственных препаратов.

Работа № 57. Количественное определение протеолитической активности желудочного сока по Ансену.

Принцип метода. О протеолитической активности желудочного сока судят по количеству образующихся при расщеплении казеина неосаждаемых трихлоруксусной кислотой пептидов, концентрация которых соответствует концентрации определяемого в них тирозина.

Оборудование: штатив с пробирками, пробирки центрифужные, пипетки объемом 1 мл, 2 мл, 5 мл, фотоэлектроколориметр, кюветы толщиной слоя 10 мм, центрифуга лабораторная, термостат при 38°C, калибровочный график на тирозин.

Реактивы:

1. Казеинат натрия, 5 % раствор.

2. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 5 % раствор.
3. Натрия карбонат (Na_2CO_3), 0,5 н раствор*.
4. Реактив Фолина*.

Исследуемый материал: желудочный сок.

Ход работы. В две центрифужные пробирки отмерить по 1 мл желудочного сока, разведенного в 10 раз. В опытную пробирку добавить 1 мл 5 % раствора казеината натрия, в контрольную – 2 мл 5 % раствора ТХУ. Содержимое пробирок перемешать, поместить в термостат при температуре 38° С на 20 мин. После термостатирования в контрольную пробу добавить 1 мл 5 % раствора казеината натрия, в опытную – 2 мл 5 % раствора ТХУ. Выдержать 15 мин, далее центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин. После этого отобрать в 2 биологические пробирки по 1 мл центрифугата (надосадочной жидкости) и добавить по 5 мл 0,5 н раствора Na_2CO_3 . При перемешивании в обе пробирки добавить по 1 мл реактива Фолина и выдержать 20 мин.

Оптическую плотность опытного раствора измерить на ФЭКе при длине волны 760 нм (красный светофильтр) в кювете толщиной 10 мм против контроля. Концентрацию тирозина ($C_{\text{тир}}$) в мкмоль найти по калибровочному графику.

Расчет. Рассчитать активность (А) в мкмоль / (мл•мин) по формуле:

$$A = \frac{C_{\text{тир}} \times 4 \times 10}{20 \text{ мин}}, \text{ где}$$

$C_{\text{тир}}$ - концентрация тирозина по калибровочному графику в мкмоль, 10 – разведение желудочного сока, 4 – разведение объема желудочного сока в пробе, 20 – время термостатирования пробы в мин.

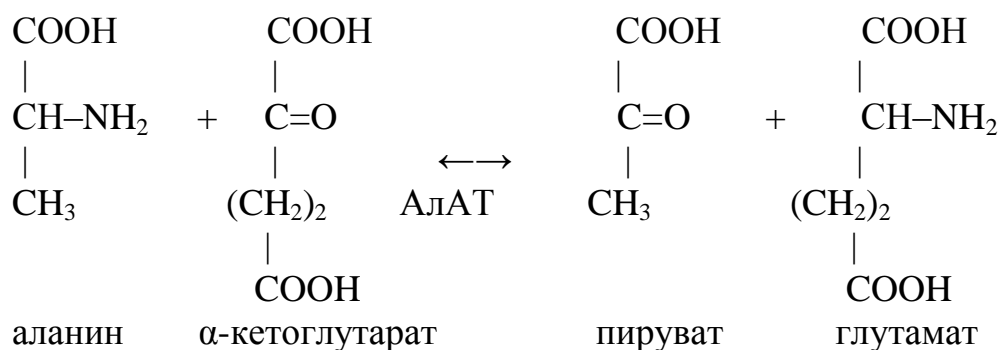
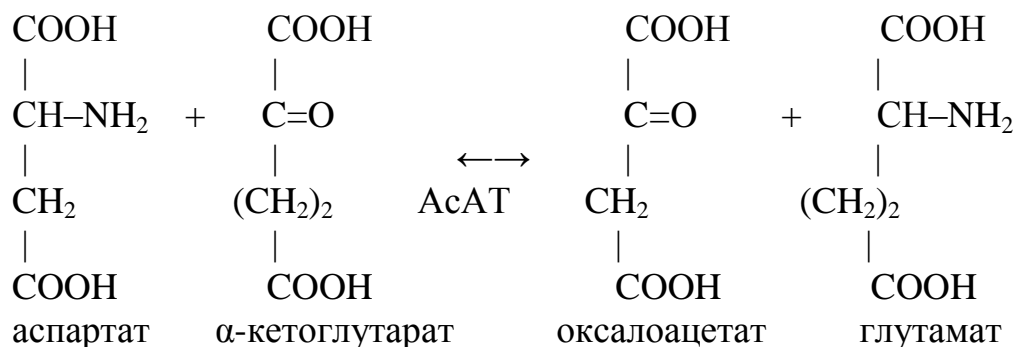
Клинико-диагностическое значение.

В норме протеолитическая активность желудочного сока равна 0,15-0,5 мкМ/мл мин. Снижение протеолитической активности наблюдается при гипацидном гастрите в результате уменьшения секреции соляной кислоты (гипохлоргидрия), при ахилическом гастрите (ахлоргидрия), при раке желудка.

Вывод.

Работа № 58. Колориметрический метод определения активности аспарат- и аланинаминотрансфераз в сыворотке крови.

Принцип метода. В результате переаминирования при участии АсАТ и АлАТ образуются, соответственно, щавелевоуксусная (ЩУК, оксалоацетат) и пировиноградная (ПВК, пируват) кислоты.



Оксалоацетат при декарбоксилировании превращается в пируват. При добавлении кислого 2,4-динитрофенилгидразина ферментативный процесс останавливается и образуется гидразон пировиноградной кислоты. Последний в щелочной среде дает окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки объемом 0,1 мл, 0,2 мл, 1 мл, 5 мл, термостат при 37°C, фотоэлектроколориметр, кюветы толщиной слоя 10 мм, калибровочный график.

Реактивы:

1. Субстратный раствор для определения АлАТ*.
2. Субстратный раствор для определения АсАТ*.
3. Раствор кислого динитрофенилгидразина*.
4. Едкий натр (NaOH), 0,4 н раствор*.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Ход работы.

1. Определение АсАТ.

Одновременно готовят опытную и контрольную пробы.

Опытная проба. В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора, добавляют 0,1 мл сыворотки, помещают в термостат при температуре 37° С на 1 час. Затем добавляют 0,5 мл раствора динитрофенилгидразина и выдерживают при комнатной температуре 20 мин для развития реакции. Затем приливают 5 мл 0,4 н NaOH, тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин для развития окраски. Оптическую плотность измеряют на ФЭКе с зеленым светофильтром в кювете на 10 мм против контроля.

Контрольная проба. Содержит все ингредиенты опытной пробы за исключением сыворотки крови. Вместо нее берут 0,1 мл дистиллированной воды и инкубируют в тех же условиях, что и опытную.

Вывод.

2. Определение АлАТ.

Одновременно готовят опытную и контрольную пробы.

В опытную пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора для определения АлАТ, затем добавляют 0,1 мл испытуемой сыворотки и помещают в термостат при температуре 37° С на 30 мин. Дальнейший ход анализа такой же, как при определении АсАТ.

В контрольную пробирку вместо сыворотки крови вносят 0,1 мл дистиллированной воды.

Расчет активности ферментов производят по калибровочному графику, отражающему зависимость оптической плотности от содержания ПВК.

Клинико-диагностическое значение.

Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови имеет важное значение для диагностики болезней печени. Для острого гепатита характерно раннее повышение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ). При инфаркте миокарда в 95 % случаев в сыворотке крови повышается активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ). В сыворотке крови здоровых людей актив-

ность АсАТ колеблется в пределах 0,028-0,139 мкмоль/л×сек (10 - 30 Е/л), активность АлАТ – 0,028-0,196 мкмоль/л×сек (7 - 40 Е/л).

