

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
Институт естественных наук
Кафедра физиологии, клеточной биологии и биотехнологии

БИОХИМИЯ ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ

Лабораторный практикум



Ижевск
2024

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072.3я73-5
Б638

Рекомендовано к изданию учебно-методическим советом УдГУ

Рецензенты: канд. биол. наук, доцент каф. мед. биологии
ФГБОУ ВО «ИГМА» Н.В. Кормилина

Составители: Мадера Е.А., Шунайлова Н.Ю.

Б638 Биохимия обменных процессов : лабораторный практикум /
сост. : Е.А. Мадера, Н.Ю. Шунайлова. – Ижевск : Удмуртский
университет, 2024. – 86 с.

Лабораторный практикум включает описание доступных лабораторных работ, позволяющих студентам усвоить теоретический материал по дисциплинам «Физиология обменных процессов», «Биохимия и молекулярная биология», «Спец-практикум по физиологии и клеточной биологии», «Биохимия спорта» и получить представление о реальной практической деятельности лаборанта биолога. Выполняя эти работы, студенты получают навыки самостоятельной работы на современном оборудовании при проведении научно-исследовательской деятельности.

Руководство предназначено для студентов направлений
06.03.01 Биология, 49.03.01 Физическая культура.

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072.3я73-5

© Е.А. Мадера, Н.Ю. Шунайлова, сост., 2024
© ФГБОУ ВО «Удмуртский
государственный университет», 2024

Введение

Выпускники ОП 06.03.01 «Биология» должны владеть широким спектром физико-химических, цитологических, молекулярно-биологических, биохимических методов, методами диагностики и коррекции состояния организма.

Цель данного лабораторного практикума – ознакомить студентов с основными биохимическими методами исследования показателей белкового, углеводного и липидного обмена.

Практикум содержит инструкции по охране труда и технике безопасности при работе с биологическими материалами, правила получения биологического материала для исследований, порядок работ на разных фотокolorиметрах.

Каждая из 24 лабораторных работ, представленных в практикуме, содержит описание принципа метода определения биохимического показателя, перечень необходимого оборудования и реактивов, подробное описание хода работы, нормальные значения.

Освоение данных лабораторных работ является частью практической подготовки, поскольку студенты обучаются основным приемам и навыкам, необходимым в будущей профессиональной деятельности биолога в области клеточной биологии и физиологии человека и животных, медицинской биохимии, экологической физиологии, физиологии труда и спорта, биомедицины, клинической лабораторной диагностики.

Лабораторные работы на биологическом материале развивают универсальные компетенции системного и критического мышления, а также способствуют закреплению теоретических и формированию практических основ профессиональной

деятельности для оценки и коррекции состояния живых объектов. Студенты в ходе лабораторного практикума учатся анализировать, сравнивать, обобщать, представлять результаты в таблицах, схемах, выводах. Работы можно выполнять самостоятельно и в мини-группах, что способствует развитию коммуникативных навыков.

Лабораторный практикум рекомендуется для проведения лабораторных занятий по дисциплинам «Физиология обменных процессов», «Спецпрактикум по физиологии и клеточной биологии», «Биохимия и молекулярная биология», «Биохимия спорта». Представленные биохимические методики могут быть полезны для организации самостоятельной научно-исследовательской работы студентов.

1. Инструкция по охране труда и технике безопасности при работе с биологическими материалами

Данная инструкция составлена на основе инструкции по охране труда при работе с кровью и другими биологическими жидкостями Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 18 декабря 2020 г. № 928н.

1.1. Общие требования охраны труда

1.1. К самостоятельной работе, при которой возможен контакт с кровью и другими биологическими жидкостями, допускаются лица не моложе 18 лет, не имеющие медицинских противопоказаний, обученные безопасным методам работы и прошедшие инструктаж в объеме данной инструкции.

1.2. При работе следует руководствоваться принципом, что весь биологический материал потенциально инфицирован.

1.3. При выполнении работ с кровью и другими биологическими жидкостями возможны механические повреждения кожи (порезы кистей рук при открывании бутылок, флаконов, пробирок с кровью или сывороткой).

1.4. Работу необходимо выполнять в средствах индивидуальной защиты, предусмотренных санитарными нормами: халат х/б, медицинские перчатки, надетые поверх рукавов медицинского халата.

1.5. В кабинете, где возможен контакт с биологическими жидкостями пациентов, должна быть аварийная аптечка «Анти-СПИД», в состав которой входят:

- 70 % этиловый спирт, ватно-марлевые тампоны;

- 0,05 % раствор марганцовокислого калия или навеска препарата в сухом виде с необходимым количеством дистиллированной воды для приготовления раствора;
- 5 % спиртовой раствор йода;
- бактерицидный пластырь;
- глазные пипетки, одноразовый шприц;
- перевязочный материал.

1.2. Требования охраны труда перед началом работы

2.1. Надеть и привести в порядок рабочую одежду: халат х/б, застегнуть манжеты и полы халата, подобрать волосы.

2.2. Подготовить и проверить средства индивидуальной защиты.

2.3. Повреждения кожи на руках, если таковые имеются, заклеить пластырем или надеть напальчники.

2.5. К проведению инвазивных процедур не допускается персонал в случае:

- обширных повреждений кожного покрова;
- экссудативных повреждений кожи;
- мокнущего дерматита.

1.3. Требования охраны труда во время работы

3.1. Неукоснительно соблюдать меры индивидуальной защиты, особенно при проведении инвазивных процедур, сопровождающихся загрязнением рук кровью и другими биологическими жидкостями:

- работать в резиновых перчатках, при повышенной опасности заражения – в двух парах перчаток;
- осторожно обращаться с острым медицинским инструментарием;

- после дезинфекции использованные одноразовые острые инструменты утилизировать в твердых контейнерах;
- после снятия перчаток замочить их в дезрастворе на 1 час, руки вымыть с мылом и вытереть индивидуальным полотенцем;
- снимать перчатки осторожно, чтобы не загрязнить руки;
- резиновые перчатки, снятые единой, повторно не использовать из-за возможности загрязнения рук.

3.2. Для предохранения себя от инфицирования через кожу и слизистые оболочки соблюдать следующие правила:

- избегать притирающих движений при пользовании бумажным полотенцем, т. к. при этом повреждается поверхностный эпителий;
- применять спиртовые дезинфекционные растворы для рук; дезинфекцию рук никогда не следует предпочитать использованию одноразовых перчаток; руки необходимо мыть водой с мылом, каждый раз после снятия защитных перчаток;
- после любой процедуры необходимо двукратно тщательно мыть руки в проточной воде с мылом;
- руки следует вытирать только индивидуальным полотенцем, сменяемым ежедневно, или салфетками одноразового использования;
- избегать частой обработки рук раздражающими кожу дезинфектантами, не пользоваться жесткими щетками;
- никогда не принимать пищу на рабочем месте;
- сделать прививку против гепатита В;

- для защиты слизистых оболочек ротовой полости и носа применять 4-х-слойную марлевую маску. Маска должна плотно прилегать к лицу;
- надевать халат или фартук либо и халат, и фартук, чтобы обеспечить надежную защиту от попадания на участки тела биологических жидкостей. Защитная одежда должна закрывать кожу и одежду персонала, не пропускать жидкость, поддерживать кожу и одежду в сухом состоянии.
Передать большую заразную дозу через одежду практически невозможно.

3.3. Использовать барьерные средства защиты необходимо не только при работе с инфицированным биологическим материалом, любой биологический материал считается потенциально опасным в отношении инфекционных заболеваний.

3.4. В лаборатории при работе с кровью, сывороткой или другими биологическими жидкостями запрещается:

- пипетировать ртом, следует пользоваться резиновой грушей или механическим пипетатором;
- переливать кровь, сыворотку через край пробирки;
- использовать для маркировки пробирок этикетки из лейкопластыря. Пробирки следует маркировать карандашом или маркером по стеклу.

3.5. При центрифугировании исследуемого материала центрифуга обязательно должна быть закрыта крышкой до полной остановки ротора.

3.6. Разборку, мойку и промывку медицинского инструментария, соприкасавшегося с кровью или сывороткой, нужно проводить после предварительной дезинфекции. Работу осуществлять в резиновых перчатках.

3.7. Предметы одноразового пользования: шприцы, перевязочный материал, перчатки, маски после использования должны подвергаться дезинфекции с последующей утилизацией.

1.4. Требования охраны труда в аварийных ситуациях

4.1. К аварийным ситуациям относятся:

- разрыв перчаток;
- проколы и порезы колющими и режущими инструментами;
- попадание крови и других биологических жидкостей на слизистые оболочки и кожные покровы;
- разбрызгивание крови и др.

4.2. К манипуляциям, которые могут привести к аварийной ситуации, в частности, относятся:

- инвазивные процедуры;
- соприкосновение со слизистыми оболочками (целыми и поврежденными);
- соприкосновение с поврежденной кожей пациентов;
- контакт с поверхностями, загрязненными кровью или другими биологическими жидкостями.

4.3. При загрязнении рук кровью и другими биологическими жидкостями следует тщательно протереть их тампоном, смоченным кожным антисептиком, после чего вымыть проточной водой с мылом.

При загрязнении рук, защищенных перчатками, перчатки обработать салфеткой, затем вымыть проточной водой, снять перчатки рабочей поверхностью внутрь, вымыть руки и обработать их кожным антисептиком.

4.4. При загрязнении рук кровью, биологическими жидкостями следует немедленно обработать их в течение не менее 30 секунд тампоном, смоченным кожным антисептиком, вымыть их двукратно водой с мылом и насухо вытереть чистым полотенцем (салфеткой).

4.5. Если контакт с кровью, другими биологическими жидкостями или биоматериалами сопровождается нарушением целостности кожи (уколом, порезом), то необходимо предпринять следующие меры:

- вымыть руки, не снимая перчаток, проточной водой с мылом;
- снять перчатки рабочей поверхностью внутрь и сбросить их в дезраствор;
- выдавить кровь из раны;
- вымыть руки с мылом;
- обработать рану 70 % спиртом, затем кожу вокруг раны 5 % спиртовым раствором йода;
- на рану наложить бактерицидный пластырь, надеть напальчник, а при необходимости продолжать работу – надеть новые резиновые перчатки.

4.6. При попадании крови или жидкостей на слизистую носа – закапать 0,05 % раствор марганцовокислого калия, рот и горло немедленно прополоскать 70 % спиртом или 0,05 % раствором марганцовокислого калия.

4.7. При попадании биологических жидкостей в глаза следует немедленно промыть их проточной водой, затем промыть их раствором марганцовокислого калия при помощи одноразового шприца в соотношении 1: 10000.

Раствор готовят из навески 0,01 г марганцовокислого калия и 100 мл дистиллированной воды, до полного растворения кристаллов (3 мин.).

4.8. При попадании биологического материала на халат, одежду предпринять следующее:

- одежду снять и замочить в одном из дезрастворов;
- кожу рук и других участков тела при их загрязнении, через одежду, после снятия одежды, протереть 70 % раствором этилового спирта;
- поверхность промыть водой с мылом и повторно протереть спиртом;
- загрязненную обувь двукратно протереть тампоном, смоченным в растворе одного из дезинфекционных средств.

4.9. При попадании инфицированного материала на поверхности стен, пола, оборудования - протереть их 6%-ной перекисью водорода 3% хлорамином или др. рекомендованными дезсредствами, двукратно с интервалом в 15 минут.

1.5. Требования охраны труда по окончании работы

5.1. Разовые шприцы и инструменты после использования поместить в непротекаемый контейнер.

5.2. Острые предметы, подлежащие повторному использованию, поместить в прочную емкость для обработки.

5.3. Использованные иглы не ломать вручную, не сгибать, не одевать повторно колпачки.

5.4. Загрязненные кровью перчатки обработать тампоном с дезраствором, снять и погрузить их в емкость с дезраствором на 60 минут (3 % раствор хлорамина или 6 % раствор перекиси водорода с 0,06 % НГК) или кипятить в дистиллированной воде 30 минут.

5.5. Поверхности рабочих столов обработать в конце рабочего дня дезинфицирующими средствами, обладающими вирулоцидным действием.

2. Техника взятия крови

2.1. Техника взятия крови у крыс

У крыс небольшое количество крови можно взять из ушных раковин. Для этого помощник левой рукой фиксирует крысу, крепко зажимая конечности, а большим и указательным пальцами натягивает кожу шеи, сдавливая сосуды этой области, создавая застой крови и гиперемия ушных раковин.

При уколе в кровеносный сосуд уха необходимо, с противоположной стороны, поддерживать ухо пальцем с целью создания твердой основы. Между пальцем и ухом должен быть положен небольшой ватный шарик, чтобы избежать ранения пальца. Из ушных раковин возможны повторные заборы крови через 3–5 суток.

Содержание эритроцитов, лейкоцитов и лейкоцитарная формула при повторных взятиях крови из ушной раковины крыс остается без изменений, в то время как при повторных взятиях крови после ампутации кончика хвоста из-за возникающей воспалительной реакции количество лейкоцитов увеличивается.

Для получения больших количеств крови у взрослых крыс прибегают к пункции хвостовой вены.

Пункция хвостовой вены. Хвост обогревают тепловой водой, дезинфицируют; вену сдавливают у корня хвоста, вводят в сосуд иглу и шприцем отсасывают кровь. Нередко для взятия крови обрезают кончик хвоста, после чего собирают кровь, вытекающую из раны. Из кончика хвоста удается получить значительное количество крови, вакуумно отсасывая ее. Однако для того, чтобы взять кровь из вен хвоста, не обязательно отрезать его кончик. Для этого достаточно острой

бритвой сделать надрез кончика хвоста наискось по спирали. Такая рана менее травматична, она быстро заживает.

