НОВОСИБИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Основы биохимического анализа

Методические разработки

к лабораторным работам

НОВОСИБИРСК 2019

УДК 577.1(07)
ББК28.902, я7
О-753

Кафедра физиологии и биохимии человека и животных

Составители: канд. биол. наук, доц. *О.С. Котлярова,*
аспирант *С.М. Чыдым*

Рецензент: д-р биол. наук, проф. *О.С. Короткевич*

Основы биохимического анализа: метод. указания/ Новосиб. гос. аграр. ун-т, Биол.-технол. фак.; сост.: О.С. Котлярова, С.М. Чыдым. – Новосибирск: ИЦ НГАУ «Золотой колос», 2019. – 79 с.

Методические разработки предназначены для проведения лабораторно-практических занятий по дисциплине «Основы биохимического анализа» очной формы обучения по направлению подготовки - 06.03.01 – Биология.

Утверждены и рекомендованы к изданию учебно-методическим советом биолого-технологического факультета (протокол №7 от 11 июня 2019 г.).

© Новосибирский ГАУ, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ..... 4

Раздел 1. Техника безопасности 6

Раздел 2. Лабораторно-практические занятия. 12

Тема 2. Отбор и подготовка образцов биологических жидкостей к биохимическим исследованиям. 20

Тема 3. Биохимический анализ крови. 22

Тема 4. Биохимические исследования молока. 31

Тема 5. Биохимические исследования мочи. 39

Тема 6. Биохимические исследования мяса и мышечной ткани. 48

Раздел 3. Тестовый промежуточный контроль. 51

ВВЕДЕНИЕ

В медицине и ветеринарии широко используются многочисленные общие клинические, гематологические, биохимические, биофизические, химико-токсикологические и другие методы исследования крови, мочи, молока, содержимого рубца, желудка, кишечника, печени, почек и т.д. Без этих методов немыслима общая оценка состояния обмена веществ, функций отдельных органов и систем, постановка диагноза, контроль за эффективностью лечения. Использование унифицированных методов также необходимо при выполнении научных исследований в области ветеринарии, зоотехнии и биологии.

Дисциплина Б.1.В.ОД.8. Основы биохимического анализа относится к вариативной части, обязательные дисциплины.

В результате изучения дисциплины студент должен:

- знать:

- о химической структуре и превращении молекул в живой материи, а также химические основы процессов жизнедеятельности всего организма.

- уметь:

-соблюдать технику безопасности при работе в лаборатории; оказывать первую помощь при несчастном случае; обрабатывать посуду; готовить реактивы для биохимических исследований; правильно интерпретировать результаты биохимических исследований, их ценность для комплексной диагностики состояния обмена веществ у животных;

-дать квалифицированные рекомендации по корректировке нарушения обмена веществ у животных; осуществлять подбор биохимических методов исследования белков, липидов, углеводов, минеральных веществ, ферментов и т.д.;

- владеть:

- навыками работы с приборами для биохимических анализов, расчетов результатов анализов; колориметрическими, рефрактометрическими, pH-метрическими и другими методиками исследования; навыками определения состояния обмена веществ по биохимическим показателям крови и мочи животных.

Дисциплина «Основы биохимического анализа» в соответствии с требованиями ФГОС ВО направлена на формирование следующих обще профессиональных и профессиональных компетенций:

1) Способность применять на практике знания принципов клеточной организации биологических объектов, биофизических и биохимических основ, мембранных процессов и молекулярных механизмов жизнедеятельности (ОПК-5);

2) Способность использовать современные экспериментальные методы работы с биологическими объектами в полевых и лабораторных условиях, навыки работы с современной аппаратурой (ОПК-6);

3) Способность эксплуатировать современную аппаратуру и оборудование для выполнения научно-исследовательских полевых и лабораторных биологических работ (ПК-1).

РАЗДЕЛ 1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Во время работы в лаборатории следует неукоснительно соблюдать правила техники безопасности. Каждый работающий должен быть полностью информирован о требованиях техники безопасности, принятых в лаборатории, и о местонахождении средств противопожарной безопасности и аптечки первой помощи. Результаты инструктажа заносятся в специальный журнал.

Важным элементом обеспечения безопасных условий работы является правильная организация труда студентов, рационализация работ.

Во время работы необходимо соблюдать правила личной гигиены.

Помещения лаборатории должны быть оборудованы специальными контейнерами для сбора мусора и производственных отходов. Утилизация отходов должна проводиться регулярно в соответствии со специальными требованиями по утилизации отходов.

В качестве спецодежды в лаборатории используются лабораторные халаты и перчатки.

Халаты должны быть достаточно длинными и застегиваться полностью, при этом быть закрытыми спереди. Рукава должны плотно охватывать запястья. Перчатки должны быть удобными и достаточно длинными.

Все химические вещества (реактивы), используемые в биохимической лаборатории, подразделяются на **8 групп хранения** в зависимости от степени их опасности. Особенности правил работы с определенными реактивами и требования к их хранению зависят от отнесения вещества к той или иной группе хранения.