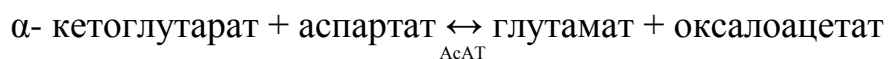
Вывод.

Работа № 59. Определение активности аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы унифицированным ускоренным методом.

59.1. Активность аспаратаминотрансферазы.

Принцип метода. Метод основан на определении скорости образования НАД⁺ за счет окисления НАДН + Н⁺. В результате реакции уменьшается оптическая плотность раствора.

Химизм реакции:



Уменьшение концентрации НАДН + Н⁺ пропорционально активности АсАТ, измеряется при зеленом светофильтре (490 нм) на фотоэлектроколориметре.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, ФЭК, кюветы толщиной слоя 3 мм, термостат.

Реактивы:

1. Рабочий раствор для определения АсАТ, содержащий аспарат, α-кетоглутарат, НАДН + Н⁺, малатдегидрогеназу.

2. Вода дистиллированная.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Ход работы.

В чистую пробирку внести 20 капель рабочего раствора для определения АсАТ, добавить 2 капли (точно!) сыворотки крови и инкубировать 3 минуты при 37° С в термостате. Измерить оптическую плотность пробы на ФЭКе в кювете толщиной слоя 3 мм против дистиллированной воды при зеленом светофильтре (490 нм).

Расчет: активность АСТ = $\frac{E}{3} \times F$ мккат/л, где

E- экстинция пробы;

F - коэффициент пересчета, равный 29;

3 -пересчет на 1 мин.

В норме активность АсАТ составляет 0,1 - 0,7 мккат/л.

При расчете в международных единицах F= 1750, норма -10 - 40 Е/л.

Вывод.

59.2. Активность аланинаминотрансферазы.

Принцип метода. Метод основан на определении скорости образования НАД⁺ за счет окисления НАДН + Н⁺. В результате реакции уменьшается оптическая плотность раствора.

Химизм реакции.

α - кетоглутарат + аланин \leftrightarrow глутамат + пируват
АЛТ

пируват + НАДН+ Н⁺ \leftrightarrow лактат + НАД⁺
ЛДГ

Уменьшение концентрации НАДН+Н⁺ пропорционально активности АЛТ, измеряется при зеленом светофилт্রে (490 нм) на фотоэлектроколориметре.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки глазные, ФЭК, кюветы толщиной слоя 3 мм, термостат.

Реактивы:

1. Рабочий раствор для определения АЛТ, содержащий аланин, α - кетоглутарат, НАДН+ Н⁺, лактатдегидрогеназу.

2. Вода дистиллированная.

Исследуемый материал: сыворотка крови

Ход работы.

В чистую пробирку внести 20 капель рабочего раствора для определения АЛТ, добавить 2 капли (точно!) сыворотки крови и инкубировать 3 минуты при 37°С в термостате.

Измерить оптическую плотность пробы на ФЭКе в кювете толщиной слоя 3 мм против дистиллированной воды при зеленом светофильтре (490 нм).

$$\text{Расчет: активность АлАТ} = \frac{E}{3} \times F \text{ мккат/л, где}$$

E- экстинция пробы;

F - коэффициент пересчета, равный 29;

3- пересчет на 1 мин.

В норме активность АлАТ составляет 0,1 - 0,7 мккат/л.

При расчете в международных единицах F= 1750, норма -7 – 40 Е/л

Вывод.

Работа № 60. Количественное определение мочевины по Рашковану.

Принцип метода. Основан на том, что мочевина с гипохлоритом натрия и фенолом образует продукт зеленого окрашивания.

Оборудование. штатив с пробирками, пипетки объемом 0,1 мл, 1 мл, 2 мл, 10 мл, термостат на 55-60°С, фотоэлектроколориметр, кюветы толщиной слоя 5 мм, калибровочный график.

Реактивы:

1. Спирт этиловый, 96⁰.
2. Кислота соляная (HCl), 0,035 н раствор*.
3. Гипохлорит натрия (NaOCl), 1,2 % раствор*.
4. Фенол, 5 % раствор.

Исследуемый материал: моча суточная.

Ход работы. В пробирку поместить 0,1 мл разведенной в 100 раз исследуемой мочи, добавить 7 мл этилового спирта и прилить 2 мл дистиллированной воды. К полученной смеси прибавить 1 мл 0,035 н раствора HCl, тщательно перемешать, добавить 1 мл 1,2 % NaOCl, вновь тщательно перемешать и сразу же добавить 1 мл 5 % раствора фенола. Содержимое пробирки хорошо перемешать и поместить на 25 мин. в термостат при температуре 55-60° С.

Окрашенный в зеленый цвет раствор охладить и колориметрировать на ФЭКе с красным светофильтром в кюветах толщиной слоя 5 мм против воды.

Концентрацию мочевины рассчитать с помощью калибровочного графика с учетом разведения мочи и суточного диуреза за (1500-2000 мл).

Клинико-диагностическое значение. С мочой у взрослого человека за сутки выделяется 25-30 г мочевины. Колебания в ту или иную сторону обычно зависят от состава и количества пищи (содержание в ней белка). Количество мочевины в моче заметно повышается при лихорадке, уменьшается при некоторых тяжелых заболеваниях печени.

Вывод.

Работа № 61. Определение содержания мочевины в сыворотке крови, слюне по цветной реакции.

Принцип метода. Метод основан на образовании мочевины с диацетилмонооксимом продукта красного цвета в присутствии тиосемикарбазида и солей железа. Интенсивность окраски образовавшегося соединения пропорциональна содержанию мочевины и определяется колориметрически при длине волны 540-560 нм (зеленый светофильтр).

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки вместимостью 0,1 мл, 2 мл, фотоэлектроколориметр, кювета толщиной слоя 3 мм или 5 мм, водяная баня кипящая, алюминиевая фольга.

Реактивы:

1. Мочевина, стандартный раствор, 1 г/л или 16,65 ммоль/л*.
2. Цветной реактив*.

Исследуемый материал: сыворотка крови, разведенная в 10 раз, слюна смешанная.

Ход работы. Взять три пробирки: опыт, стандарт, контроль. В опытную пробирку внести 0,1 мл разведенной в 10 раз сыворотки крови или 0,1 смешанной слюны, в стандартную – 0,1 мл раствора мочевины, в контрольную – 0,1 дистиллированной воды. Во все пробирки добавить по 2 мл цветного реактива, тщательно перемешать встряхиванием. Пробирки закрыть крышечкой из алюминиевой фольги и нагреть в кипящей водяной бане в течение 10 мин (точно!). Пробирки охладить под струей холодной воды и измерить оптическую плот-

ность опытной ($E_{оп}$) и стандартной ($E_{ст}$) проб против контрольной на ФЭК при длине волны 540-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете толщиной слоя 3 мм или 5 мм.

Окраска неустойчива, измерить необходимо в течение 15 минут.

Расчет. Концентрацию мочевины (А) в ммоль/л в сыворотке крови рассчитать по формуле:

$$A = \frac{E_{оп} \cdot 16,65 \cdot 10}{E_{ст}}, \text{ где}$$

$E_{оп}$ – экстинция опытной пробы; $E_{ст}$ – экстинция стандартной пробы; 16,65 – концентрация мочевины в стандартной пробе в ммоль/л; 10 – разведение сыворотки крови.

Концентрация мочевины (В) в смешанной слюне в ммоль/л рассчитывают по формуле:

$$B = \frac{E_{оп} \cdot 16,65}{E_{ст}}$$

Клинико-диагностическое значение. У здорового человека содержание мочевины составляет в сыворотке крови 3,0-8,3 ммоль/л, в слюне – 2,3-2,8 ммоль/л. Повышение мочевины в крови отмечается при заболеваниях почек (нарушении выделительной функции), при избыточном белковом питании, при интенсивном распаде белка, при обезвоживании (диарея, лихорадка). Концентрация мочевины в слюне тесно связана с ее содержанием в крови. Основная часть мочевины секретируется в слюну околоушной железой, с увеличением скорости слюноотделения содержание мочевины в смешанной слюне снижается.