Пункция сердца. У наркотизированного животного выстригают шерсть в области предполагаемого укола и дезинфицируют кожу. Пальпаторно определяют место конечного толчка сердца. На 1 см краниальнее от установленной точки, отступив на 1–2 мм от левого края грудины, делают укол, держа иглу вертикально. Пункцией сердца у крупных крыс удастся получить до 6–8 мл крови. При пункции сердца лучше пользоваться вакуумным методом отсасывания крови. Пункцию производят не чаще одного раза в неделю. После взятия крови подкожно вводят 0,9 % раствор хлорида натрия.

2.2. Техника взятия крови из пальца у человека

Одним из самых распространенных биологических материалов для лабораторных исследований является кровь. Для изучения применяется цельная кровь, плазма, сыворотка или клетки крови.

Взятие крови проводят в резиновых перчатках, соблюдая правила асептики. Перчатки необходимо обрабатывать 70 % спиртом либо антисептиком перед каждым взятием крови.

Кровь рекомендуется брать из безымянного, среднего или указательного пальцев. Дело в том, что прокол (повреждение целостности кожи) чреват инфицированием. Внутренние оболочки большого пальца и мизинца напрямую соединены с оболочками кисти – если инфекция попадает в них, она может быстро распространиться на всю руку. А оболочки остальных пальцев изолированы, и, даже если в момент прокола в них попадет инфекция, она какое-то время будет локализована, что даст возможность её быстро подавить. У безымянного пальца есть дополнительные преимущества – он

самый «нерабочий». Поэтому кожа на нём тоньше (а значит, прокол безболезненнее). Поскольку палец меньше двигается, ранка на нём заживает быстрее, что также снижает возможность инфицирования.

В момент взятия крови из пальца пациент должен сидеть или лежать. Палец массируют для стимуляции притока крови. Кожу пальца перед проколом протирают стерильным тампоном (шариком из ваты), смоченным 70 % спиртом, или стерильной спиртовой салфеткой.

Фиксируют пальцами левой руки концевую фалангу IV пальца пациента и слегка надавливая кожу. Затем прокалывают кожу с помощью индивидуального автоматического стерильного ланцета. Для этого поворачивают защитный колпачок ланцета и снимают его. Прикладывают ланцет к месту прокола.

Для того чтобы найти нужную точку для прокола, мысленно делят подушечку пальца на 4 части. Рекомендуется прикладывать ланцет в верхней правой или левой части. Не стоит делать прокол слишком близко к ногтю, так как кровь будет затекать под ноготь. Кроме того, стараются приложить ланцет к подушечке плотнее, так удастся сделать достаточно глубокий прокол. В противном случае, кровь из прокола будет плохо идти, и придется сильно давить на палец, что весьма болезненно, а также может привести к гемолизу части эритроцитов и получению гемолизированной плазмы, которую не рекомендуется использовать для некоторых видов анализа.

Держат ланцет между указательным и средним пальцами. Используя большой палец, нажимают на кнопку до упора. Не нажимают на кнопку до того, как приложили ланцет к месту прокола! Первую каплю крови удаляют, так как она

содержит большое количество тканевой жидкости. На рис. 1 представлена техника взятия крови из пальца.

После взятия крови к раневой поверхности прикладывают новый стерильный тампон, смоченный 70 % спиртом. Перчатки вновь обрабатывают 70 % спиртом. Использованные ватки и скарификаторы утилизируют в специально подготовленную для этих целей емкость.



Краткая инструкция*

Поверните защитный колпачок и снимите его.



Приложите ланцет к месту прокола. Держите ланцет между указательным и средним пальцем.



Используя большой палец нажмите на кнопку до упора.

* Приведено в качестве примера. Перед проведением теста внимательно прочитайте полную инструкцию.

Рис. 1. Техника взятия крови из пальца для исследования

3. Подготовка к исследованию

3.1. Выбор и подготовка биоматериала к исследованию

Выбор материала (цельная кровь, плазма, сыворотка или клетки крови) зависит от целей исследования и определяемого показателя. Следует учитывать различия в содержании определяемого вещества в капиллярной и венозной крови (табл. 1).

Возможны различия в содержании метаболитов в клетках крови и жидкой ее части:

- например, мочевины и глюкозы равномерно распределены между плазмой и эритроцитами, поэтому эти показатели можно определять как в цельной крови, так и в сыворотке (плазме);

- для большинства исследований нужно использовать сыворотку или плазму (для определения неравномерно распределенных микроэлементов и билирубина), при этом нужно учитывать, что в процессе свертывания крови и стоянии сыворотки над сгустком происходит разрушение форменных элементов. Это искажает результаты исследования как за счет увеличения жидкой части пробы, так и из-за выхода некоторых веществ;

- необходимо также учитывать, что плазма крови более богата белками, а в сыворотке крови отсутствуют белки свертывающей системы, участвующие в образовании фибринового сгустка;

- в некоторых случаях рекомендуется использовать плазму крови. К примеру, ионы калия и ряд ферментов (кислая фосфатаза, аргиназа, ферменты гликолиза, аминотрансферазы) в значительном количестве содержатся в тромбоцитах и эритроцитах и освобождаются из них в процессе свертывания.

**Сравнительная концентрация некоторых метаболитов
в капиллярной и венозной крови**

Определяемое вещество	Содержание в капиллярной крови	Содержание в венозной крови
глюкоза	выше	ниже
лактат, пируват	ниже	выше
холестерин, кальций, натрий, калий, хлор, фосфаты, мочевины, общий белок, альбумин	одинаковое	

Для исследования цельной крови и плазмы необходимо предотвратить свертывание крови. Для этого к крови прибавляют антикоагулянты (табл. 2).

К таким веществам относятся:

1. Нейтральные соли — серноокислый магний и серноокислый натрий. Свертывание крови нейтральными солями предотвращают следующим образом: в сосуд для сбора крови любого животного предварительно наливают четверть объема 25 %-го раствора серноокислого магния или половину объема полунасыщенного раствора сернистого натрия. Получаемая при этом плазма может сохраняться жидкой неограниченное время. В качестве веществ, предохраняющих кровь от свертывания, с успехом можно применять смесь солей по следующей прописи: – оксалат аммония (щавелевокислый аммоний) – 3 г, оксалат калия (щавелевокислый калий) – 2 г, вода дистиллированная – 250 мл. Раствор наливается в пробирки, куда будут брать кровь, из расчета 1 мл на 5 мл крови и выпаривают в сушильном шкафу при температуре 100 °С.

2. Вещества, способствующие удалению из крови извести, – лимоннокислый натрий (цитрат натрия; концентрация раствора не должна превышать 0,3 %), щавелевокислый натрий (оксалат натрия; концентрация раствора не более 0,2 %), фтористый натрий (концентрация раствора не более 0,1 %). Большие концентрации растворов вызывают в крови различные изменения, до гемолиза включительно. В пробирку с отметкой 10 мл наливают 0,3–0,5 мл какого-либо из указанных консервантов, а затем пробирку наполняют кровью до метки. После этого закрывают пробирку пробкой и 15–20 раз переворачивают (аккуратно!) для лучшего смешивания крови с противосвертывающим веществом. То же делают и при применении сухих противосвертывающих веществ.

3. Вещества животного происхождения – пептон, гирудин, гепарин. Средства животного происхождения предотвращают свертывание крови при разных способах применения. Пептон предотвращает свертывание крови только при внутривенном впрыскивании раствора его из расчета 0,3 г на 1 кг веса животного. Прибавление пептона к выпущенной крови безрезультатно. Гирудин, гепарин и другие аналогичные вещества предотвращают свертывание крови как при введении в кровяное русло, так и при добавке к крови в виде растворов. Используют 1 %-ный водный раствор гепарина. Его помещают в пробирку, в которую будут брать кровь, из расчета одна капля на 5 мл крови. Затем жидкость испаряют в сушильном шкафу при температуре 80–100 °С.

4. Трилон Б (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (комплексон-III, трилон Б, хелатон III, ЭДТА) – образует очень устойчивые комплексные соединения с большинством катионов. Для защиты от микроорганизмов можно использовать антибиотики и тимол, который прибавляют из расчета 3 мг на 10 мл крови. Можно с этой целью использовать

также хлорбензол. Для одновременной стабилизации и консервации рекомендуется следующая смесь: в ступке растирают 10 частей фтористого натрия, 1 часть тимола, 3 части оксалата калия; 50 мг этой смеси прибавляют на 15 мл крови.

В предохраненной от свертывания крови происходит ряд изменений, отражающихся на результатах исследований: разложение глюкозы с образованием молочной кислоты (гликолиз), изменение количества сахара и молочной кислоты, изменение реакции и напряжения CO_2 , разложение азотистых соединений, гидролиз органических фосфатов клеток, изменение оболочки эритроцитов, ведущее к нарушению распределения неорганических соединений, и т. д. Поэтому кровь, в которую добавлены противосвертывающие вещества, необходимо по возможности исследовать в более короткие сроки после взятия. Отделение плазмы от эритроцитов необходимо производить в течение первого же часа, в противном случае процессы, протекающие в крови, искажают картину исследования.

Таблица 2

Антикоагулянты, используемые для получения плазмы, и рекомендации к их применению

Антикоагулянт	Соотношение кровь / антикоагулянт	Не рекомендуется для определения
Оксалат натрия, 1,5 %	1 часть раствора на 20 частей крови	Кальций, рН, ферменты, электролиты
Цитрат натрия, 3,8 %	1 часть раствора на 9 частей крови	Кальций, рН, ферменты, электролиты
Этилендиаминтетраацетат натрия, 1,5 %	1 часть раствора на 20 частей крови	Кальций, рН, ферменты, электролиты
Гепарин 3,0% (гепаринат Na, K или Li) или 1000 ЕД/мл	1 часть раствора на 20 частей крови или 50 ЕД гепарина на 1,0 мл крови	Электролиты, щелочная фосфатаза, аммиак

Цитратно-глюкозная смесь, содержащая 24 мМ лимонной кислоты, 62 мМ Na ₃ - лимоннокислого, 39 мМ глюкозы	1 часть раствора на 4 части крови	Электролиты
--	-----------------------------------	-------------

3.2. Выделение плазмы и сыворотки из цельной крови, получение эритроцитов

В пробирку с антикоагулянтом набирают кровь, немедленно перемешивают (без пузырьков), выдерживают при комнатной температуре или лучше в ледяной бане в течение 20–30 мин и затем центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. При определении активности ферментов центрифугирование проводят при 4–6 °С в рефрижераторных центрифугах. Верхний слой (плазму) отбирают дозаторной пипеткой в чистую пробирку Эппендорфа. После этого можно приступать к определению биохимических показателей в плазме крови. Оставшуюся плазму необходимо заморозить.

Для получения сыворотки кровь оставляют при комнатной температуре на 15 мин, затем тонкой стеклянной палочкой (или пастеровской пипеткой) аккуратно, не разрушая клетки, отделяют сгусток от стенок пробирки и центрифугируют 10–15 мин при 3000 об/мин. Сразу после центрифугирования отделяют сыворотку от сгустка.

Гемолизированную сыворотку и плазму для анализа не рекомендуется использовать, т. к.:

- в нее поступают метаболиты из разрушенных клеток, которые могут вступить в реакцию с определяемым веществом или компонентами рабочего реактива;
- гемоглобин искажает результаты фотометрии (в этом случае необходимо делать контроль на окраску плазмы);

- гемоглобин может взаимодействовать с исследуемыми веществами и влиять на активность ферментов.

Для проведения исследований на эритроцитах их предварительно промывают трехкратно холодным физиологическим раствором и, при необходимости, замораживают, предварительно разлив их по пробиркам Эппендорфа.

При необходимости исследовать показатели метаболизма клеток крови также используют антикоагулянты при получении крови во избежание разрушения клеток и получения ложных результатов.

Желательно проводить исследования в свежем материале, но если необходимо хранение, то хранить при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (замораживать можно только однократно, поэтому лучше предварительно разлить плазму на порции – аликвоты).

3.3. Приготовление основных растворов

1. Физиологический раствор (NaCl 0,9 %; 0,73 %) для промывки эритроцитов.

2. Растворы для методики определения МДА в эритроцитах.

3. Раствор ТБК: растворить навеску 8 грамм ТБК (тиобарбитуровой кислоты) в 1 литре дистиллированной воде в термостойкой литровой колбе с градуированным мениском, подогревая на плитке до полного растворения.

4. Раствор ТХУ: растворить навеску 170 грамм ТХУ (трихлуксусной кислоты) в 1 литре дистиллированной воды.

5. Растворы для определения фракций липидов в плазме крови и в мембранах эритроцитов:

- медный купорос обезвоживается в термостате в ступке при $85\text{--}100\text{ }^{\circ}\text{C}$, периодически перемешивается до появления белого, беловато-голубого оттенка;

- абсолютный спирт: к прокаленной навеске медного купороса добавляется 96 % этиловый спирт в соотношении: 1 часть меди, 4–5 части спирта;
- смесь Фолча: 1 мл абсолютного спирта и 2 мл хлороформа (трихлорметан);
- проявитель фракций липидов: 73 мл гексан + 25 мл диэтиловый эфир + 2 мл ледяная уксусная кислота.

4. Правила работы с приборами

4.1. Правила работы на фотоэлектроколориметре КФК-2

Колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2 предназначен для измерения коэффициентов пропускания T и оптической плотности растворов A жидкостей и твердых тел, а также определения концентрации веществ (окрашенных растворов, рассеивающих взвесей, эмульсий и коллоидных растворов) в растворах методом построения градуировочных графиков в отдельных участках диапазона длин волн от 315 по 980 нм, выделяемых светофильтрами. Пределы измерения пропускания 100–5 % ($A = 0 \div 1,3$). Основная абсолютная погрешность измерения пропускания 1 %. Среднее квадратическое отклонение определения пропускания по результатам 10 измерений не превышает $S_f = 0,3 \%$ (0,003).

Колориметр позволяет также производить измерения коэффициентов пропускания рассеивающих взвесей, эмульсий и коллоидных растворов в проходящем светофильтре.