Не допускается совместное хранение химических веществ (реактивов), способных к активному взаимодействию друг с другом.

Ядовитые и сильнодействующие вещества (включая лекарственные препараты списков А и Б) следует хранить в сейфе или специальном шкафу под замком и пломбой.

Вся посуда, содержащая реактивы и готовые реагенты, должна быть маркирована соответствующими этикетками.

Нельзя хранить химические вещества (материалы) и готовые реагенты в таре без этикеток. Если этикетка утеряна, а идентифицировать содержимое не представляется возможным, содержимое подлежит уничтожению в соответствии с требованиями правил утилизации химических веществ (материалов).

Сосуды с химическими веществами, обладающими потенциально опасными свойствами, должны в обязательном порядке содержать маркировку в соответствии с требованиями ГОСТ.

ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТ

Не рекомендуется работать в лаборатории в одиночку, поскольку при несчастном случае некому будет оказать помощь пострадавшему и ликвидировать последствия возможной аварии.

Перед началом работ необходимо проверить исправность оборудования, вентиляции, газовой сети, водопровода, системы электропитания. В случае выявления неисправностей, создающих повышенную опасность, работу в лаборатории запрещается проводить до их устранения.

ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ВО ВРЕМЯ РАБОТЫ

Во время работы следует соблюдать порядок, чистоту и аккуратность, чтобы максимально избежать воздействия вредных и потенциально опасных факторов.

Работы в лаборатории должны проводиться в спецодежде, а при необходимости - с использованием соответствующих индивидуальных средств защиты.

В лаборатории запрещается пробовать на вкус любые реактивы и расходные материалы, пить, есть и курить.

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

Все работы можно проводить только в чистой посуде, не содержащей даже следовых количеств предыдущей анализируемой пробы или каких-либо

реагентов. Использованную посуду нужно сразу после проведения анализов мыть или складывать в специально отведенном месте для грязной посуды во избежание повторного использования.

Во время нагревания жидких и твердых веществ в пробирках и колбах нельзя направлять отверстие пробирки или колбы на себя или других людей. Нельзя заглядывать сверху в нагреваемые сосуды во избежание возможных травм при выбросе горячей массы из сосуда.

При эксплуатации приборов и аппаратов следует руководствоваться инструкциями и правилами, изложенными в техническом паспорте и руководстве по эксплуатации.

В процессе эксплуатации аппаратуры должна быть исключена возможность ее падения. Запрещается прикасаться к движущимся и вращающимся частям используемого оборудования.

Все электрические приборы должны быть заземлены, если отсутствие заземления не предусмотрено их конструкцией. По возможности следует избегать использования удлинителей.

Электроплитки, муфельные печи и другие электронагревательные приборы должны размещаться на термоизолирующем материале.

Недопустимо оставлять во включенном состоянии без присмотра электронагревательные приборы, за исключением приборов, предназначенных для круглосуточной работы.

Сосуды с любыми веществами и реагентами следует брать одной рукой за горлышко, а другой аккуратно поддерживать за дно.

Пролитые жидкие вещества (реагенты), обладающие опасными свойствами, следует немедленно нейтрализовать, посуду тщательно обезвредить и очистить, запачканную одежду - обезвредить и передать в стирку.

При использовании для дозирования жидких реактивов пипеток категорически запрещается затягивать в них реактивы ртом.

Категорически запрещается уже отмеренные реактивы сливать (высыпать) обратно в сосуды, из которых их отмеряли.

Легковоспламеняющиеся вещества запрещается помещать в термостат.

При работе с едкими веществами необходимо пользоваться индивидуальными средствами защиты (перчатки, защитные очки). Запрещается приливать воду к кислоте.

При работе с едкими и летучими веществами запрещается пользоваться контактными линзами.

При пролитии едких веществ следует немедленно засыпать пролитое вещество сухим песком, удалить его, а место, где пролилось вещество, тщательно промыть водой.

Запрещается выливать ртуть в канализацию. Для сбора ртути следует использовать стеклянную толстостенную банку с водой, закрывающуюся резиновой пробкой. Пролитую ртуть собирают с помощью стеклянной ловушки с резиновой грушей, а ее мельчайшие капельки - ветошью, смоченной 0,1%-м раствором $KMnO_4$, слегка подкисленным HCl. После этого поверхность обрабатывают 20%-м водным раствором $FeCl_3$ и промывают водой.