Вывод.

Работа № 62. Определение содержания мочевины в сыворотке крови ферментативным методом.

Принцип метода: Уреаза гидролизует мочевины с образованием аммиака и двуокиси углерода. Аммиак реагирует с производными фенола и щелочным раствором гипохлорита натрия с образованием цветного соединения, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию мочевины в анализируемой пробе.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки вместимостью 2,0 мл, 5,0 мл, 0,02 мл, ФЭК, кюветы толщиной слоя 13 мм или 5 мм.

Реактивы: реагенты набора «Новокарб» (ЗАО «Вектор-Бест»).

1. Рабочий раствор - уреазы, нитропруссид натрия+буферно-субстратный раствор, рН 6,5.

2. Раствор гипохлорита натрия и гидроокиси натрия (реактив 3).

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Ход работы. В две пробирки внести реагенты согласно таблице:

	Опытная проба, мл	Холостая проба, мл
Сыворотка крови, мл	0,02	-
Рабочий раствор, мл	2,0	2,0
Перемешать и инкубировать 10 мин при 37 ⁰ С		
Реактив 3, мл	2,0	2,0

Перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре. Инкубационную смесь следует предохранять от воздействия прямого света. После инкубации измеряют оптическую плотность опытной пробы (А) против холостой пробы в кюветах на 3 мм или 5 мм при длине волны 670 нм на ФЭКе.

Расчет концентрации мочевины в опытной пробе проводят по формуле: $C = (A/0,21) \cdot 10$ ммоль/л, где А- оптическая плотность опытной пробы против холостой пробы.

Клинико-диагностическое значение. У здорового человека содержание мочевины составляет в сыворотке крови 3,0-8,3 ммоль/л.

Вывод.

Работа № 63. Количественное определение мочевой кислоты в сыворотке крови по методу Мюллера - Зейферта.

Принцип метода. Мочевая кислота определяется в безбелковых фильтрах сыворотки крови по интенсивности синей окраски, развивающейся при восстановлении фосфорновольфрамового реактива.

Оборудование: штатив с пробирками, пробирки центрифужные, пипетки объемом 1,0 мл, 2,0 мл, 5,0 мл, ФЭК, кюветы толщиной слоя 13 мм или 5 мм, центрифуга (1500 об/мин), центрифужные весы.

Реактивы:

1. Серная кислота, 0,35М раствор*.
2. Вольфрамата натрия, 10 % раствор.
3. Мочевой кислоты стандартный раствор, 0,03М*.
4. Карбонат натрия, 10,3 % раствор.
5. Фосфорновольфрамовый реактив (реактив Фолина)*.
6. Дистиллированная вода.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Ход работы. В центрифужную пробирку внести 1 мл сыворотки крови, добавить 8 мл дистиллированной воды и 0,5 мл 0,35 М серной кислоты, перемешать. Затем добавить 0,5 мл 10 % раствора вольфрамата натрия, опять перемешать и через 10 мин центрифугировать в течение 10 мин. при 1500 об/мин. После осаждения белков сыворотки крови центрифугированием ставить в трех чистых пробирках опытную, стандартную и контрольную пробы.

Опытная проба: В пробирку перенести 3 мл надосадочной жидкости.

Стандартная проба: Внести в пробирку 3 мл 0,03М стандартного раствора мочевого кислоты (содержит 6 ммоль/л мочевого кислоты).

Контрольная проба: В пробирку прилить 3 мл дистиллированной воды. Во все три пробирки добавить 1,5 мл 10,3 % раствора карбоната натрия, 1 мл фосфорновольфрамового реактива, тщательно перемешать и через 30 минут опытную и стандартную пробы фотометрировать при длине волны 590-700 нм (красный светофильтр) в кювете толщиной слоя 10 мм против контрольной пробы.

Расчет: концентрацию мочевого кислоты рассчитать по формуле:

$$C = E_{\text{опыт.}} / E_{\text{станд.}} \times C_{\text{станд.}} \times 10, \text{ где}$$

C- концентрация мочевого кислоты, ммоль/л ;

$E_{\text{опыт.}}$ – экстинция опытной пробы ;

$E_{\text{станд.}}$ - экстинция стандартной пробы;

$C_{\text{станд.}}$ – концентрация стандартного раствора мочевого кислоты, 0,03 ммоль/л; коэффициент пересчета на объем сыворотки крови – 10.

Клинико-диагностическое значение. Содержание мочевой кислоты в норме составляет у женщин 140-310 мкмоль/л, у мужчин 200-240 мкмоль/л. Повышение концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови наблюдается при патологических состояниях, связанных с интенсификацией распада нуклеиновых кислот (лучевая болезнь, лейкозы, аллергия, диабет). Особенно резко повышается уровень мочевой кислоты при подагре.

Снижение содержания мочевой кислоты в сыворотке крови выявляется при анемии, при приеме некоторых лекарственных веществ (пиперазин, салицилаты, атофан и др.)

Вывод

Работа № 64. Количественное определение мочевой кислоты в моче.

Принцип метода. Метод основан на способности мочевой кислоты превращать фосфорновольфрамную кислоту в фосфорновольфрамную – синюю, интенсивность окраски которой пропорциональна содержанию мочевой кислоты. Количество фосфорновольфрамной кислоты определяется путем титрования красной кровяной солью.

Оборудование: бюретки для титрования, колбочки или стаканчики для титрования, пипетки объемом 1 мл и 2 мл.

Реактивы:

1. Бикарбонат натрия (Na_2CO_3), 20 % раствор.
2. Фосфорновольфрамный реактив (реактив Фолина) *.
3. Красная кровяная соль ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), 0,01 N раствор*.

Исследуемый материал: моча.

Ход работы. В колбочку (стаканчик) поместить 1,5 мл мочи, прибавить 1 мл 20 % раствора NaCO_3 и 1 мл фосфорновольфрамного реактива Фолина, перемешать, отметить появление синего окрашивания. Содержимое титровать 0,01 N раствором красной кровяной соли до исчезновения окрашивания.

Расчет. При расчете учесть, что 1 мл красной кровяной соли расходуется на окисление 0,8 мг мочевой кислоты.

$$X = K \times A \times B / 1,5, \text{ где}$$

X - содержание мочевой кислоты, мг/сут;

К - коэффициент пересчета (1 мл 0,01 N раствора ($K_3[Fe(CN)_6]$ соответствует 0,8 мг мочевого кислоты);

А - количество красной кровяной соли, пошедшей на титрование;

В - суточный диурез, мл.

Клинико-диагностическое значение. В норме у человека с мочой выделяется 1,48 – 4,43 ммоль/сут (250 - 750 мг/сут) мочевого кислоты. У мужчин несколько больше, чем у женщин. Увеличение выведения солей мочевого кислоты наблюдается при подагре, мочекишлом диатезе, некоторых гематологических заболеваниях, интенсивном лечении опухолей, питании пищей, богатой пуринами.

Вывод.