Упрощенная оптическая схема устройства фотоколориметра приведена на рис. 2.

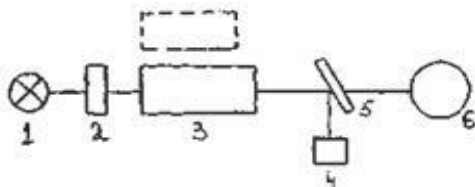


Рис. 2. Оптическая схема прибора:

1 – источник света; 2 – светофильтр; 3 – кювета с исследуемым раствором или раствором сравнения; 4 – фотодиод (при измерениях в области 590-980); 5 – пластина, которая делит световой поток на 2 потока; 6 – фотоэлемент (при измерениях в области спектра 315–540 нм)

Принцип определения коэффициента пропускания при помощи этого колориметра основан на определении отношении световых потоков, прошедших через исследуемый раствор и растворитель.

Порядок выполнения работы

1. Открыть крышку 7 (рис. 3) кюветного отделения (при этом шторка перекрывает световой пучок перед фотоприёмниками). Включить колориметр в сеть (прогреть 15 мин).

2. Установить необходимый по роду измерений цветной светофильтр.

3. Установить минимальную чувствительность колориметра. Для этого ручки «Чувствительность» 5 (рис. 3) установить в положение «I» (цвет этой цифры должен совпадать с цветом цифры выбранного светофильтра), ручку «Установка 100 грубо» – в крайнее левое положение.

4. Проверить установку стрелки колориметра на «O», по шкале коэффициентов пропускания T при открытом кюветном отделении.

5. На пути светового пучка поместить кювету с холостой пробой, по отношению к которому производится измерения. В соседнее гнездо поместить исследуемый раствор.

6. Закрыть крышку кюветного отделения.

7. Ручками «Чувствительность» и «Установка 100 грубо» и точно установить шкале колориметра на «0». Ручка «Чувствительность» может находиться в одном из трех положений: «I», «2» или «3».

8. Поворотом ручки 4 до упора на световой пучок поставить кювету с исследуемым раствором и по показанию прибора I (рис. 3) записать его оптическую плотность.

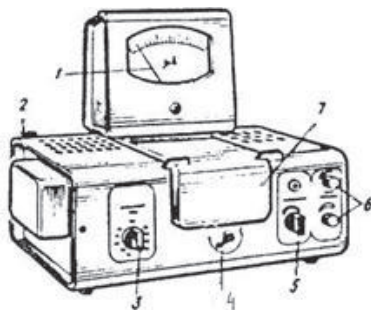


Рис. 3. Внешний вид колориметра КФК-2:

- 1 – шкала регистрирующего прибора; 2 – кнопка включения прибора в сеть; 3 – ручка переключения светофильтров;
 4 – ручка перемещения кювет; 5 – ручка включения фотоприемников; 6 – ручки установки 100 %-го светопропускания;
 7 – крышка кюветного отделения

4.2. Правила работы с фотоколориметром КФК-2МП

Колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2МП предназначен для измерения диапазона длин волн 315–980 нм, выделяемых светофильтрами, коэффициентов пропускания и оптической плотности жидкостных растворов и твердых тел, а также для определения концентрации веществ в растворах и скорости изменения оптической плотности вещества.

Измерения производятся по 11 точкам спектра от 315 до 980 нм, результаты измерения обрабатываются микро-ЭВМ и выводятся на световое табло.



Рис. 4. Внешний вид КФК-2МП

Порядок выполнения работы

1. Открыть крышку кюветного отделения.
2. Включить прибор в сеть. Включить на задней панели слева тумблер «**вкл/выкл**». Горит индикаторная лампа. Прибор прогреть 10 мин.
3. Нажать красную клавишу «**пуск**».
4. Установить светофильтр (длина волны) в левом нижнем переключателе.
5. Установить фотоприемник (фотоэлемент).

Правило соответствия:

Индикация переключателя светофильтра		Индикация переключателя фотоприемника
черная	→	черная
красная	→	красная

6. Нажать клавишу **Ш(0)** на табло. Темновой ток в пределах 0,001–1,00. Использовать клавиши с цифрами для ввода значений.
7. Закрыть крышку кюветного отделения.
8. Нажать клавишу **К(1)** на табло. Значение экстинкции: $E_k=0$.
9. Открыть крышку и ввести в световой поток кювету с исследуемым раствором (в ближнюю каретку).
10. Ввести в световой поток кювету со стандартным раствором (в дальнюю каретку).
11. Закрыть крышку, нажать клавишу **К(1)**. На цифровом табло слева от мигающей запятой загорается символ «1».
12. Ввод в световой поток одной или другой кюветы осуществляется поворотом ручки, находящейся под крышкой, до упора влево или вправо (до положения 1 или 2).
 - в положении «1» в световой поток вводится кювета со стандартным раствором;

- в положении «2» – кювета с исследуемым раствором.

13. Нажать клавишу Д(5). На цифровом табло слева от мигающей запятой появляется символ «5», означающий, что произошло измерение оптической плотности. Повторить 3 раза.

4.3. Правила работы на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ

Спектрофотометр ПЭ-5400УФ предназначен для измерения коэффициента пропускания и оптической плотности жидкостей (в том числе биологических) с целью определения концентрации растворенных в них компонентов, а также для измерения коэффициента пропускания и оптической плотности твердых и жидких проб различного происхождения. Область применения спектрофотометров – эколого-аналитические и санитарно-эпидемиологические лаборатории медицинских учреждений, а также химические, оптические, биологические лаборатории промышленных предприятий, научно-исследовательских и учебных институтов.

Принцип действия фотометра основан на сравнении светового потока Φ_0 , прошедшего через раствор сравнения (контрольный раствор, по отношению к которому производится измерение) и светового потока Φ , прошедшего через исследуемую среду. Световые потоки Φ_0 и Φ преобразуются фотоприемником в электрические сигналы I_0 и I . Также измеряется I_t – сигнал от неосвещенного приемника. По величинам этих сигналов микропроцессором спектрофотометра рассчитывается и отображается на дисплее результат измерения в виде коэффициента пропускания, оптической плотности или концентрации в зависимости от выбранного режима измерения.



Рис. 5. Внешний вид спектрофотометра ПЭ-5400 УФ:
 1 – ручка перемещения кювет; 2 – крышка кюветного отделения;
 3 – панель управления

Порядок выполнения работы

1. Открыть крышку прибора и убедиться, что внутри ничего не установлено.
2. Закрыть крышку.
3. Включить спектрофотометр с помощью сетевого выключателя (сзади).
4. Раздастся звуковой сигнал и на дисплее будет отображаться ход диагностики (50 секунд).
5. На дисплее появится надпись «Прогрев». В момент прогрева длительностью 20 минут НИЧЕГО НЕ НАЖИМАТЬ И НЕ ОТКРЫВАТЬ КРЫШКУ!
6. При переходе в режим измерения происходит автоматическая калибровка нуля (0.000).
7. В рабочую зону поместить кювету с раствором сравнения и закрыть крышку.
8. Для установки рабочей длины волны нажать кнопку «ПЕРЕХОД».
9. Установка значения производится прокруткой при помощи кнопок.
10. Для установки значения нажать ВВОД/СТАРТ.

11. В оставшиеся кюветки поместить исследуемые образцы и закрыть крышку.

12. На дисплее отразится значение оптической плотности раствора.

Внимание!

Все измерения проводить с ЗАКРЫТОЙ крышкой кюветного отделения.

При работе в УФ области используйте КВАРЦЕВЫЕ кюветы.

Жидкость в кюветы наливать на 3/4 высоты.

Перед измерением все рабочие поверхности кюветы должны быть чистыми!

Функции кнопок управления:

РЕЖИМ – выбор режима работы;

МЕНЮ – вызов меню вспомогательных функций;

ПЕРЕХОД – вызов процедуры установки длины волны;

НОЛЬ – калибровка нуля (установка 0.000, A/100,0 %T);

ПЕЧАТЬ/УДАЛИТЬ – посылка текущих значений в ПК;

ВВОД/СТАНДАРТ – подтверждение выбора/запись в память результатов измерений;

ОТМЕНА/СТОП – отмена выбора/прекращение записи; увеличить (уменьшить)/выбор значения, функции.

Режим работы:

A – измерение оптической плотности;

T – измерение пропускания %;

C – определение концентрации;

F – ввод коэффициентов расчетного уравнения.

5. Лабораторные работы

5.1. Определение концентрации глюкозы в сыворотке (плазме) крови энзиматическим колориметрическим методом

Принцип метода: при окислении β -D-глюкозы кислородом воздуха под действием глюкозооксидазы (GOD) образуется эквимольное количество перекиси водорода. Под действием пероксидазы (POD) перекись водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации глюкозы в пробе.

Оборудование: термостат, фотоэлектроколориметр (ФЭК) и кюветы на 1 см или 0,5 см, пипетки полуавтоматические и наконечники, пробирки, стаканчики объемом 250 мл (2 шт.), фильтровальная бумага.

Реагенты: для анализа используются наборы реагентов фирмы «Витал Девелопмент корпорэйшн».

Проведение анализа

Длина волны: 505 нм (ФЭК – 490 нм).

Длина оптического пути: 1 см (0,5 см).

Температура инкубации: 18–25 °С (37 °С).

Фотометрирование: против холостой пробы.

Внести в пробирки:

	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Образец (плазма)	<i>0,01 мл</i>		
Монореагент	<i>2,0 мл</i>	<i>2,0 мл</i>	<i>2,0 мл</i>
Калибратор		<i>0,01 мл</i>	

Пробы тщательно перемешать, инкубировать 10 мин при 37 °С или 15 мин при 18–25 °С. Фотометрировать. Стабильность окраски – не менее 1 часа при предохранении от прямого солнечного света.

Расчеты

Расчет концентрации глюкозы (С):

$$C = A_{оп}/A_{кал} \times 10 \text{ [ммоль/л]},$$

где

$A_{оп}$ – адсорбция опытной пробы;

$A_{кал}$ – адсорбция калибровочной пробы;

10 ммоль/л – концентрация глюкозы в калибраторе.

Нормальные величины

Сыворотка (плазма): 4,2–6,1 ммоль/л.

5.2. Определение концентрации пировиноградной кислоты в крови

Принцип метода. Метод является модификацией метода Умбрайта и отличается тем, что пировиноградная кислота определяется непосредственно в центрифугате крови, после осаждения белков. Пировиноградная кислота с 2,4-динитрофенилгидразином образует гидразон, который со щелочью дает соединение коричнево-красного цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию пировиноградной кислоты и определяется фотометрически. Гидразоны α -кетоглутаровой, щавелевоуксусной, дегидроаскорбиновой кислот в щелочной среде нестойки и быстро разлагаются.

Оборудование: спектрофотометр, центрифуга, весы аналитические по ГОСТ 24104-2001, секундомер, химические пробирки тонкостенные на 10 мл для центрифуги, штативы

для пробирок, мерные колбы на 1000, 50 мл, пипетки на 10 мл, 1000, 100 мкл и наконечники к ним.

Материал для исследования: цельная кровь.

Реагенты:

1. 10 % раствор трихлоруксусной кислоты. 100 г ТХУ растворяют в 1000 мл дистиллированной воды.

2. 0,1 % раствор 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ). 50 мг реактива растворяют в 10 мл концентрированной соляной кислоты при слабом подогревании. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 50 мл.

3. 2 % раствор едкого натра. 120 г NaOH растворяют в 1000 мл дистиллированной воды.

4. Пировинограднокислый натрий (пируват натрия).

Проведение анализа

Длина волны: 450 нм.

Длина оптического пути: 0,5 см.

Температура инкубации комнатная: 18–25 °С.

Фотометрирование: против холостой пробы.

1. Берут 0,3 мл крови и смешивают в центрифужной пробирке с 0,7 мл дистиллированной воды.

2. К гемолизату приливают 1 мл 10 % раствора ТХУ (реактив 1), перемешивают стеклянной палочкой и через 2–3 мин центрифугируют при 1500 оборотов в течении 15 мин.

3. Надосадочную жидкость полностью сливают в пробирку (оптимизация для лучшей воспроизводимости: количество – отобрать 1,5 мл), приливают 0,4 мл 0,1 % раствора ДНФГ (реактив 2), смешивают и на 20 мин помещают в темное место при комнатной температуре.

4. К содержимому пробирки приливают 1 мл 12 % раствора едкого натра (реактив 3) и через 5 мин определяют оптическую плотность.

5. В качестве раствора сравнения (холостая проба) берут пробу, которую готовят подобным же образом, только вместо крови добавляют 0,3 мл дистиллированной воды.

Количество пирувиноградной кислоты в исследуемой пробе рассчитывают по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой

Готовят стандартный раствор пирувата натрия из расчета:

- 11 мг пирувата растворяют в 100 мл дистиллированной воды;
- в ряд из 6 пробирок вносят 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 и 0,3 мл стандартного раствора;
- добавляют 0,25; 0,2; 0,15; 0,1; 0,05 и 0 мл дистиллированной воды соответственно;
- в каждую пробирку добавляют 0,7 мл дистиллированной воды;
- проводят анализ растворов аналогично пробе крови.

Результаты выражают в мг пирувата натрия (по калибровочной кривой). Для перевода в единицы системы СИ (мкмоль/л) необходимый полученный результат умножить на 114.

Нормальные величины

В крови здорового человека содержание пирувата составляет 45,6–114 мкмоль/л.

5.3. Определение концентрации молочной кислоты (лактата) в плазме крови энзиматическим колориметрическим методом

Принцип метода

1. молочная кислота + O_2 —лактат оксидаза→ пируват + H_2O_2

2. H_2O_2 + ААП* + п-хлорфенол —пероксидаза→ (хинониновый окрашенный продукт) + H_2O

Оборудование: термостат, фотоэлектроколориметр (ФЭК) и кюветы на 1 см или 0,5 см, пипетки полуавтоматические и наконечники, пробирки, стаканчики объемом 250 мл (2 шт.), фильтровальная бумага.