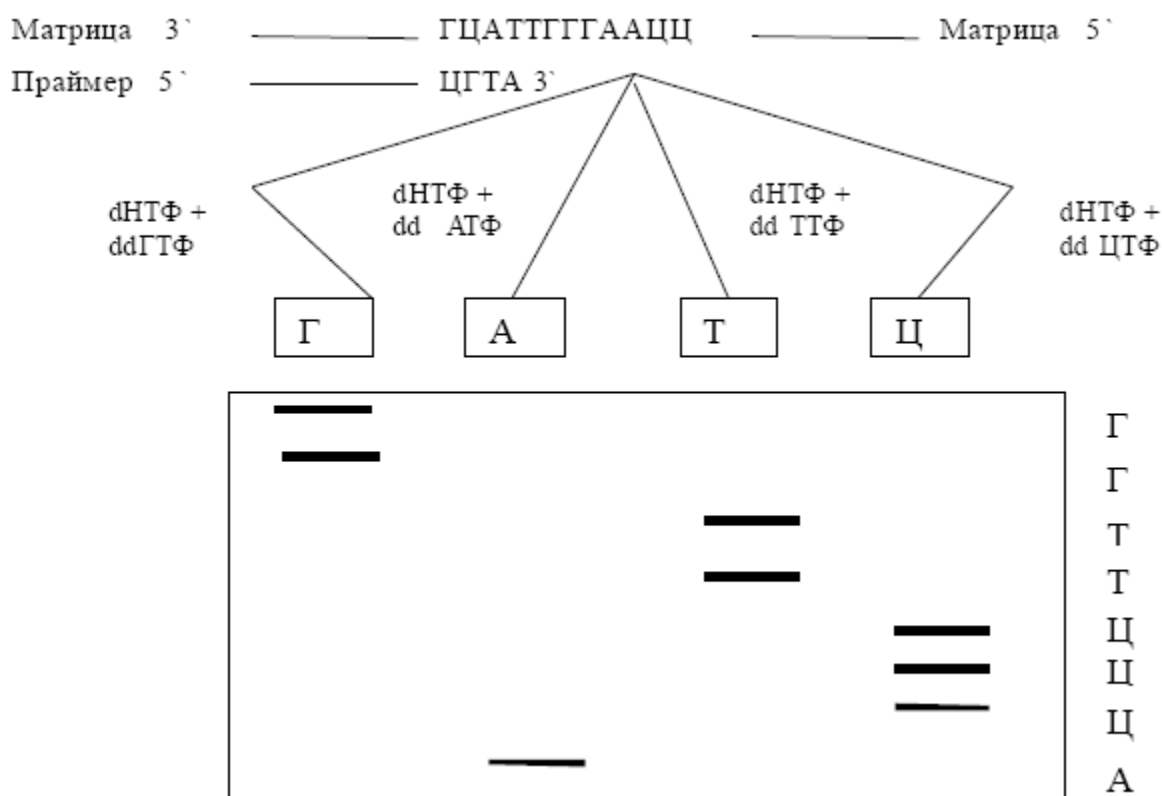
Работа № 65. Секвенирование – исследование последовательности нуклеотидов ДНК (симуляционно).

Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот - ДНК и РНК) - определение их первичной аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от англ. sequence - последовательность). В результате получается линейное символьное описание, которое сжато резюмирует структуру молекулы. Для секвенирования применяются методы Эдмана, Сэнджера и другие.

В настоящее время для секвенирования нуклеиновых кислот обычно применяется метод Сэнджера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP). Обычно до начала секвенирования производят амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить, при помощи цепной полимеразной реакции (ПЦР).

Дезоксинуклеотидный метод, или метод «обрыва цепи», был разработан Ф. Сенджером в 1977 году и в настоящее время широко используется для определения нуклеотидной последовательности ДНК. Он включает использование дидезоксинуклеозидтрифосфатов (2',3'-дидезоксиНТФ) в модельной системе репликации ДНК. В эту модельную систему входит также набор всех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, ДНК-полимераза, небольшой олигонуклеотид, выполняющий роль затравки, и исследуемая молекула ДНК, которая служит матрицей для репликации. ДНК полимераза добавляет очередной мононуклеотид к

3'-ОН группе предыдущего мононуклеотида, следуя комплементарным «указаниям» ДНК матрицы. 2',3'-дидезоксиНТФ не имеют 3'-ОН группы в дезоксирибозе. Поэтому добавление таких нуклеотидов останавливает синтез ДНК в момент присоединения dd-НТФ. По окончании реакции продукты разделяются методом электрофореза в присутствии мочевины как денатурирующего агента. После высушивания гель экспонируют с рентгеновской пленкой. Фракции внизу геля соответствуют низкомолекулярным продуктам, а сверху – высокомолекулярным (рис.).

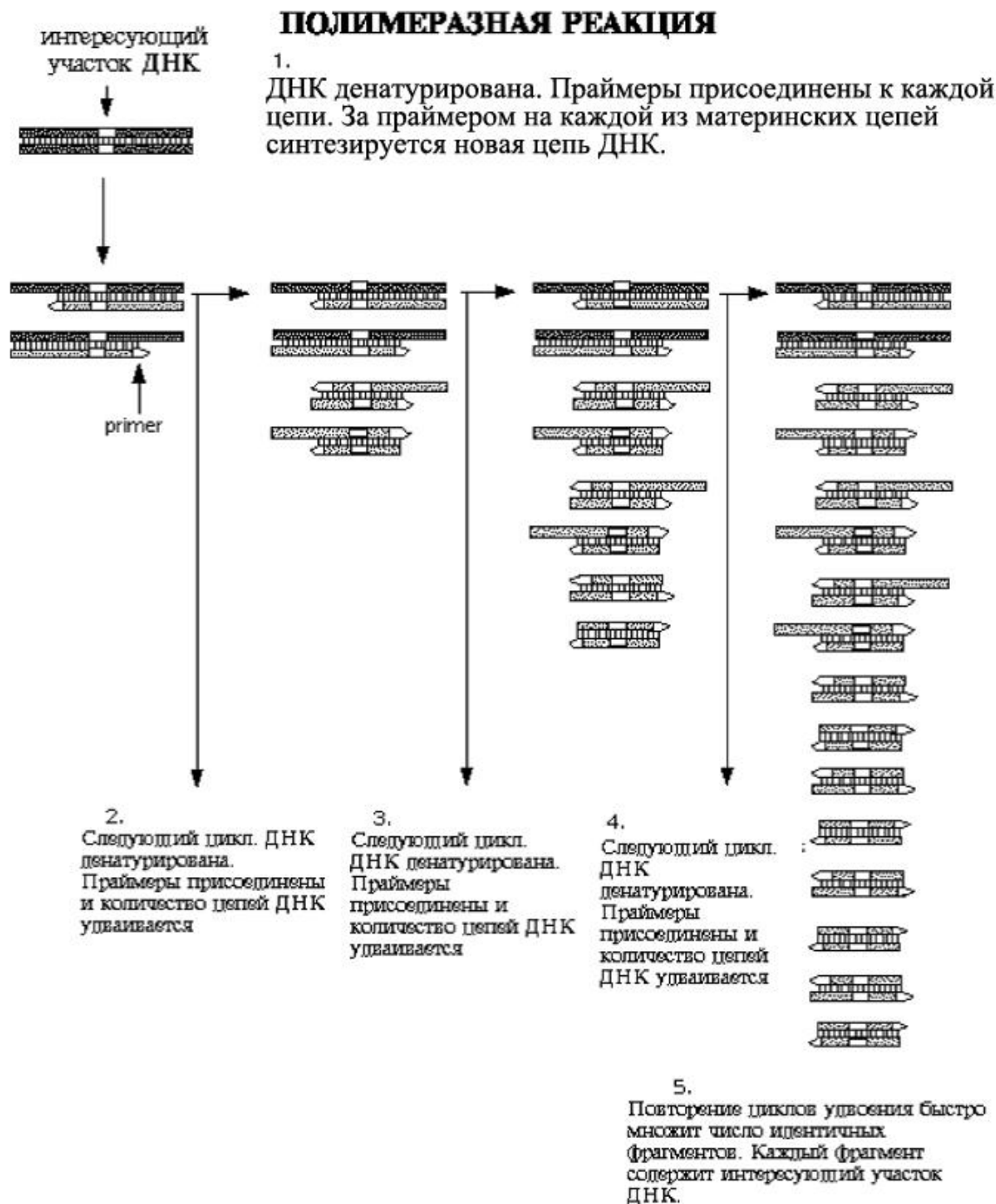


Этот метод в последнее время вытеснил другие методы исследования первичной структуры белков. Зная последовательность нуклеотидов, можно легко установить последовательность аминокислот.

В последнее время чаще дидезоксинуклеотиды метят четырьмя разными флуоресцентными красителями и проводят ПЦР в одной пробирке. Затем во время электрофореза в полиакриламидном геле луч лазера в определенном месте геля возбуждает флуоресценцию красителей, и детектор определяет, какой нуклеотид в настоящий момент мигрирует через гель. Современные приборы используют для секвенирования ДНК капиллярный электрофорез.

Работа № 66. Полимеразная цепная реакция (симуляционно).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).



Помимо амплификации (увеличения числа копий) ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (вве-

дение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов.

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации) с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20-40 тысяч пар нуклеотидов (это значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки, т.к. геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований).

Для проведения ПЦР требуются следующие компоненты:

1. ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
2. Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
3. Термостабильная ДНК-полимераза - фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов - *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.
4. Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
5. Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
6. Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции – pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

Добавление пирофосфатазы может увеличить выход ПЦР-реакции. Этот фермент катализирует гидролиз пирофосфата, побочного продукта присоединения нуклеотидтрифосфатов к растущей цепи ДНК, до ортофосфата. Пирофосфат может ингибировать ПЦР-реакцию.

Три этапа полимеразной реакции проводятся в одном и том же сосуде, но при разной температуре.

1. Вначале двойную спираль ДНК разделяют на две цепи. Это достигается простым нагреванием реакционного сосуда до 90-95⁰С в течение 30 сек.

2. Праймер, синтезированный искусственно, или выделенный из клеток, не может связываться при такой высокой температуре с цепями ДНК. Поэтому сосуд охлаждают до 55⁰С. Охлаждение вызывает «отжиг» праймера. Он присоединяется к концам цепей ДНК. Процедура занимает около 20 сек.

3. Затем действует Taq-полимераза. Ее температурный оптимум - 75⁰С (температура горячего источника, где была открыта бактерия), поэтому температуру в реакционном сосуде вновь повышают. Фермент начинает катализировать присоединение нуклеотидов к праймеру и таким образом постепенно образует копию матрицы. На этом полимеразный цикл завершается.

Все три этапа полимеразной реакции: расхождение цепей, присоединение праймера к матрице, синтез дочерних цепей, занимают менее 2 минут. Они проводятся в одном и том же сосуде. По завершении цикла каждый фрагмент ДНК в сосуде удваивается.

Цикл можно повторять до 30 и более раз. Вновь синтезированные участки ДНК, в свою очередь, становятся матрицей. Таким образом, через 30 циклов можно получить 10⁶ копий какого-то участка ДНК. С учетом времени, затраченного на изменение температуры в реакционном сосуде, 1 миллион копий может быть получен в течение 3 часов.

Этот метод позволяет довольно быстро получить большое количество необходимых для дальнейшего исследования фрагментов молекулы ДНК.

Работа № 67. Клонирование - способ получения больших количеств идентичных молекул нуклеиновых кислот или фрагментов (симуляционно).

Технология рекомбинантной ДНК состоит в следующем.

Ген или фрагмент ДНК вклеивают в ДНК *E.coli*. Бактериальные клетки быстро размножаются, образуя миллиарды копий. В ДНК каждой из них содержится копия вставленного гена или фрагмента ДНК.

Известны несколько основных классов векторов, позволяющих встраивать исследуемый нуклеотидный фрагмент в геном клетки хозяина. К ним относятся плазмиды, лямбда-бактериофаги, хромосомы дрожжей или бактерий. Выбор определяется размерами переносимого фрагмента. Плазмиды могут переносить фрагменты менее 10.000 пар оснований, бактериофаги – до 25.000. Для переноса более крупных фрагментов используют векторы - химеры (плазмида-лямбда вектор), называемые космидами.

Еще более крупные фрагменты, необходимые для работы с геномом человека, переносят с использованием хромосомы дрожжей.

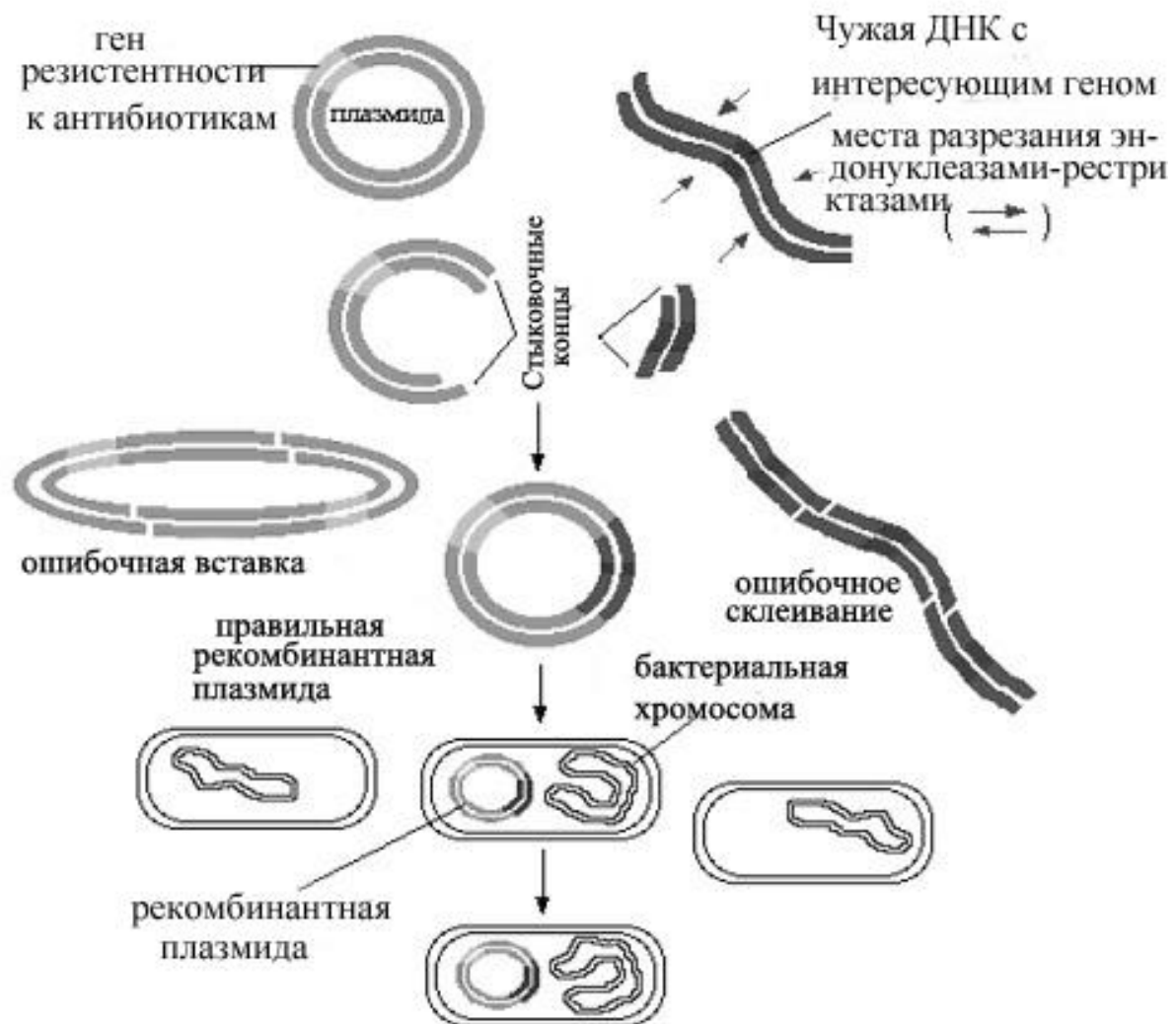
Приводим схему такого процесса с использованием плазмиды.