Реагенты: для анализа используются наборы реагентов фирмы «Витал Девелопмент корпорэйшн».

Проведение анализа

Длина волны: 578 (540–590) нм.

Длина оптического пути: 1 см (0,5 см).

Температура инкубации: комнатная (18–25 °С) или 37 °С.

Фотометрирование: против холостой пробы.

Внести в пробирки:

	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Реагент № 1	<i>0,8 мл</i>	<i>0,8 мл</i>	<i>0,8 мл</i>
Реагент № 2	<i>0,2 мл</i>	<i>0,2 мл</i>	<i>0,2 мл</i>
Образец (плазма)	<i>0,01 мл</i>	-	-
Калибратор	-	<i>0,01 мл</i>	-
Дист. вода	-	-	<i>0,01 мл</i>

Пробы тщательно перемешать и инкубировать 10 мин. при 18–25 °С или 5 мин. при 37 °С. Измерить оптическую

плотность опытной ($A_{оп}$) и калибровочной ($A_{кал}$) проб против холостой пробы. Окраска стабильна не менее 45 минут после окончания инкубации.

Расчеты

Расчет концентрации молочной кислоты (С):

$$C = A_{оп}/A_{кал} \times 2,0 \text{ [ммоль/л]},$$

где

$A_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотн.;

$A_{кал}$ – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотн.;

2,0 ммоль/л – концентрация молочной кислоты в калибраторе.

Нормальные величины

Венозная кровь: 0,5–2,2 ммоль/л.

Артериальная кровь: 0,5–1,6 ммоль/л.

5.4. Определение концентрации общего белка в сыворотке (плазме) крови биуретовым методом

Принцип метода: белок образует окрашенный комплекс с ионами меди в щелочной среде.

Оборудование: термостат, фотоэлектроколориметр (ФЭК) и кюветы на 1 см или 0,5 см, пипетки полуавтоматические и наконечники, пробирки, стаканчики объемом 250 мл (2 шт.), фильтровальная бумага.

Реагенты: для анализа используются наборы реагентов фирмы «Витал Девелопмент корпорэйшн».

Приготовление рабочего реагента. Содержимое флакона №1 (или аликвоту) развести бидистиллированной водой в 5 раз (например, 10 мл реагента №1 + 40 мл бидистиллированной воды).

Рабочий реагент стабилен 6 месяцев при температуре хранения 18–25 °С. Хранить в плотно закрытой посуде в темноте.

Проведение анализа

Длина волны: 540 (520–560) нм.

Длина оптического пути: 1 см (0,5 см).

Температура инкубации: комнатная (18-25 °С) или 37 °С.

Фотометрирование: против холостой пробы.

Внести в пробирки:

	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Рабочий реагент	<i>2,5 мл</i>	<i>2,5 мл</i>	<i>2,5 мл</i>
Образец (плазма)	<i>0,05 мл</i>		
Калибратор		<i>0,05 мл</i>	
Дист. вода			<i>0,05 мл</i>

Пробы перемешать и инкубировать 30 мин при 18–25 °С. Фотометрировать. Стабильность окраски – не менее 30 мин.

Расчеты

Расчет концентрации общего белка (С):

$$C = A_{оп}/A_{кал} \times 70 \text{ [г/л]},$$

где

$A_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

$A_{кал}$ – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

70 г/л – концентрация общего белка в калибраторе.

Нормальные величины

65–85 г/л.

5.5. Определение концентрации альбумина в сыворотке (плазме) крови унифицированным колориметрическим методом

Принцип метода. Альбумин образует окрашенный комплекс с бромкрезоловым зеленым (БКЗ) в слабокислой среде в присутствии детергента.

Оборудование: термостат, фотоэлектроколориметр (ФЭК) и кюветы на 1 см или 0,5 см, пипетки полуавтоматические и наконечники, пробирки, стаканчики объемом 250 мл (2 шт.), фильтровальная бумага.

Реагенты

Для анализа используются наборы реагентов фирмы «Витал Девелопмент корпорэйшн».

Проведение анализа

Длина волны: 628 нм (ФЭК – 590 нм).

Длина оптического пути: 1 см (0,5 см).

Температура инкубации: 18–25 °С (37 °С).

Фотометрирование: против холостой пробы.

Внести в пробирки:

	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Рабочий реагент	<i>2 мл</i>	<i>2 мл</i>	<i>2 мл</i>
Образец (плазма)	<i>0,01 мл</i>		
Калибратор		<i>0,01 мл</i>	
Дист. вода			<i>0,01 мл</i>

В опытную пробу вносят 2 мл реагента (бромкрезолового зеленого) и 0,01 мл измеряемого образца плазмы. В калибровочной пробе содержится 2 мл реагента и 0,01 мл калибратора.

Холостая проба – 2 мл реагента и 0,01 мл дистиллированной воды. Содержимое пробирок перемешивают и через 5 минут фотометрируют против холостой пробы при длине волны 590 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см (0,5 см). Окраска стабильна в течение 8 часов.

Расчет концентрации альбумина:

$$C = \frac{A_{оп}}{A_{кал}} * 60,$$

где $A_{оп}$, $A_{хол}$ – оптические плотности опытной и калибровочной проб, соответственно;

60 – концентрация альбумина в калибраторе.

Нормальные величины

Норма содержания альбумина в плазме – 35–50 г/л.

5.6. Определение концентрации мочевины в плазме крови колориметрическим методом

Принцип метода: в кислой среде в присутствии тиосемикарбазида и ионов трехвалентного железа мочевины образует с диацетилмонооксимом комплексное соединение красного цвета, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации мочевины в анализируемом образце и измеряется фотометрически при длине волны 510 (490–540) нм.

Оборудование и реагенты:

- Спектрофотометр, длина волны 510 нм, или фотоэлектроколориметр, длина волны 490-540 нм (зеленый светофильтр), кювета с толщиной поглощающего свет слоя 10 или 5 мм;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,01; 0,05; 0,5 и 2,0 мл;
- колбы мерные вместимостью 100, 200 и 500 мл;
- пробирки центрифужные вместимостью 10 мл;

- стаканчики вместимостью 250 мл;
- баня водяная, обеспечивающая температуру $+100 \pm 1$ °С;
- центрифуга лабораторная на 3000 об/мин;
- секундомер;
- сухая реакционная смесь (диацетилмонооксим – 0,101 г; тиосемикарбазид – 0,015 г);
- раствор соли железа трехвалентного (железо треххлористое – 5,0 ммоль/л);
- калибровочный раствор мочевины (мочевина – 8,0 ммоль/л, бензойная кислота – 1,8 г/л);
- кислота серная концентрированная (98), хч;
- кислота трихлоруксусная, ч;
- перчатки резиновые;
- вода дистиллированная.

Подготовка реагентов для анализа:

Раствор реакционной смеси. В мерную колбу вместимостью 100 мл количественно перенести содержимое одной пробирки с сухой реакционной смесью и растворить его примерно в 60 мл дистиллированной воды при нагревании до температуры $+40$ – 50 °С. После охлаждения добавить 1,0 мл раствора соли железа трехвалентного (железо треххлористое – 5,0 ммоль/л) и довести дистиллированной водой до метки.

Полученный раствор можно хранить при комнатной температуре ($+18$ – 25 °С) не более 2-х недель. Наличие небольшого нерастворимого осадка не мешает определению.

Раствор серной кислоты, 1,8 ммоль/л. В мерную колбу вместимостью 500 мл внести около 300 мл дистиллированной воды и при постоянном помешивании добавить 50 мл серной кислоты; после охлаждения довести дистиллированной водой до метки.

Полученный раствор можно хранить при комнатной температуре не более 1 года.

Рабочий раствор. Готовят смешивание одной части раствора реакционной смеси с одной частью раствора серной кислоты.

Следует ежедневно готовить свежий рабочий раствор, хранению не подлежит.

Калибровочный раствор мочевины готов к применению.

Проведение анализа:

Отмерить	Опытная проба, мл	Калибровочная проба, мл	Контрольная (холостая) проба, мл
Сыворотка (плазма) крови	<i>0,01</i>		
Калибровочный раствор мочевины		<i>0,01</i>	
Рабочий раствор	<i>2,00</i>	<i>2,00</i>	<i>2,00</i>

Содержимое пробирок тщательно перемешать, пробирки закрыть колпачками из алюминиевой фольги и поместить точно на **10 минут** в кипящую водяную баню. Затем пробирки быстро охладить в потоке холодной воды и измерить величину оптической плотности калибровочной и опытной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны **510 (490–540) нм** в кювете с толщиной поглощающего свет слоя **10 или 5 мм**. Окраска устойчива в течение **15 минут** после охлаждения проб.

Расчеты:

Концентрацию мочевины в плазме крови рассчитать по формуле:

$$C = E_{\text{опт}} / E_{\text{кал}} \times 8,0 ,$$

где

C – концентрация мочевины в опытной пробе, ммоль/л;

$E_{\text{опт}}$ – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

$E_{\text{кал}}$ – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

8,0 – концентрация мочевины в калибровочном растворе, ммоль/л.

Нормальные величины

2,5 – 8,3 ммоль/л.

5.7. Определение свободного аминного азота в сыворотке крови

Принцип метода. Содержание аминокислот определяют колориметрически по интенсивности окрашивания комплекса, образующегося за счет взаимодействия аминокислот с нингидриновым реактивом.

Реактивы:

1) 0,04 н р-р уксусной к-ты (0,23 мл ледяной уксусной к-ты на 100 мл воды);

2) водный р-р нингидрина (1 г / 100 мл);

3) стандартный р-р аланина (12,86 мг аланина в 100 мл воды, готовят перед применением).

Ход работы

1) ***Осаждение белков.*** Центрифужную пробирку с внесенными в неё 0,5 мл сыворотки и 0,5 мл р-ра уксусной к-ты прикрывают пробкой и помещают в холодную водяную баню,

воду которой доводят до кипения. Для **стандартной пробы** используют 0,5 мл приготовленного стандартного р-ра аланина и обрабатывают точно так же, как и опытную пробу. Пробы прогревают в течение 5 мин (время отмечают с момента закипания воды). Пробирки охлаждают и приступают к фильтрованию смеси.

2) Фильтрование. К содержимому пробирок добавляют по 1 мл дист. воды и после перемешивания растворов тонкой стеклянной палочкой производят фильтрование через гладкий бумажный фильтр. Пробирку и осадок на фильтре промывают ещё 2 раза, каждый раз используя для этого по 1 мл воды, после чего основной фильтрат и обе порции промывных вод объединяют в одну пробирку с меткой, соответствующей 10 мл.

3) Цветная реакция с нингидрином. К полученному фильтрату добавляют 0,5 мл р-ра нингидрина, содержимое пробирок перемешивают и на 20 мин ставят в кипящую водяную баню. Охлаждают в токе водопроводной воды и оставляют стоять 5 мин при комн. температуре. Доводят дист. водой до 10 мл по метке на пробирке. Параллельно ставят **контрольную пробу**. К 3 мл дист. воды добавляют 0,5 мл р-ра уксусной к-ты, 0,5 мл р-ра нингидрина и после перемешивания прогревают 20 мин в кипящей водяной бане, охлаждают и доводят водой до 10 мл. (Примечание: в качестве контрольной пробы можно использовать одну дист. воду).

4) Колориметрия. Оптическую плотность опытной и стандартной проб измеряют на ФЭЖе при длине волны 536 нм в кювете 0,5 см против контрольной пробы.

5) Расчет по формуле:

$$\text{Соп.} = (\text{Еоп.} \times \text{Сст.}) / \text{Ест.},$$

где Еоп. и Ест. – оптические плотности опытной и стандартной проб; Сст. – содержание мкг азота в 0,5 мл стандартного

р-ра аланина. Этот стандартный р-р в концентрации 12,869 мг/100 мл содержит 0,128 мг аланина в 1 мл или 0,064 мг в 0,5 мл. Если исходить из того, что молекулярная масса аланина составляет 90 дальтон, а в 1 молекуле аминокислоты находится 1 атом азота (14 дальтон), то из отношения молекулярной и атомной масс $90/14 = 6,4$ можно определить, что 64 мкг аланина будут содержать 10 мкг азота.

Для перевода результатов в г/л найденное кол-во мкг азота умножают на 2000 (для пересчета мкг азота в 1 л биологической жидкости) и делят на 106 (для перевода мкг в г), т. е. умножают на 0,002 или делят на 500 (в случае, если для опыта берется 0,5 мл сыворотки).

Конечная формула приобретает вид:

$$X \text{ г/л} = \text{Соп.} \times 0,002 \quad \text{или} \quad X \text{ г/л} = \text{Соп.} / 500,$$

где X – содержание аминокислоты в сыворотке (г/л); Соп. – содержание аминокислоты (мкг) в стандартной пробе.

Нормальные величины

В сыворотке крови аминокислота составляет **0,020 – 0,050 г/л.**

5.8. Определение содержания креатинина и креатина в крови (метод Яффе)

Принцип метода. В щелочной среде пикриновая к-та взаимодействует с креатинином с образованием оранжевой окраски. Определению мешают вещества с активной метиленовой группой и некоторые восстанавливающие вещества, например глюкоза. Для суждения о содержании креатина используют его свойство превращаться гидролитически в креатинин и увеличивать таким образом уровень эндогенного креатинина. Трансформация креатина в креатинин достигается при прогревании пробы в кислой среде.

Реактивы:

1) р-р ТХУ, 200 г/л;
2) насыщенный р-р пикриновой к-ты (2 г пикриновой к-ты растворить в 100 мл горячей 70–80 °С дист. воды. Раствор оставить на сутки при комн. температуре для осаждения избытка к-ты, после чего отфильтровать. **Осторожно! Пикриновая к-та ядовита!**);

3) р-р гидроксида натрия, 100 г/л (рекомендуется обновлять не реже 1 раза в неделю);

4) р-р гидроксида натрия, 250 г/л;

5) р-р соляной к-ты, 2 моль/л;

6) стандартный р-р креатина. 20 мг креатинина растворить в 100 мл дист. воды. Этот р-р содержит 0,2 мг креатинина в 1 мл. Из него готовят рабочий разведением основного в 20 раз. Этот р-р содержит 0,01 мг креатинина. Оба р-ра нестойкие, хранить под притертой пробкой. (**Примечание:** в отсутствии креатинина можно использовать стандартный р-р бихромата калия 0,5 н., окраска которого эквивалентна окраске 2 мг/100 мл р-ра креатинина).

Ход определения

1) В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки, 1 мл дист. воды и 1 мл р-ра ТХУ (разводя тем самым сыворотку в 3 раза). После тщательного перемешивания пробы выдерживают 20–25 мин при комн. температуре. Затем центрифугируют при 3000 об/мин 15–20 мин.

2) Для определения свободного креатинина. В 3 пробирки вместимостью 10 мл вносят реагенты согласно табл.

Отмерить	Опытная проба, мл	Калибровочная проба, мл	Контрольная (холостая) проба, мл
центрифугат	1,0		
Рабочий р-р креатинина		1,0	
Р-р пикриновой к-ты	0,3	0,3	0,3
Р-р гидроксида натрия, 100 г/л	0,5	0,5	0,5
Дист. вода	3,2	3,2	3,2

3) Для определения креатина используют 1 мл центрифугата, оставшегося от определения креатинина. Добавляют 1 мл р-ра соляной к-ты, пробирку закрыть пробкой и на 20 мин поместить в сушильный шкаф, нагретый до 130 °С. После извлечения пробирки из шкафа в нее опускают кусочек лакмусовой бумажки и по каплям при постоянном перемешивании добавляют р-р гидроксида натрия (250 г/л) до нейтральной или слабощелочной реакции. Затем добавляют 0,3 мл р-ра пикриновой к-ты, 0,5 мл р-ра гидроксида натрия (100 г/л) и доводят объем дист. водой до 5 мл (т. е. добавляют около 2,2 мл).

4) Содержимое пробирок тщательно перемешивают и через 10 мин колориметрируют на ФЭКе при длине волны 500–560 нм в кювете 1 см относительно контрольной пробы.

Расчет результатов

$$X \text{ (мкмоль/л)} = (C \times E_{оп.} \times 88) : E_{ст.}$$

где С – концентрация креатинина в рабочем р-ре стандарта;

Еоп. и Ест. – оптические плотности опытной и стандартной проб;

3 – разведение;

88 – коэффициент пересчета концентрации из мг/100 мл в мкмоль/л.

По разности двух определений находят к-во креатинина, высвобожденного за счет распада креатина и полученный показатель умножают на 1,16 – коэффициент перевода массовой концентрации креатинина в таковую креатина. Он представляет собой отношение молекулярных масс креатина (131 Д) и креатинина (113 Д), т. е. $131/113 = 1,16$.

Нормальные величины

Креатинин в сыворотке крови у женщин – 44–97 мкмоль/л, у мужчин – 53–106 мкмоль/л.

Креатин – 1–4 мг/100 мл.

5.9. Определение концентрации общих липидов в плазме крови колориметрическим методом

Принцип метода: Ненасыщенные липиды реагируют с серной кислотой с образованием ионов карбоната. На второй стадии ионы карбоната реагируют с фосфованилиновым реактивом с образованием розового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна общей концентрации липидов в образце.

Оборудование: пробирки микроцентрифужные Эппендорфа, микроцентрифуга, штатив, пробирки стеклянные, медицинские перчатки, спиртовые салфетки или при их отсутствии вата и спирт 40 %, полуавтоматические пипетки на 2,0; 0,05 и 0,01 мл, стерильные наконечники, стакан для слива с дезинфицирующим раствором, емкость для сбора отработанных скарификаторов и спиртовых салфеток, кипящая водная баня, фотоэлектроколориметр, фильтровальная бумага.

Проведение анализа

Длина волны: 520 (490–550) нм.

Длина оптического пути: 3 мм.

Температура: 37 °С.

Фотометрирование: против холостой пробы.

Внести в пробирки:

	Калибровочная проба	Опытная проба
H ₂ SO ₄ конц.	1 мл	1 мл
Калибратор	40 мкл	
Образец (плазма)		40 мкл

Пробы тщательно перемешать и инкубировать **10 минут** в кипящей водяной бане, затем охладить в холодной воде.

Внести в пробирки:

	Калибровочная проба	Опытная проба	Холодная проба
Реагент (фосфованилин)	1 мл	1 мл	1 мл
Образец (плазма)		50 мкл	
Калибратор	50 мкл		

Пробы тщательно перемешать и инкубировать 15 минут при 37 °С. Измерить оптическую плотность ($A_{оп.}$) и калибровочной ($A_{кал.}$) проб против холостой пробы. Окраска стабильна не менее 1 часа.

Расчеты

Расчет концентрации общих липидов (С):

$$C = A_{оп}/A_{кал} \times 7,5 [г/л],$$

где

$A_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт. плотн.;

А кал – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт. плотн.;

7,5 г/л – концентрация общих липидов в калибраторе.

Нормальные величины

4,5 – 8 г/л.

5.10. Методика определения липидных фракций в плазме крови и мембранах эритроцитов хроматографическим методом

Принцип метода. Липиды экстрагируют из тканей или выделенных субклеточных образований смесью Фолча, экстракт отмывают от водорастворимых примесей и высушивают, после чего определяют основные фракции липидов методом распределительной хроматографии. Тонкослойная хроматография – это эффективный аналитический метод быстрого разделения низкомолекулярных веществ: липидов, аминокислот, нуклеотидов, витаминов и др. Исследуемый образец наносят на тонкий слой силикагеля, закрепленного на пластинке из фольги, пластика или стекла. Пластинку помещают в хроматографическую камеру с небольшим количеством растворителя. Фронт растворителя поднимается по пластинке под действием капиллярных сил, увлекая вещества, содержащиеся в образце. Скорость продвижения разделяемых веществ зависит от их распределения между неподвижной (гидрофильный силикагель) и подвижной (неполярный растворитель) фазами и растворимости в последней. Пластинку с силикагелем высушивают, анализируемые вещества проявляют с помощью соответствующих красителей.

Реактивы:

- 1) Смесь Фолча (1 мл C_2H_5O абсолют. и 2 мл хлороформа на каждую пробирку);
- 2) 0,73% р-р NaCl;
- 3) Хлороформ;
- 4) Проявитель (гексан: диэтиловый эфир: ледяная уксусная кислота в соотношении 73:25:2 мл);
- 5) Йод кристаллический;
- 6) H_2SO_4 конц.
- 7) Фосфованилиновый реактив (150 мг ванилина, 25 мл H_2O дист., 100 мл ортофосфорной кислоты).

Оборудование:

1. ФЭК;
2. Шейкер для пробирок;
3. Водяная баня на $100^{\circ}C$;
4. Центрифуга;
5. Хроматографические пластинки с силикагелем;
6. Хроматографическая камера для разделения липидных фракций;
7. Камера с парами йода;
8. Игла для соскабливания пятен.

Данная методика происходит в 3 этапа:

1. Экстракция липидов.
2. Разделение липидов.
3. Количественное определение отдельных фракций липидов.

Экстракция липидов

1. 400–500 мкл крови поместить в пробирку с гепарином. Перемешать.

2. Центрифугировать кровь 5 мин со скоростью 3000 об/мин. Плазму отобрать в чистую пробирку.

3. Эритроциты промыть 3 раза физиологическим раствором (0,9 % NaCl), центрифугируя по 5 мин.

4. 400 мкл эритроцитов гемолизировать в 1 мл дист. воды, перемешать. 200 мкл гемолизата перенести в смесь Фолча (3 мл) и встряхивать 30–40 мин. В пробирки с плазмой (в каждой по 200 мкл) добавить по 2 мл смеси Фолча.

5. После добавления смеси Фолча пробирки закрыть притертыми пробками (во избежание испарения хлороформа) и поставить встряхиваться на 30–40 мин.

6. Затем в пробирки с плазмой добавить 1 мл $H_2O_{\text{дист.}}$. И поставить центрифугироваться 5 мин. со скоростью 3000 об/мин.

7. После центрифугирования из пробирок слить водно-спиртовую смесь (верхняя фаза), а хлороформ с растворенными липидами перелить в другие пробирки.

8. В пробирки с липидами добавить микропипеткой 400 мкл (20 % от объема хлороформа) 0,73 % р-р NaCl. Перемешать и снова поставить центрифугироваться на 5 мин. Затем вновь удалить р-р. Все повторить 4–5 раз, пока р-р с липидами не станет прозрачным.

9. Пробирки оставить на воздухе при комн. температуре до полного испарения хлороформа (или при температуре 60 °С).

Разделение липидов

1. Предварительно провести очищение пластинок с силикогелем, путем помещения в камеру для хроматографического разделения, содержащую проявитель (смесь Фолча). Высушить пластинки под тягой.

2. К сухим липидам добавить 20 мкл хлороформа. С помощью капилляра внести экстракт на хроматографические пластинки с силикогелем по линии старта (пятно 3–5 мм в диаметре, 0,7 см от края).

3. Пластинки поместить в хроматографическую камеру с проявителем так, чтобы его граница доходила до края пятна.

4. Когда проявитель дойдет до верхнего края, пластинки вынуть и сушить на воздухе 10 мин.

5. После того как пластинки высохнут, поместить их в камеру с парами йода для окрашивания липидных фракций на 0,5–1 мин. При окрашивании обнаруживаются 5 пятен, соответствующих 5 липидным фракциям: 1 пятно – фосфолипиды (ФЛ), 2 пятно – свободный холестерин (СХ), 3 пятно – неэстерифицированные (свободные) жирные кислоты (НЭЖК), 4 пятно – триглицериды (ТГ), 5 пятно – эфиры холестерина (ЭХС).

6. Отдельные фракции липидов, окрашенные в желтый цвет, быстро обвести карандашом и оставить некоторое время сушиться (для испарения йода). При этом обведенные желтые пятна обесцвечиваются.

ВНИМАНИЕ!!! Все работы с летучими реагентами проводить в вытяжном шкафу с включенной тягой.

Количественное определение отдельных фракций липидов

1. Обведенные пятна иглой соскоблить в пробирки с 2 мл H_2SO_4 конц. по фракциям.

2. Накрыть пробирки фольгой и поставить в кипящую водяную баню на 10 мин., после чего охладить в холодной воде.

3. После охлаждения пробирки отцентрифугировать 30 мин. при 3000 об/мин, для оседания силикагеля.

4. К 400 мкл пробы из каждой пробирки добавить 3 мл фосфованилинового реактива и все содержимое тщательно перемешать.

5. Пробирки поставить в тёмное место на 45 мин. (пробы приобретают розовую окраску).

6. Определить оптическую плотность при длине волны 540 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

Расчеты

Для расчёта концентрации фракций липидов плазмы крови используется формула:

$$C = (A_{ФЛ} + A_{СХ} + A_{НЭЖК} + A_{ТГ} + A_{ЭСХ}) / A_{общ.лип} [г/л],$$

где

$A_{ФЛ}$, $A_{СХ}$, $A_{НЭЖК}$, $A_{ТГ}$, $A_{ЭСХ}$ – оптические плотности фракций, измеренные относительно контрольной пробы (фосфованилиновый реактив) у конкретного человека;

$A_{общ.лип}$ – количество общих липидов (г/л) плазмы крови у того же человека, оптические плотности фракций которого были измерены.

Нормальные величины

Плазма крови:

ФЛ – 2 до 3 ммоль/л;

СХ – 3,9 до 6,5 ммоль/л;

НЭЖК – 0,5 до 2 ммоль/л;

ТГ – 0,34 до 0,60 ммоль/л;

ЭСХ – 2,33 до 3,49 ммоль/л.

Примечание: показатели в мембранах эритроцитов всегда рассматриваются в соотношении с плазмой крови, поскольку они находятся в равновесном состоянии.

5.11. Определение концентрации малонового диальдегида (МДА) в плазме крови колориметрическим методом

Принцип метода. В основу метода положено определение концентрации окрашенного комплекса, образовавшегося в результате реакции малонового диальдегида (МДА), одного из конечных продуктов кислотного гидролиза гидроперекисей липидов, с двумя молекулами тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в кислой среде при температуре 90–100 °С. Максимум поглощения образовавшегося комплекса находится в области 532–535 нм. По интенсивности окрашивания, определяемой на спектрофотометре, можно судить о количестве МДА в плазме, а, следовательно, об уровне ПОЛ.

Оборудование

- спектрофотометр, длина волны 510 нм, или фотоэлектроколориметр, длина волны 490–540 нм (зеленый светофильтр), кювета с толщиной поглощающего свет слоя 5 мм;
- полуавтоматические пипетки и наконечники;
- пробирки центрифужные вместимостью 10 мл;
- стаканчики вместимостью 250 мл;
- баня водяная, обеспечивающая температуру $+100 \pm 1$ °С;
- центрифуга лабораторная на 3000 об/мин;
- секундомер.

Проведение анализа

Длина волны: 540 нм.

Длина оптического пути: 5 мм.

Фотометрирование: против холостой пробы.

Внести в пробирки:

	Опытная проба	Холостая проба
Ортофосфорная кислота	1,5 мл	1,5 мл
Образец (плазма)	125 мкл	
Дист. вода		125 мкл
Р-р ТБК	0,5 мл	0,5 мл
Накрыть пробирки пищевой пленкой (фольгой) и поместить в водяную баню на 45 минут при 100 °С. После кипячения пробирки охладить в холодной воде 3–5 мин.		
n-Бутанол	2 мл	2 мл

Пробирки интенсивно встряхнуть до образования однородной розовато-белой суспензии и центрифугировать 10 мин. при 3000 об/мин. Если после центрифугирования верхний слой бутанола в отдельных случаях не прозрачен, то необходимо повторить центрифугирование, предварительно перемешав верхний слой бутанола стеклянной палочкой. Сразу после центрифугирования из пробирок отобрать верхнюю розоватую фазу (малоновый диальдегид) и измерить оптическую плотность опытных проб против холостой пробы.