1. Выделение геномной (хромосомной) ДНК из исследуемых клеток.
2. Создание плазмидной библиотеки фрагментов ДНК человека, образовавшихся после действия рестриктаз. Фрагменты присоединяются к векторам, и последние переносят их в геном бактерии. Образуется коллекция колоний бактерий, каждая из которых содержит разные плазмиды с различными встроенными кусочками ДНК.
3. Посев колоний на чашки с агаром для последующего роста (так называемые «чашки хозяина»).
4. Снятие реплик с колоний бактерий, выросших на твердой питательной среде. Для этого накладывают и прижимают фильтр из нитроцеллюлозы на каждую такую чашку; часть из каждой колонии останется на чашке, часть – в виде реплики (отпечатка) на фильтре.
5. Разрушают (лизуют) бактерии на фильтре в условиях, при которых плазмидная ДНК станет одноцепочечной и свяжется с фильтром. Наличие на фильтре зон с одноцепочечной ДНК соответствует местоположению бактериальных колоний на чашке хозяина.

6. Нитроцеллюлозный фильтр обрабатывают, как и электрофореграмму, с использованием в качестве зонда комплементарный искомому гену меченый полинуклеотид. После радиоавтографии реплики, обработанной зондом, на рентгеновской пленке будет видно темное пятно, которое соответствует месторасположению на фильтре ДНК искомого гена.

7. Забор бактерий из соответствующей колонии, выращивание их в питательном бульоне и экстракция плазмидной ДНК. Она содержит в своем составе фрагмент ДНК человека с искомым геном.

Встраивание в плазмиду фрагмента ДНК



Возможно, также клонировать ген X с использованием антитела к белку, продуцируемому этим геном. В таком случае создается библиотека экспрессии. При её создании фрагменты ДНК человека встраиваются в плазмиды, которые содержат в своем составе сильный промотор E.coli (с кодоном АТГ). Клетки, с

включенными в них такими плазмидами, будут синтезировать большое количество белка (трансляция). Если на фильтре сделать отпечатки колоний клеток с последующим их лизисом, высвобожденные белки можно подвергнуть зондированию при помощи антител. Тем самым будет обнаружена колония, которая содержит плазмиду, вызывающую экспрессию белка. В ней-то и содержится ген X.

Таким образом, приведенное описание технологии клонирования гена, хотя и не передает полностью необычайную её сложность, дает возможность понять, как, используя рекомбинантную ДНК, становится возможным производить необходимые для медицины и экономики вещества, а также получать достаточно материала для дальнейших исследований.

Контрольные вопросы к разделу «Обмен аминокислот, белков и нуклеотидов»

1. Какова диагностическая ценность определения уропепсина?
2. Почему при определении активности уропепсина необходимо довести предварительно рН исследуемой мочи до 1,5?
3. Каков принцип определения активности уропепсина по методу Веста?
4. Клинико-диагностическое значение определения активности аланинаминотрансферазы связано с процессами цитолиза. Дайте объяснение.
5. При каких состояниях может повышаться содержание мочевины в моче?
6. Охарактеризуйте диагностическую ценность определения мочевины в сыворотке крови.
7. При проведении какой пробы с мочой новорожденных возможно раннее выявление фенилпировиноградной олигофрении?
8. Перечислите заболевания, при которых повышается в крови уровень мочево́й кислоты.
9. Каково содержание мочево́й кислоты в сыворотке крови в норме а) у женщин, б) у мужчин?
10. На чем основан принцип определения количества мочево́й кислоты в биологических жидкостях?

МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Работа № 68. Определение кальция в сыворотке крови титрометрическим методом с использованием мурексида

Принцип метода. Основан на образовании ионов кальция с мурексидом в щелочной среде комплексного соединения, окрашенного в красно-фиолетовый или бледно-розовый цвет. При титровании раствором более сильного комплексобразователя (ЭДТА, версен, хелатон), мурексид из комплекса с Ca^{2+} освобождается и придает раствору фиолетовый или бледно-сиреневый цвет.

Реактивы:

1. Гидроксид натрия; 9 н раствор*.
2. Мурексид сухой.
3. ЭДТА, 0,01 молярный раствор*.

Оборудование: штатив с пробирками, колбочки мерные на 50 мл, пипетки объемом 0,2 мл, 1 мл и 10 мл, мерный цилиндр.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Ход работы. В колбочку внести 50 мл дистиллированной воды, 0,4 мл 9н раствора NaOH и прибавить несколько крупинок мурексида, образуется бледно-сиреневая окраска. Пробу разлить поровну в две колбочки. Одна из них служит эталоном, другая для постановки опыта. В опытную колбочку прилить 1 мл сыворотки крови, отметить изменение окраски и оттитровать 0,01М раствором ЭДТА (версена, хелатона) до окраски эталона.

Расчет вести по формуле:

$$C = 1,79 \times A, \text{ где}$$

C- концентрация ионов кальция в ммоль/л; 1,79 – коэффициент; A- количество мл комплексона.

Клинико-диагностическое значение. Содержание ионов кальция в сыворотке крови здорового человека составляет 2,25-2,6 ммоль/л. В клинической практике встречается физиологическая и патологическая гиперкальциемия. Физиологическая – имеет место у новорожденных после 4-го дня жизни.

Гиперкальциемия обнаруживается при гиперпаратиреозе, назначе-

нии чрезмерных доз витамина Д, синдроме Иценко-Кушинга, акромегалии, лейкозах, сердечной недостаточности и других состояниях.

Гипокальциемия отмечена при спазмофилии в детском возрасте, рахите, хронических нефритах, гипопаратиреоидизме, диареи, остром панкреатите и др.

Вывод.

Работа № 69. Определение содержания кальция с индикаторным реактивом.

Принцип метода. В кислой среде ионы кальция взаимодействуют с индикаторным реактивом Арсеназо III с образованием комплекса малинового цвета, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна содержанию кальция в пробе.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки объемом 1 мл, микропипетки – дозаторы, наконечники, кюветы толщиной слоя 3 мм или 5 мм, ФЭК.

Исследуемый материал: сыворотка крови, слюна.

Реактивы: Набор реагентов «Кальций-Ново» ЗАО «Вектор-Бест»

1. Реагент – ацетатный буфер, содержащий Арсеназо III, детергент;
2. Калибратор – калибровочный раствор ионов кальция (2,5 ммоль/л).

Ход работы. Внести в две пробирки реагенты согласно таблице:

отмерить, мл	опытная проба	калибровочная проба
реагент	1,0	1,0
сыворотка крови (слюна)	0,01	-
калибратор	-	0,01

Пробы перемешать. Измерить на ФЭКе оптическую плотность опытной ($E_{оп}$) и калибровочной (E_k) проб против реагента, при длине волны 650 (600-670) нм, в кюветах толщиной слоя 3 мм или 5 мм.

Расчет. Концентрацию ионов кальция в сыворотке крови (С) в ммоль/л рассчитать по формуле: $C = E_{оп} / E_k \times 2,50$, где 2,50 – концентрация ионов кальция в калибраторе, ммоль/л.

Нормальные величины: в сыворотке крови – 2,02 – 2,60 ммоль/л.

Вывод.

Работа № 70. Комплексометрическое определение кальция в сыворотке крови.

Принцип метода. При титровании Трилоном Б комплексного соединения мурексида с кальцием из него постепенно высвобождаются ионы кальция и связываются в виде недиссоциирующего комплекса с трилоном Б (рН 10,7). Момент полного связывания кальция характеризуется изменением цвета мурексида с розового в фиолетовый.

Оборудование: штатив с широкими пробирками или стаканчики для титрования, пипетки глазные, пипетки объемом 1 мл, 5 мл.