Расчеты

Концентрацию МДА в плазме крови рассчитать по формуле:

$$C = A_{оп} \times 10^6 \times 2 \text{ мл} / 1,56 \times 10^5 \times 0,125 \text{ мл},$$

где $A_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт. плотн.;

$1,56 \times 10^5$ ммоль/см⁻¹ – коэффициент молярной экстинкции МДА;

Нормальные величины

2,2–4,8 мкмоль/л.

5.12. Определение малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в слюне

Оборудование: 3–4 пробирки, пипетка на 4, 3, 1, 0,25 мл, наконечники для пипетки, водяная баня, центрифуга, спектрофотометр.

Реактивы: слюна, раствор ТБК, ортофосфорная кислота, *n*-бутанол, дистиллированная вода, *n*-гептан, 0,01 N водный раствор соляной кислоты, изопропанол, хлорид натрия прокаленный.

1) Определение МДА в слюне

Слюну собирают методом сплёвывания в пробирку в количестве 5–7 мл. Собранная слюна должна быть без пузырьков. В 3 пробирки последовательно приливают следующие реактивы по данной схеме: пипеткой на 1 мл отбирают раствор ТБК и приливают в пробирки, затем также ортофосфорную кислоту пипеткой на 3 мл и слюну пипеткой на 0,250 мл добавляют в те же пробирки – это получается опытная проба. Для холостой пробы нужна 1 пробирка. В пробирку приливают раствор ТБК 1 мл, дистиллированную воду 250 мкл и ортофосфорную кислоту 3 мл.

Отмерить, мл	Опытная проба	Холостая проба
Ортофосфорная кислота	3 мл	3 мл
Слюна	0,25 мл	–
Дистиллированная вода	–	0,25 мл
Раствор тиобарбитуровой кислоты	1 мл	1 мл

Все 4 пробирки плотно накрывают конденсирующими колпачками и помещают в водяную баню на 45 минут при 100 °С. После кипячения пробирки охлаждают в холодной воде 3–5

минут. Затем в пробирки добавляют 4 мл n-бутанола и интенсивно встряхивают до появления розовато-белой суспензии. Далее пробирки центрифугируют 10 минут при 3000 об/минуту. Сразу после центрифугирования из пробирок отбирают верхнюю розовую фазу, т.е. МДА и измеряют оптическую плотность опытных проб против холостой пробы при длине волны 540 нм.

Содержание МДА рассчитывают по этой формуле:

$$A = E_{\text{опт.}} \cdot 85,47,$$

где $E_{\text{опт.}}$ – оптическая плотность опытной пробы при 540 нм.

2) Определения диеновых конъюгатов (ДК) в слюне

К 0,1 мл слюны добавляют 8 мл гептан-изопропанольной смеси в соотношении 1:1 встряхивают в течение 15 минут и центрифугируют при 6000 об/мин 10 минут. Затем липидный экстракт переносится в чистую пробирку и добавляют 5 мл гептан-изопропанольной смеси в соотношении 3:7, после чего добавляют 2 мл 0,01 N водного раствора соляной кислоты в пробирку для разведения фаз и удаления нелипидных примесей. После разделения фаз (верхнюю) гептановую переносят в чистую пробирку, и затем к нижней добавляют 1 г прокаленного хлорида натрия для обезвоживания изопропанольного экстракта, который переносят в чистую пробирку. Измерение оптических плотностей (E) проводят на спектрофотометре. Каждая фаза оценивается против соответствующего контроля при длинах волн 220 нм (поглощение изолированных двойных связей) и 232 нм (поглощение ДК). Содержание ДК оценивают по относительным величинам E_{232}/E_{220} и выражают в относительных единицах.

5.13. Определения МДА в тканях мозга

Принцип метода. Метод основан на образовании окрашенного комплекса при взаимодействии малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Перед применением данного метода нужно приготовить растворы ТБК (8 г/л), трихлоруксусной кислоты (ТХУ (100 г/л)) и изотонический раствор хлорида натрия (9 г/л).

Реактивы: ТБК (8 г/л), ТХУ (100 г/л), изотонический раствор (9 г/л).

Оборудование: центрифужные пробирки, центрифуга, водяная баня, фильтровальная бумага, ступка, пестик, пипетки, фольга, ФЭК, секундомер.

Ход работы:

1) Образец ткани промакнуть фильтровальной бумагой и приготовить гомогенат из расчета 100 мг тканей мозга на 2 мл физиологического раствора. Гомогенизирование 4 минуты при охлаждении.

2) В центрифужную пробирку поместить 2 мл гомогената ткани. К содержимому пробирки добавить 1 мл раствора ТХУ и 1 мл раствора ТБК.

3) Пробирку закройте фольгой и нагревайте в кипящей водяной бане 10 минут. После охлаждения центрифугировать 10 мин (3000 об/мин)

4) Определите оптическую плотность против контрольного раствора (1 мл ТХУ смешивали с 1 мл ТБК и нагревали 10 минут), при 535 нм и 450 нм.

5) Рассчитайте содержание МДА по формуле:

$$\text{МДА} = E_{535} - E_{450} / 0,156 \text{ (ммоль/л)}.$$

5.14. Определение общих липидов в гомогенате тканей мозга

Принцип метода заключается в том, что ненасыщенные липиды и жирные кислоты, фосфолипиды и холестерин взаимодействуют после гидролиза серной кислотой с ФВР с образованием красного окрашивания.

Реактивы: хлороформ, абсолютный спирт, концентрированная серная кислота, стандартный раствор липидов (8 г/л), фосфованилиновый реактив (ФВР), головной мозг.

Оборудование: фильтровальная бумага, ступка, пестик, пинцет, секундомер, воронка, маленькие пробирки, фольга, пипетки, водяная баня, ФЭК, весы.

Ход работы:

1) Высушите образец ткани, используя фильтровальную бумагу и пинцет. Затем взвесьте ткань.

2) Приготовьте гомогенат мозговой ткани, из расчета 100 мг на 2 мл свежеприготовленной смеси Фолча (хлороформ: абсолютный спирт, 2:1). Гомогенизирование в течение 4 мин при охлаждении.

3) Измельченный материал перенести в пробирку через воронку, смыв ступку и пестик смесью для экстракции (смесь Фолча)

4) Пробирки с измельченным материалом закройте фольгой и поместите их в термостат на 15 минут при температуре 45°C.

5) В двух пробирках с 1,5 мл конц. серной кислотой смешивают экстракт, стандартный раствор липидов (калибратор). Еще одна пробирка с 1,5 мл кислоты является контрольным раствором. При смешивании растворов, взболтайте экстрагированную смесь.

Отмерить, мл	Проба	Стандарт	Контрольный раствор
Экстракт общих липидов	0,05 мл	-	-
Стандартный р-р липидов	-	0,05 мл	-
Конц. серная кислота	1,50 мл	1,50 мл	1,50 мл

*Оставшийся в пробирках экстракт липидов не выливайте!
(Далее пойдет на ТСХ)*

6) Все пробирки тщательно встряхните и нагревайте на кипящей водяной бане 15 мин., после чего пробирки охладите проточной водой.

7) Смешиваем 0,1 мл гидролизата из каждой пробирки и 1,5 мл ФВР. Тщательно перемешайте и поставьте пробирки минимум на 50 мин в темное место.

8) Не позднее 60 мин измерьте оптическую плотность пробы и стандарта против контрольного раствора (ФВР), при 510–550 нм в 1 см кюветах.

Для расчета количественного содержания общих липидов (Об.Л) используйте следующую формулу:

$$\text{Об. Л(г/л)} = 8 * A1 (\text{проба}) / A2 (\text{стандарт})$$

5.15. Тонкослойная хроматография (ТСХ) липидов тканей мозга

Реактивы: этанол, диэтиловый эфир, смесь Фолча (2 хлороформ: 1 абсолютный спирт), дистиллированная вода, хлороформ, проявитель (смесь гексана, диэтилового эфира и ледяной уксусной кислоты (73:25:2)), кристаллический йод, концентрированная серная кислота, ФВР.

Оборудование: обезжиренный фильтр, центрифужные пробирки, маленькие пробирки, фольга. воронки, большой

стеклянный стакан, водяная баня, центрифуга, хроматографические силикагельные пластинки, стеклянные камеры, вытяжка, капилляры, пипетки, простой карандаш, скальпель, ФЭК.

Ход работы:

1) Оставшийся экстракт встряхните и отфильтруйте в чистые пробирки через обезжиренный фильтр (фильтровальную бумагу спрыскивали смесью этанола и диэтилового эфира, 1:1).

2) Смесью в фильтре повторно промойте смесь для экстракции, не превышая общего объема смеси в пробирке (опираясь на объем экстрагированной смеси в методике по определению общих липидов (2 мл)). В фильтрат добавляли (на 100 мг ткани), 0,4-0,5 мл дистиллированной воды.

3) Встряхните пробирки и оставьте до образования двух прозрачных фаз, после чего, слейте из каждой верхнюю нелипидную смесь (водно-метанольную) до белой пленки.

4) Оставшуюся смесь с липидами выпарить на водяной бане, до полного испарения. (5–10 мин). К осадку добавьте 0,04 мл хлороформа.

5) С помощью капилляра нанесите экстракт на готовые пластинки (прочищенные). отступая от нижнего края, примерно на 1 см, при этом, чтобы капля не расплылась, нужно периодически дуть на нанесенный экстракт. Кончик капилляра не должен касаться самой пластинки. Наносить экстракт можно в одну точку, также можно наносить экстракт горизонтальной полосой, главное, пользоваться одним способом до конца всего опыта. В стеклянные камеры под вытяжкой налейте проявитель, ориентируясь на линию старта пластинок.

6) Пластинки поместите в камеру для проявления. Когда проявитель дойдет до края пластинки, их нужно вынуть и высушить 10 мин на воздухе. Сухие пластинки помещали

в камеру с парами йода (большой стеклянный стакан), для окрашивания липидных фракций. Как только на пластинке четко проявились пятна, нужно быстро простым карандашом их обвести по контуру. Начиная от линии старта обнаруживаются 8 пятен: 1 – фосфолипиды (ФЛ), 2 – неидентифицированные соединения (НИС), 3 – холестерин (ХЛ), 4 – моноацилглицериды, 5 – диацилглицериды, 6 – свободные жирные кислоты (СВЖ), 7 – триглицериды (ТГ). 8 – эфиры холестерина (ЭХ).

7) Пятна соскабливаем скальпелем в центрифужные пробирки с 2 мл концентрированной серной кислоты, каждую фракцию в отдельную пробирку. Их ставим в кипящую водяную баню на 10 минут. затем охладите проточной водой.

8) Полученный гидролизат центрифугировать 30 минут (3000 об/мин). К 0,4 мл пробы, из каждой пробирки, добавить 3 мл ФВР и тщательно перемешать. Ставим пробирки на 45 мин в темное место.

9) Измерьте оптическую плотность каждой пробирки против ФВР, при 540 нм длине световой волны в 1 см кюветках.

10) Для количественного определения липидных фракций необходимо рассчитать процент фракции от суммы оптических плотностей всех фракции, далее, используя полученные проценты и данные общих липидов, рассчитывали массу отдельных липидных фракций.

5.16. Простой колориметрический микрометод определения свободных жирных кислот

Принцип метода: определение содержания СЖК по поглощению хлороформного раствора их медных солей, полученных встряхиванием раствора натриевых солей и хлороформа.

Оборудование и реактивы: ФЭК, центрифуга, таймер, встряхиватель пробирок, пробирки, пипетки на 10 мл, 2 мл, 0,05 мл, 0,01 мл, дистиллированная вода, хлороформ, гептан, абсолютный этиловый спирт, 0,5 М раствор $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, 1 М раствор триэтанолamina, 1 М раствор NaOH , насыщенный раствор NaCl , раствор 1,5-дифенилкарбазида.

Расчет делается на необходимое количество пробирок. Расчет реактивов представлен на 15 пробирок.

1) *Экстракционная смесь:* 25 мл хлороформа, 25 мл гептана, 1,2 мл абс. этилового спирта. Раствор готовить на день.

2) *Медный реагент:* 2 мл раствора азотномедной соли (1,21 г $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ на 10 мл воды), раствор готовить на день; 2 мл 1 М триэтанолamina (1,33 мл в 10 мл воды); 1,2 мл 1 М NaOH (0,4 г едкого натра на 10 мл воды), срок годности раствора 7 дней.

При приготовлении медного реагента обязательно соблюдать строгую последовательность: азотномедная соль – триэтаноламин – едкий натр. Объем довести до 20 мл насыщенным раствором NaCl . Обязательно проверить рН раствора (8,0)!, доводить с помощью едкого натра.

3) *Раствор 1,5-дифенилкарбазида.* Готовить на день и ближе к моменту его использования. 40 мг растворить в 10 мл абсолютного этилового спирта. Перед самым употреблением для усиления и стабилизации окраски добавить 0,100 мл раствора триэтанолamina.

4) *Стандартный раствор.* Готовится маточный раствор (4 мкл олеиновой кислоты растворить в 10 мл хлороформа), что соответствует $C = 4$ ммоль/л. Затем путем его разведения получаем стандартные растворы с концентрацией 2 ммоль/л, 1 ммоль/л, 0,5 ммоль/л, 0,25 ммоль/л и 0,125 ммоль/л.

Ход работы:

а) В центрифужные пробирки поместить по 0,05 мл сы-воротки или плазмы, добавить по 3 мл экстракционной смеси и по 0,9 мл медного реагента.

Отмерить (мл)	Опытная проба, мл	Калибровочная проба, мл	Контрольная (холостая) проба, мл
Плазма	0,05		
Стандартный раствор		0,05	
Экстракционная смесь	3,0	3,0	3,0
Медный реагент	0,9	0,9	0,9

б) Пробирки тщательно взболтать и поместить во встряхиватель пробирок на 5 мин.

Перед помещением в центрифугу опять тщательно взболтать и центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин.

в) Затем отобрать по 1,8 мл верхней фазы в другие пробирки.

г) В каждую пробирку добавить по 0,5 мл раствора дифенилкарбазида, выдержать 15 мин.

д) Интенсивность образующейся окраски измерять строго через 15 мин! на ФЭКе при длине волны 540 нм против контроля в кювете 0,5 см.

е) Для проведения расчетов концентрации СЖК в пробах использовать формулу:

$$C \text{ (ммоль/л)} = A_{\text{оп}} / A_{\text{кал}} \times C_{\text{кал}},$$

где $A_{\text{оп}}$ – оптическая плотность опытной пробы; $A_{\text{кал}}$ – оптическая плотность калибровочной пробы; $C_{\text{кал}}$ – концентрация олеиновой кислоты в калибровочной пробе.

5.17. Определение кортизола методом иммуферментного анализа с помощью набора ДС–ИФА– Стероид–Кортизол

Принцип метода: метод основан на одностадийном твердофазном конкурентном анализе с применением моноклональных антител к кортизолу.

В лунках планшета при добавлении исследуемого образца (определяемый антиген) и конъюгата (стандартный антиген (АГ), меченный ферментом) происходит конкурентное связывание сывороточного кортизола и кортизола, конъюгированного с пероксидазой хрена, с моноклональными антителами к кортизолу, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

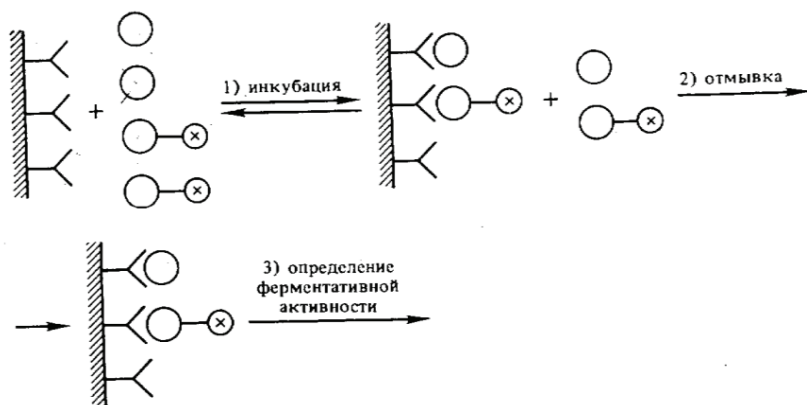


Рис. 6. Схема анализа

Обозначения:

- антитело (АТ), иммобилизованное на твердой фазе;
- определяемый антиген (АГ);
- стандартный антиген (АГ), меченный ферментом.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окрашивания обратно пропорционально концентрации кортизола в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация кортизола в анализируемых образцах.

Оборудование

- Вертикальный спектрофотометр для микропланшетов с корректирующей длиной волны (450, 540 и 570 нм).
- Инкубатор, который может обеспечить стабильные условия инкубации ($37 \pm 0,5$ °С).
- Шприц, многоканальная пипетка, распределительный коллектор или специальное автоматическое устройство для промывки.
- Фильтровальная бумага для промокания микропланшета.
- Градуированные цилиндры объемом 25 и 50 мл.
- Пипетки и наконечники.

Подготовка реагентов:

1. Реагенты готовы к применению:
 - иммуносорбент (! во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре в закрытом пакете не менее 30 минут);
 - стандартные калибровочные пробы;
 - конъюгат;
 - контрольные сыворотки;
 - ТМБ-субстратный раствор;
 - стоп-реагент.

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления:

- Рабочий промывочный раствор (ПР). Содержимое флакона с концентратом (x25) промывочного раствора тщательно перемешать. Далее необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной или деионизированной. Полученный раствор тщательно перемешать. Срок хранения ПР – 14 суток при температуре от 2 до 8 °С.

Проведение анализа

Примечание: перед использованием все реагенты набора выдерживать в течение 30 минут при температуре от 18 до 25°С.

1. Стандартные калибровочные пробы и контрольные сыворотки вносить по 25 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ – Субстратного раствора. В остальные лунки внести по 25 мкл исследуемых образцов сывороток крови в двух повторах.

Внимание! Время внесения не должно превышать 10 минут!

2. Во все лунки планшета, кроме лунок с контролем ТМБ – Субстратного раствора, внести по 100 мкл конъюгата, планшет закрыть крышкой или защитной пленкой.

3. Планшет инкубировать в течение 30 минут на термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин и температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

4. Снять липкую пленку и с помощью многоканального дозатора промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором. В каждую лунку вносить не менее 300 мкл жидкости рабочего ПР в процессе каждого цикла промывки. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого

заполнения, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

5. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ – Субстратного раствора и выдержать при комнатной температуре в темноте 20–30 минут.

6. Реакцию останавливать добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп – реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5–10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

7. Измерить ОП с помощью вертикального фотометра с длиной волны 450 нм.

Расчет результатов анализа

1 вариант: По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение ОП в лунках с анализируемым образцом.

Построить калибровочный график зависимости ОП (ось ординат) от концентрации кортизола (ось абсцисс) в калибровочных пробах. Определить концентрацию кортизола в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентраций кортизола в образце.



Рис. 7. Пример калибровочного графика.

2 вариант: Построение графика в системе логарифмических координат.

Нормальные значения концентрации кортизола:

Утро – 190–690 нмоль/л.

Вечер – 55–250 нмоль/л.

5.18. Иммуноферментное определение концентрации инсулина в сыворотке (плазме) крови человека

Принцип метода: метод определения основан на двухстадийном «сэндвич» варианте твердофазного иммуноферментного анализа. На первой стадии в лунки стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами вносят калибровочные и контрольный образцы с известными концентрациями инсулина, исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови. На второй стадии связавшийся в лунках инсулин обрабатывают конъюгатом моноклональных антител к инсулину. Образовавшиеся иммунные комплексы «моноклональные антитела – инсулин – конъюгат» выявляют

ферментативной реакцией с H_2O_2 и раствором тетраметилбензида. После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом измеряют оптическую плотность растворов в лунках на основной длине волны 450 нм при референсной длине волны 620–650 нм. Допускается измерение только с фильтром 450 нм. Степень окрашивания пропорциональна концентрации инсулина в анализируемом образце. Концентрация инсулина в анализируемых образцах рассчитывается на основании калибровочного графика.

Оборудование и материалы

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–650 нм;

- холодильник бытовой; пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20, 50, 100 и 1000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 20, 50, 100 и 300 мкл;

- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °C и 400–800 об/мин; промывочное устройство для планшетов;

- флаконы вместимостью 15–30 мл; цилиндр мерный вместимостью 100 мл;

- колбы вместимостью 1000 мл;

- вода дистиллированная;

- перчатки хирургические;

- бумага фильтровальная лабораторная.

Подготовка образцов

Для анализа следует использовать образцы сыворотки и плазмы (полученной с цитратом натрия в качестве антикоагулянта). Не следует использовать мутную, гемолизированную сыворотку крови, а также сыворотку и плазму, содержащую азид натрия.

Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 48 часов или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 мес. После размораживания образцы тщательно перемешать, осадок отделить центрифугированием. Тепловая обработка образцов должна быть исключена. Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки и плазмы крови не допускается!

Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Проведение анализа подготовка реагентов

Перед проведением анализа компоненты набора и анализируемые образцы выдержать при температуре от 18 до 25 °С не менее 60 мин.

Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка. В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов. Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

Подготовка калибровочных и контрольного образцов

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения. Калибровочные и контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию. Необходимое количество конъюгата отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента. Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом). Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			Концентрат ФСБ-Т, мл	Дистил. вода, мл
2	2,0	2,0	4,0	до 100
3	3,0	3,0	6,0	до 150
4	4,0	4,0	8,0	до 200
5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	6,0	6,0	12,0	до 300
7	7,0	7,0	14,0	до 350
8	8,0	8,0	16,0	до 400
9	9,0	9,0	18,0	до 450
10	10,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	11,0	22,0	до 550
12	12,0	12,0	24,0	до 600

Подготовка раствора тетраметилбензидина

Раствор ТМБ готов к использованию. Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента и поместить в защищенное от света место. Остатки раствора ТМБ из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ). Раствор ТМБ после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов. Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

Проведение ИФА

1) Внести во все лунки по 100 мкл раствора для разведения образцов (РРО). Внести в соответствующие лунки в дублях по 50 мкл каждого из калибровочных образцов и по 50 мкл контрольного образца. В лунки, предназначенные для анализируемых образцов внести в дублях по 50 мкл исследуемых

образцов. Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в течение 20 мин в термостатируемом шейкере при температуре 37 ± 1 °С с частотой 700 об/мин. 7.9. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором.

2) При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

3) Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата. Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники.

4) Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в течение 20 мин в термостатируемом шейкере при температуре 37 ± 1 °С с частотой 700 об/мин.

5) По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета как описано выше (п. 7.9).

6) Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензида. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в темноте в термостатируемом шейкере при температуре 37 °С в течение 15 мин с частотой 700 об/мин. Для внесения раствора тетраметилбензида использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники. Внести во все лунки с той же

скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензида, по 100 мкл стоп-реагента.

Регистрация результатов

Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–650 нм. Допускается измерение только с фильтром 450 нм. Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

Учет результатов

1. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия: – ОПср. калибровочного образца 0 мМЕ/л не должна быть выше 0,2 ед. опт. плотн.; – ОПср. калибровочного образца 200 мМЕ/л должна быть не ниже 1,1 ед. опт. плотн.

2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации инсулина (ось абсцисс) в калибровочных образцах (мМЕ/л). Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, также рекомендуется определение концентрации инсулина в контрольных образцах.

3. Определить содержание инсулина в контрольных образцах и анализируемых пробах по калибровочному графику.

4. Если значение оптической плотности образца превышает значения ОП для калибровочного образца 200 мМЕ/л, то

данный образец анализируют повторно после дополнительного разведения раствором для разведения образцов в 10 раз (например, к 90 мкл РРО добавить 10 мкл анализируемого образца), полученные для образцов результаты умножаются на 10.

5. Контрольный образец служит для проверки достоверности результатов анализа. Измеренные значения концентрации инсулина в контрольном образце не должны выходить за пределы интервалов, указанных на этикетке флакона и в паспорте. В этом случае результаты анализа можно считать достоверными. При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

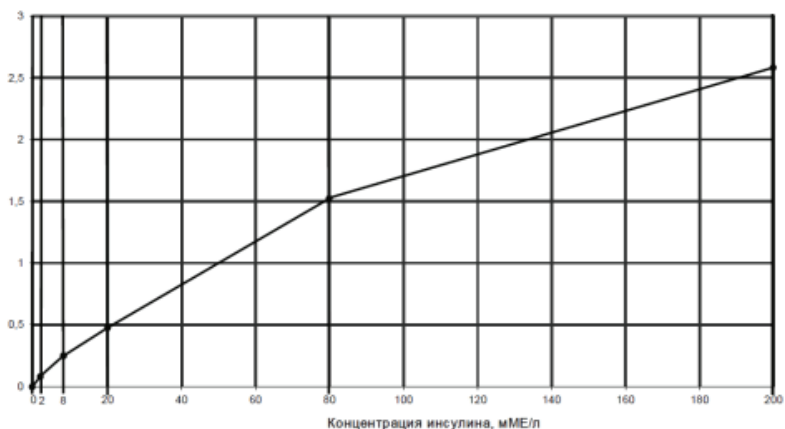


Рис. 8. Пример зависимости оптической плотности от концентрации инсулина в калибровочных образцах

5.19. Количественное определение активности каталазы крови (по Баху и Зубковой)

Принцип метода: Фермент каталаза содержится в эритроцитах и разлагает перекись водорода с образованием кислорода и воды. При количественном определении каталазы крови измеряют содержание перекиси водорода, разложенной каталазой. Активность каталазы выражают с помощью каталазного числа и показателя каталазы.

Каталазным числом называют количество мг перекиси водорода, которое разлагается 1 мкл крови. О количестве расщепленной перекиси водорода судят по разности количества марганцевокислого калия, израсходованного на титрование смеси до и после действия каталазы.

Показателем каталазы называют дробь, в которой числителем является каталазное число, а знаменателем - число миллионов эритроцитов в 1 мкл исследуемой крови.

Реактивы: 1 % раствор перекиси водорода, 10 % серная кислота, 0,1н раствор марганцевокислого калия, исследуемая кровь.

Ход работы

Приготовление раствора крови. В мерную колбу на 100 мл наливают около 10 мл дистиллированной воды, 0,1 мл крови. При этом пипетку с кровью промывают несколько раз водой, содержащейся в колбе. В колбу наливают дистиллированную воду до метки. Получают основной раствор крови, где кровь разведена в 1000 раз. В 1 мл такой крови содержится 1 мкл неразведенной крови.

Приготовление опытных и контрольных проб. В две конические колбы (опытную и контрольную) наливают по 1 мл основного раствора и по 7 мл дистиллированной воды.

Контрольную пробу подвергают кипячению в течение 2 мин для разрушения каталазы, а опытную пробу оставляют без изменения. Обе колбы выдерживают при комнатной температуре (18–22 °С) в течение 10 мин. Затем в каждую колбу вносят по 2 мл 1 % перекиси водорода и оставляют при комнатной температуре на 30 мин.