Реактивы:

1. Трилон Б, 0,002М раствор*.
2. Гидроксид натрия (NaOH), 10 % раствор.
3. Вода дистиллированная.
4. Мурексид, 0,1 % раствор.

Исследуемый материал: сыворотка крови

Ход работы. Внести в широкую пробирку или стаканчик 1,0 мл сыворотки крови, прибавить 3,0 мл дистиллированной воды, 4 капли 10 % раствора гидроксида натрия и 5 капель 0,1 % раствора мурексида. Титровать 0,002М раствором трилона Б до появления фиолетового окрашивания.

Расчет. Произвести расчет по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 0,08 \cdot 100 \cdot 0,25}{v}, \text{ где}$$

X – концентрация кальция (ммоль/л); а-количество мл трилона Б, пошедшего на титрование; 0,08 – количество кальция, соответствующее 1 мл 0,02М раствора трилона Б; 0,25 – коэффициент пересчета в моль/л; в – количество сыворотки, взятое для титрования.

Нормальные величины содержания кальция в сыворотке крови 2,25-2,75 ммоль/л.

Вывод.

Работа № 71. Определение содержания неорганического фосфора в сыворотке крови.

Принцип метода. После осаждения белков в центрифугате остается неорганический фосфор, который при взаимодействии с молибденовой кислотой образует фосфорномолибденовую кислоту. Последняя восстанавливается аскорбиновой кислотой до синего фосфорномолибденового комплекса, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфора.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы:

1. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 10 % раствор.
2. Молибденовокислый аммоний, 5 % раствор в 5н серной кислоте*.
3. Аскорбиновая кислота, 5 % раствор.
4. Стандартный раствор фосфора, содержащего 2,58 ммоль/л фосфора (0,438 г высушенного $\text{KН}_2\text{PО}_4$ растворить в мерной колбе и довести до 100 мл дистиллированной водой).
5. Вода дистиллированная.

Оборудование: штатив с пробирками, пробирки центрифужные, пипетки объемом 0,1 мл, 1 мл и 5 мл, центрифужные весы, кюветы толщиной слоя 10 мм, ФЭК, центрифуга лабораторная.

Ход работы. Опытная проба: в центрифужную пробирку поместить 0,5 мл сыворотки крови, смешать с 2,0 мл дистиллированной воды и 2,5 мл 10 % раствора ТХУ. Через 10 мин пробирку центрифугировать при 1500 об/мин. 2,5 мл центрифугата перенести в сухую пробирку, прилить 0,5 мл 5 % раствора молибденовокислого аммония в 5н серной кислоте, 0,1 мл 5 % раствора аскорбиновой кислоты и 0,9 мл дистиллированной воды.

Параллельно приготовить контрольные и калибровочную пробы.

Калибровочная проба: в пробирку поместить 1 мл стандартного раствора, 1,2 мл 10% раствора ТХУ, 0,5 мл 5% раствора молибденовокислого аммония, 0,1 мг 5% раствора аскорбиновой кислоты и 1,2 мл дистиллированной воды.

Контрольная проба: ставят как опытную, но вместо центрифугата берут 2,5 мл раствора ТХУ и 1,5 мл дистиллированной воды.

Пробирки выдержать при комнатной температуре в течение 20 мин. Измерить на ФЭКе оптическую плотность опытной ($E_{оп}$) и калибровочной ($E_{к}$) проб против контрольной пробы, при длине волны 660-680 нм (красный светофильтр), в кюветах толщиной слоя 10 мм.

Расчет:

$$C = E_{оп} / E_{к} \times 0,5, \text{ где}$$

C- содержание неорганических фосфатов в моль/л, $E_{оп}$ и $E_{к}$ экстинкции соответствующих проб.

Нормальные величины. Уровень неорганических фосфатов в сыворотке крови у взрослых колеблется в пределах 0,70-1,60 ммоль/л, у детей до 1 года – 1,45-2,16 ммоль/л, у детей до 12 лет – 1,45-1,78 ммоль/л.

Клинико-диагностическое значение. Повышение уровня неорганического фосфора в крови наблюдается при метастазах опухоли в кости, саркаидозе, интоксикации витамином Д, почечной недостаточности, сахарном диабете с кетозом, акромегалии и др.

Снижение содержания неорганического фосфата бывает при остеомаляции, дефиците витамина Д, гиперпаратиреодизме, тяжелой диарее и других состояниях.

Вывод.

Контрольные вопросы к разделу «Водно-солевой обмен»

1. Каков принцип титрометрического определения содержания кальция в сыворотке крови?
2. Каково содержание общего кальция в физиологических условиях в сыворотке крови?
3. Каково содержание кальция в слюне в норме?
4. На чем основан метод колориметрического определения концентрации неорганического фосфора в сыворотке крови?
5. Каковы референтные значения содержания фосфора в сыворотке крови а) у здорового взрослого человека, б) у детей до года?

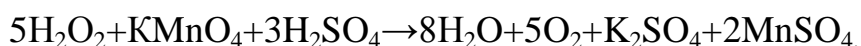
6. Каковы нормальные величины содержания фосфора в слюне?
7. Каково диагностическое значение определения хлоридов в сыворотке крови?
8. На образовании окрашенного комплекса с каким соединением связан принцип метода определения магния в биологических жидкостях?
9. Каково содержания магния в сыворотке крови в норме?.
10. Перечислите патологические состояния, которые могут сопровождаться гипокалиемией.
11. Перечислите патологические состояния, которые могут сопровождаться гиперкалиемией.

МЕХАНИЗМЫ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

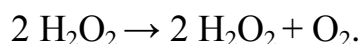
С биохимических позиций особенность печени можно обозначить как своеобразный «биохимический альтруизм». Печень синтезирует вещества «на экспорт», обеспечивая ими другие органы и ткани (белки крови, кетоновые тела, холестерин). Печень – главный орган обезвреживания токсических веществ, как экзогенных (аммиак, билирубин и др.), так и поступающих извне (лекарственных ксенобиотиков).

Работа № 72. Определение активности каталазы (КФ1.11.1.6) крови методом А.Н. Баха и С.Р. Зубковой.

Принцип метода. Метод основан на титровании избытка пероксида водорода, не расщепленного каталазой, перманганатом калия в кислой среде:



Активность каталазы выражается каталазным числом, которое представляет собой количество H_2O_2 в миллиграммах, разложенное 10^{-3} мл крови за 30 мин. Каталаза осуществляет распад пероксида водорода с образованием H_2O и молекулярного O_2 :



Оборудование: стаканчики или колбочки для титрования, бюретки со штативами, пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл.

Реактивы:

1. Пероксид водорода, 1 % раствор.
2. Серная кислота, 10 % раствор.
3. Перманганат калия, 0,1N раствор*.

Исследуемый материал: гемолизат крови, разведенный в 1000 раз.

Ход работы. В две колбочки или широкие пробирки отмерить по 7 мл дистиллированной воды и по 2 мл 1 % раствора пероксида водорода. В опытную пробу прилить 1 мл разведенной в 1000 раз крови. Обе пробы (опыт и контроль) оставить на 30 мин при комнатной температуре. Затем в обе пробы добавить по 3 мл 10 % раствора серной кислоты, которая останавливает действие каталазы. Содержимое опытной и контрольной проб оттитровать из

бюретки 0,1N раствором перманганата калия до появления устойчивой слаборозовой окраски.

Расчет. Разница между количеством мл 0,1N раствора KMnO_4 , пошедшего на титрование контрольной и опытной проб, укажет на количество мл 1% раствора H_2O_2 , разрушенного каталазой крови. Для перевода количества разрушенного пероксида водорода в мг надо это число умножить на 1,7 (1 мл 0,1N раствора H_2O_2 содержит 1,7 мг пероксида водорода).