Титрование и расчет. В каждую колбу приливают по 5 мл 10 % серной кислоты и оттитровывают содержимое обеих колб 0,1н раствором марганцевокислого калия до розового окрашивания. Рассчитывают активность каталазы, исходя из того, что на титрование контрольной пробы, где каталаза разрушена, пойдет больше раствора марганцевокислого калия, чем на титрование опытной пробы. Полученную разность умножают на 1,7 и получают каталазное число для исследуемой крови. Зная, что в 1 мкл крови содержится около 5 миллионов эритроцитов, можно рассчитать показатель каталазы.

Нормальные значения

В норме каталазное число колеблется от 10 до 15 ед.

5.20. Спектрофотометрическое измерение активности каталазы (по Королюку М.А.)

Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Реактивы: раствор молибдата аммония $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ 4%, раствор перекиси водорода (H_2O_2) 0.03 %.

Приборы и посуда: пробирки стеклянные (10 мл), пипетки измерительные (0,1 мл, 1 мл, 2 мл, 5 мл), пробирки центрифужные, кюветы спектрофотометрические с толщиной слоя 10 мм, термостат, центрифуга, спектрофотометр СФ-46.

Ход определения. Реакция запускается добавлением 0,1 мл сыворотки крови или гомогената тканей к 2 мл раствора перекиси водорода 0,03 %. В холостую пробу вместо гомогената вносят 0,1 мл дистиллированной воды.

Содержимое обеих пробирок инкубируют 10 мин при температуре 37 °С.

Реакцию останавливают добавлением 1 мл 4 % молибдата аммония. Раствор молибдата аммония предварительно центрифугировать в течение 5 минут при 2700 об/мин.

Содержимое пробирок центрифугируют 10 минут при 6 тыс. об/мин. или в течение 20 минут при 3000 об/мин.

Интенсивность развившейся окраски измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм (лампа накаливания) против контрольной пробы, в которую вместо перекиси водорода вносят 2 мл дистиллированной воды.

Активность каталазы рассчитывают по формуле:

для гомогената ткани $E = (A_{\text{хол}} - A_{\text{оп}}) \cdot V \cdot t \cdot K / m$,

для сыворотки крови $E = (A_{\text{хол}} - A_{\text{оп}}) \cdot V \cdot t \cdot K$,

где

E – активность каталазы (мкат/мг);

$A_{\text{хол}}$ и $A_{\text{оп}}$ – экстинция холостой и опытной проб;

V – объем вносимой пробы (0,0001 л);

t – время инкубации (600 с);

m – масса ткани во вносимой пробе (мг);

K – коэффициент миллимолярной экстинции перекиси водорода ($22.2 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

1 катал (кат) – это такая каталитическая активность, которая увеличивает скорость реакции на 1 моль/сек в определенной тест-системе.

Пересчёт:

1 мкмоль/мин = 1 ед. акт. = 16.67 нкат.

1 ммоль/мин = 0.01667 мкат.

5.21. Определение активности супероксиддисмутазы (СОД)

Принцип метода основан на ингибировании реакции аутоокисления адреналина в присутствии фермента в щелочной среде, вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, являющихся одним из промежуточных продуктов реакции самопроизвольного окисления. Реакция отслеживается спектрофотометрическим методом регистрацией адrenoхрома, при длине волны 347 нм.

Реактивы:

- этанол-хлороформная смесь (2:1 по объёму);
- 0,2М бикарбонатный буферный раствор, рН 11;
- 0,1% аптечный раствор адреналина (5,46 мМ).

Ход работы:

1. В пробирки вносят по 50 мкл эритроцитов и 450 мкл дистиллированной H_2O , охлаждённой до $0\text{ }^{\circ}C$. Добавляют по 250 мкл этанол-хлороформной смеси, для денатурации белков плазмы.

2. Полученную суспензию центрифугируют при 8000 об/мин в течение 15 минут. В дальнейшей работе используется супернатант.

3. Для выполнения работы подготавливают контрольные и опытные пробы:

4. Контроль: 3мл бикарбонатного буфера + 0,05мл дистиллированной воды.

5. Опытные пробы: 3мл бикарбонатного буфера+ 0,05мл супернатанта.

6. Перед измерением оптической плотности в пробы вносят по 0,15 мл раствора адреналина. Измерение оптической плотности регистрировали в течении 3-х минут. Каждые

30 секунд при длине волны 347 нм в кювете с толщиной оптического слоя 1,0 см.

7. Для расчета активности использовали показатели величины поглощения контрольной и опытной проб. Активность СОД выражают в усл.ед.*мин./л, либо в усл. ед.*мин./г Рг.

8. Активность супероксиддисмутазы рассчитывали по формуле:

$$A_{\text{SOD}} = \frac{\left(\frac{E_{\text{хол}} - E_{\text{оп}}}{E_{\text{хол}}}\right) \times 100\% \times F \times V \times 1000}{50 \times v \times d}$$

где

$E_{\text{хол}}$ – оптическая плотность контрольной пробы;

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность экспериментальных проб;

V – общий объём инкубационной смеси, 3,2 мл;

F – фактор разведения (равен 15);

v – объём супернатанта, используемый в измерении, 0,05 мл;

d – длина оптического пути кюветы, 1 см.

Нормальные значения

164–240 ед/мл.

5.22. Количественное определение активности холинэстеразы сыворотки крови

В крови человека содержатся два вида холинэстеразы: в эритроцитах находится истинная холинэстераза, а в плазме (сыворотке) крови – неспецифическая или псевдохолинэстераза. Ацетилхолинэстераза катализирует расщепление ацетилхолина с образованием холина и уксусной кислоты. Гидролиз осуществляется в два этапа. На первом этапе образуется холин и ацетилированный фермент. На втором этапе происходит расщепление водой ацетилированного фермента: фермент освобождается и выделяется уксусная кислота.

Принцип метода: определения активности холинэстеразы основано на количественном определении уксусной кислоты, образовавшейся при распаде ацетилхолина, путем титрования с 0,01 н раствором едкого натра.

Реактивы: физ. раствор, раствор ацетилхолина (содержимое ампулы (0,2 г) растворяют в 1,2 мл дистиллированной воды), сыворотка крови, индикатор феноловый красный, 0,01 н раствор едкого натра.

Ход работы:

В опытную пробирку наливают 1,8 мл физ. раствора и 0,1 мл ацетилхолина. В контрольную – 1,9 мл физ. раствора. В обе пробирки добавляют по 0,1 мл сыворотки крови и по 3 капли индикатора фенолового красного. Растворы приобретают ярко-малиновую окраску. Обе пробирки ставят в термостат при 37–38 °С на 30 мин.

При инкубации жидкость в опытной пробирке приобретает желтый цвет. Раствор опытной пробирки титруют 0,01 н раствором едкого натра до ярко-малиновой окраски как в контрольной пробирке.

Расчеты:

Активность холинэстеразы находят при умножении количества мл 0,01н раствора едкого натра, использованного на титрование, на 1,63 (коэффициент).

Нормальные значения

В норме активность холинэстеразы сыворотки крови равна 3–6 мл ацетилхолина за 30 мин.

5.23. Определение сиаловых кислот в плазме

Принцип метода: при нагревании гликопротеидов плазмы с трихлоруксусной кислотой отщепляются сиаловые кислоты, которые гидролизуются с образованием свободной нейраминовой кислоты и уксусной кислоты. Резорцин в присутствии солей меди дает с нейраминовой кислотой синее окрашивание.

Реактивы:

1. Меди сульфат, 0,1 моль/л: растворяют 624 мг сульфата меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 25 мл воды.

2. Резорцин 2 г/л. Резорциновый реактив готовят, растворяя 200 мг резорцина в 10 мл воды, затем добавляют концентрированную соляную кислоту и 0,25 мл раствора сульфата меди, после смешивания общий объем доводят до 100 мл водой.

3. Экстрагирующий реактив: смешивают 85 мл бутилацетата и 15 мл бутилового спирта.

4. Трихлоруксусная кислота, 50 г/л (ТХУ).

5. Калибровочные растворы. Основной раствор содержит 0,5 мг кристаллической ацетилнейраминовой кислоты в 1 мл воды. Из него готовят калибровочные растворы. В пять пробирок добавляют по: 0,1 мл; 0,2 мл; 0,3 мл; 0,4 мл; 0,5 мл основного раствора, доводят объем каждой пробирки до 1 мл водой. Содержание нейраминовой кислоты соответствует с первой по пятую пробирки: 50 мкг/мл; 100 мкг/мл; 150 мкг/мл; 200 мкг/мл; 250 мкг/мл.

Ход работы:

К 1 мл плазмы или сыворотки приливают 1,9 мл раствора ТХУ, ставят на 7 минут в кипящую водяную баню для гидролиза, затем охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр.

К 0,5 мл прозрачного фильтрата добавляют 0,5 мл воды и 1 мл резорцинового реактива, ставят на водяную кипящую баню на 15 минут. После этого охлаждают, добавляют 3 мл экстрагирующего реактива, встряхивают и оставляют на 15 минут для расслоения фаз. Окраска переходит в верхний слой, который берут для фотометрии, которую проводят на ФЭК при длине волны 575–590 нм в кювете на 0,5 см против холостого опыта, при постановке которого к 1 мл воды добавляют 1 мл резорцинового реактива. Остальные процедуры те же, что и в основном опыте.

Расчет проводят по калибровочному графику.

Нормальные значения

620–730 мг/л или 1,8–2,3 ммоль/л.

**5.24. Сорбционная способность эритроцитов (ССЭ)
(по Тогайбаеву А.Я.)**

Ход работы: 1 мл эритроцитарной массы помещают в центрифужную пробирку с 3 мл раствора метиленового синего. Перемешивают содержимое пробирки и оставляют пробирку на 10–12 минут при комнатной температуре. Затем центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость переносят в кювету. Фотометрируют при красном светофильтре, длина волны 630 нм, против воды. Производят и фотометрию исходного раствора красителя. Расчет ведется по формуле:

$$A = 100\% - (D_1 * 100\% / D_2),$$

где

D_1 – показатель оптической плотности после инкубации с эритроцитами, усл. ед.;

D_2 – оптическая плотность исходного красителя, усл. ед.;

A – сорбционная способность эритроцитов, % .

Оглавление

Введение	3
1. Инструкция по охране труда и технике безопасности при работе с биологическими материалами.....	5
1.1. Общие требования охраны труда	5
1.2. Требования охраны труда перед началом работы	6
1.3. Требования охраны труда во время работы	6
1.4. Требования охраны труда в аварийных ситуациях	9
1.5. Требования охраны труда по окончании работы	11
2. Техника взятия крови	12
2.1. Техника взятия крови у крыс	12
2.2. Техника взятия крови из пальца у человека.....	13
3. Подготовка к исследованию	16
3.1. Выбор и подготовка биоматериала к исследованию	16
3.2. Выделение плазмы и сыворотки из цельной крови, получение эритроцитов.....	20
3.3. Приготовление основных растворов.....	21
4. Правила работы с приборами	23
4.1. Правила работы на фотоэлектроколориметре КФК-2.....	23
4.2. Правила работы с фотоколориметром КФК-2МП.....	25
Порядок выполнения работы	26
4.3. Правила работы на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ.....	27
Порядок выполнения работы	28
5. Лабораторные работы.....	30
5.1. Определение концентрации глюкозы в сыворотке (плазме) крови энзиматическим колориметрическим методом.....	30

5.2. Определение концентрации пировиноградной кислоты в крови	31
5.3. Определение концентрации молочной кислоты (лактата) в плазме крови энзиматическим колориметрическим методом	34
5.4. Определение концентрации общего белка в сыворотке (плазме) крови биуретовым методом	35
5.5. Определение концентрации альбумина в сыворотке (плазме) крови унифицированным колориметрическим методом	37
5.6. Определение концентрации мочевины в плазме крови колориметрическим методом	38
5.7. Определение свободного аминного азота в сыворотке крови	41
5.8. Определение содержания креатинина и креатина в крови (метод Яффе)	43
5.9. Определение концентрации общих липидов в плазме крови колориметрическим методом.....	46
5.10. Методика определения липидных фракций в плазме крови и мембранах эритроцитов хроматографическим методом.....	48
5.11. Определение концентрации малонового диальдегида (МДА) в плазме крови колориметрическим методом	53
5.12. Определение малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в слюне	55
5.13. Определения МДА в тканях мозга	57
5.14. Определение общих липидов в гомогенате тканей мозга.....	58
5.15. Тонкослойная хроматография (ТСХ) липидов тканей мозга	59

5.16. Простой колориметрический микрометод определения свободных жирных кислот	61
5.17. Определение кортизола методом иммуноферментного анализа с помощью набора ДС–ИФА– Стероид–Кортизол.....	64
5.18. Иммуноферментное определение концентрации инсулина в сыворотке (плазме) крови человека	68
5.19. Количественное определение активности катала- зы крови (по Баху и Зубковой)	76
5.20. Спектрофотометрическое измерение активности каталазы (по Королюку М.А.)	77
5.21. Определение активности супероксиддисмутазы (СОД)	79
5.22. Количественное определение активности холинэстеразы сыворотки крови	80
5.23. Определение сиаловых кислот в плазме	82
5.24. Сорбционная способность эритроцитов (ССЭ) (по Тогайбаеву А.Я.).....	83

Учебное издание

Составители:

Мадера Елена Анатольевна
Шунайлова Надежда Юрьевна

Биохимия обменных процессов

Лабораторный практикум

Авторская редакция

Компьютерная верстка: Т.В. Опарина

Подписано в печать 12.02.2024. Формат 60 x 84 ¹/₁₆.

Усл. печ. л. 4,99. Уч. изд. л. 3,84.

Тираж 33 экз. Заказ № 263.

Издательский центр «Удмуртский университет»
426034, г. Ижевск, ул. Ломоносова, 4Б, каб. 021
Тел.: +7(3412)916-364, e-mail: editorial@udsu.ru

Типография Издательского центра
«Удмуртский университет»
426034, г. Ижевск, Университетская, 1, корп. 2
Тел. 68-57-18, 91-73-05