Пример расчета: на титрование контрольной пробы пошло 12,5 мл 0,1N раствора перманганата калия, опыта – 4,5 мл. Следовательно, каталазное число соответствует: $(12,5-4,5) \times 1,7 = 13,6$ ед.

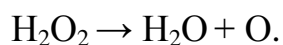
Нормальная величина активности каталазы в каталазных числах в крови у людей колеблется в пределах 11-20 ед.

Клинико-диагностическое значение. Снижение активности каталазы в эритроцитах наблюдается при развитии интоксикации, действии химических поллютантов, ряда воспалительных заболеваний.

Вывод.

Работа № 73. Определение активности пероксидазы крови (КФ1.11.1.7) по методу Н.И. Симаковой.

Принцип метода. Метод основан на окислении индигокармина кислородом, выделяющемся при разложении H_2O_2 под влиянием пероксидазы крови:



Активность пероксидазы измеряется временем, необходимым для окисления индигокармина, который меняет окраску от сине-зеленого в желто-розовый цвет.

Оборудование: секундомер, штатив с пробирками, пипетки объемом 1, 2 и 5 мл.

Реактивы:

1. Ацетатный буфер рН 4,7; 0,1М*.
2. Пероксид водорода, 0,2 % раствор.
3. Индигокармин, 0,001 % раствор.

Исследуемый материал: гемолизат крови, разведенный в 1000 раз.

Ход работы. В пробирку налить 2 мл 0,1М ацетатного буфера, прибавить 3 мл разбавленной в 1000 раз крови, 1 мл дистиллированной воды и 1 мл 0,01 % раствора индогокармина. Содержимое пробирки тщательно перемешать, быстро внести в нее 2 мл 0,2 % раствора H_2O_2 и засечь по секундомеру время перехода сине-зеленой окраски содержимого пробирки в желто-розовую.

Расчет. Поскольку гемоглобин обладает пероксидазным эффектом, то для расчета индекса активности фермента необходимо знать процентное содержание гемоглобина, принимая 160г/л Hb за 100 %.

Пример расчета: допустим переход окрашивания жидкости произошел за 40 секунд, а количество Hb в исследуемой крови составляет 144 г/л или 90,0 %. Следовательно, индекс пероксидазной активности будет равен:

$$40 \text{ сек} \times 100 \% / 90 \% = 44,4.$$

Нормальная величина индекса пероксидазной активности крови у здоровых лиц колеблется в пределах 30-50.

Клинико-диагностическое значение. Снижение индекса пероксидазной активности в эритроцитах выявляется при развитии интоксикации и действии поллютантов хлорорганической природы.

Вывод.

Работа № 74. Определение скорости пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах тканей.

Принцип метода. Метод основан на определении содержания продукта пероксидного окисления липидов – малонового диальдегида, который при взаимодействии с тиобарбитровой кислотой образует окрашенный в розовый цвет триметиновый комплекс, который имеет максимум оптического поглощения при 530-532 нм. Окраска пропорциональна концентрации малонового диальдегида, молярный коэффициент экстинкции которого $1,56 \times 10^5$ л/моль х см.

Оборудование: штатив с пробирками, пробирки центрифужные, весы центрифужные, пипетки объемом 0,1 мл, 0,2 мл, 1 мл и 5 мл, водяная баня кипящая, гомогенизатор, центрифуга лабораторная, ФЭК, кюветы толщиной слоя 3 мм или 5 мм, термостат при 38⁰С.

Реактивы:

1. Хлорид калия, 1,2 % раствор.
2. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 40 % раствор.
3. Тиобарбитуровая кислота, 0,8 % раствор свежеприготовленный.
4. Соль Мора – $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, 4×10^{-5} М раствор свежеприготовленный*.
5. Аскорбиновая кислота, 1 % раствор.
6. Вода дистиллированная.

Исследуемый материал: ткань печени, почки или сердца.

Ход работы. Навеску 0,5 г ткани гомогенизировать в 19,5 мл охлажденного до $0 - 4^{\circ}\text{C}$ раствора КСl, поместить гомогенизатор в стаканы со снегом или воды со льдом. Полученный гомогенат слить в чистую пробирку.

В три центрифужные пробирки внести по 2 мл гомогената. В первую пробирку добавить 0,2 мл дистиллированной воды, во вторую – 0,1 мл раствора аскорбиновой кислоты и 0,1 мл соли Мора, в третью – 0,1 мл раствора аскорбиновой кислоты, 0,1 мл соли Мора и 1 мл 40 % раствора ТХУ.

Все пробирки поместить в термостат на 15 мин при 38°C . после этого в первые две пробирки прилить по 1 мл 40 % раствора ТХУ, перемешать содержимое и центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин.

По 2 мл надосадочной жидкости отобрать соответственно в три чистые пробирки. К ним прилить по 1 мл 0,8 % раствора тиобарбитуровой кислоты и поместить в кипящую водяную баню на 10 мин. пробирки охладить под струей холодной воды. Параллельно приготовить контрольный раствор, содержащий 2 мл раствора хлорида калия, 1 мл 40 % раствора ТХУ, 1 мл 0,8 % раствора тиобарбитуровой кислоты и также выдержать 10 мин в кипящей водяной бане.

Измерить оптическую плотность содержимых проб против контрольной пробы на ФЭКе при 532 нм (зеленый светофильтр) в кюветах толщиной слоя 10 мм.

Расчет. Произвести по формулам:

$$X_1 (X_2) = E_1 (E_2) \times 3 \times 3,2 \times 4/0,156 \times 2 \text{ и } X_3 = E_3 \times 3 \times 3,2/0,156 \times 2, \text{ где}$$

X_1 – скорость спонтанного ПОЛ в гомогенате, измеряемого в нмоль малонового диальдегида в пробе за 1 час инкубации;

X_2 – скорость аскорбит – зависимого неферментативного ПОЛ в наномолях, образовавшегося малонового альдегида в исходном гомогенате;

E_1 , E_2 и E_3 – экстинкции соответствующих проб;

3,2 - общий объем исследуемых проб в мл;

2 – объем надосадочной жидкости, взятой на определение малонового диальдегида в мл;

0,156 – экстинкция 1 нмоль малонового диальдегида в 1 мл при 532нм.

Клинико – диагностическое значение. Определение скорости пероксидного окисления липидов биомембран важно для оценки влияния на эту систему различных соединений, природных кленобиотиков, лекарственных веществ.

Увеличение ПОЛ возможно при недостатке витамина Е, действии ионизирующего излучения, гипоксии, гипербирической оксигенации, различных патологических состояниях.

Вывод.

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: Интерпресссервис, 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/](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
Аспаратаминотрансфераза (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 тёмного 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 $pH=2,9 - 4,0$ (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; pH 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 мочевой 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.

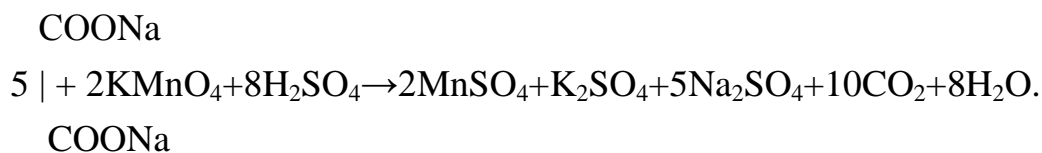
55. *Калий йодноватокислый, основной 0,01 н. раствор.* Готовят из фиксаля или отвешивают на аналитических весах 0,3567 г химически чистого KJO_3 высушенного до постоянного веса при температуре 102°C , растворяют в мерной колбе в 1 л дистиллированной воды.

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 рН 3,0 и ниже и в красный – при рН 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 бромноватисто-кислый (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 мочевого кислоты.* К 0,5 г чистой, хорошо высушенной в эксикаторе мочевого 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 мочевого 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% глицериновый 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 2

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. 5,75.

Тираж 31 экз. Заказ № 71

450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3,

Тел.: (347) 272-86-31

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России