При работе необходимо придерживаться следующих общих правил:

- в лаборатории следует соблюдать чистоту и порядок; изучить по справочникам используемые в лаборатории вещества, обращая особое внимание на безопасность, ядовитость, возможность образования взрывчатых смесей с другими веществами;
- анализы, связанные с применением концентрированных кислот и щелочей, а также с выделением вредных, ядовитых, огнеопасных газов, паров, с образованием мелких кусочков веществ, разбрызгиванием жидкости, надо выполнять в вытяжном шкафу, а в некоторых случаях – в защитных очках, фартуках и нарукавниках;
- работу с легковоспламеняющимися и взрывоопасными веществами (бензин, бензол, сероуглерод, ацетон, диэтиловый спирт и др.) проводить в

вытяжном шкафу, вдали от огня и включенных нагревательных приборов (если нужно использовать водяную баню, то ее предварительно нагревают в другом месте, применяют также электроплитку со скрытыми нагревательными элементами); хранить их с толстостенных склянках, железных ящиках, выложенных асбестом; общий запас огнеопасных жидкостей в рабочем помещении лаборатории не должен превышать 2-3 л;

- концентрированные и ядовитые жидкости не набирать в пипетку ртом, а пользоваться резиновой грушей или пипеткой с баллоном; при переливании их из больших бутылей в меньшие сосуды применять сифоны;
- не бросать в раковину бумагу, твердые вещества, не выливать в нее остатки кислот, щелочей, огнеопасных и сильнопахнущих жидкостей; собирать их в специальные толстостенные, плотно закрывающиеся склянки;
- не нагревать закупоренные сосуды и аппараты, кроме специально для этого предназначенных;
- соблюдать особую осторожность при работе со сжатыми газами (водородом, кислород, хлором, метаном, ацетиленом, аммиаком и др.); предохранять баллоны от падения, ударов, толчков, нагревания; перекрывать баллоны осторожно, вручную, в наклонном положении;
- при работе с вакуумом надевать защитные очки; при проведении работ в вакууме не применять плоскодонных колб – они будут раздавлены;
- все химические реактивы хранить только в соответствующей посуде с этикетками и ясными надписями, а разлагающиеся на свету реактивы ($AgNO_3$ и др.) – в темной посуде;
- соблюдать крайнюю осторожность при вскрытии склянок с реактивами, остерегаться повреждения склянок; если притертая стеклянная пробка сидит плотно, то горлышко сосуда обертывают смоченным горячей водой полотенцем и осторожно постукивают по верхней части пробки деревянным предметом, извлекая ее; можно склянку перевернуть вверх дном и опустить горлышком в сосуд с водой или разбавленной соляной кислотой; стеклянные

краны, которые «заедает», открывают теми же приемами или же отмачивают несколько часов в 5%-м мыльном растворе.

Запрещается выливать в раковину концентрированные растворы щелочей и кислот, органические растворители, легковоспламеняющиеся, горючие и взрывоопасные вещества, щелочные металлы. Все указанные отходы должны обязательно собираться в специальные емкости.

ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ПО ОКОНЧАНИИ РАБОТЫ

По окончании работы необходимо проверить отключение электроприборов, закрытие газовых и водопроводных кранов.

Все химические вещества, представляющие опасность, должны быть убраны в места их постоянного хранения.

РАЗДЕЛ 2. ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Тема 1. АППАРАТУРНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Для биохимических исследований применяют приборы двух групп:

1) для оптических измерений (оптоэлектрические);

2) для электрохимических измерений.

Во всех случаях аппаратура, предназначенная для получения количественного результата, должна проходить метрологический контроль.

К приборам первой группы относятся приборы, применяемые для различных измерений:

- светопоглощения (адсорбция света) – колориметры, фотометры и спектрофотометры;

- флуоресценции – флуориметры и спектрофлуориметры (для определения концентрации сложных органических веществ, витаминов, гормонов и т.д., путем измерения интенсивности флуоресценции);

- оптической активности растворов (вращение плоскости поляризации света) – пламенные фотометры (для изучения интенсивности светоизлучения (эмиссии) внесенных в пламя ионов металла);

- поглощения света раскаленными газами – атомные абсорбциометры (используются для измерения концентрации макро- и микроэлементов);

- светорассеяния (мутные суспензии и эмульсии) – нефелометры, турбидиметры (для содержания взвешенных частиц в объеме жидкости).

К приборам второй группы относятся:

- различные типы потенциометров, включая pH-метры;

- полярографы;

- приборы для измерения показателей кислотно-щелочного состояния;

- группа устройств (датчиков с терминалами) для непрерывного контроля таких параметров внутренней среды организма, как концентрация кислорода или глюкозы и т.д.

Отдельной группой стоят более сложные приборы, совмещающие две функции: препаративную и измерительную. К таким аппаратам относятся хроматографы и приборы для электрофореза.

Во многих лабораторных измерительных устройствах имеются приспособления для облегчения работы лаборанта. В некоторых из них эти устройства доведены до уровня *автоматических анализаторов*. Последние могут быть непрерывными и дискретными. Непрерывный автоматический анализатор обрабатывает все пробы, как на конвейере, дискретный – сериями. В обоих случаях автоматические анализаторы оборудованы компьютерами.

Колориметры, спектрофотометры и турбидиметры работают по одинаковому принципу – принципу фотометрии: сравнении интенсивности падающего на кювету света с измеряемым образцом (раствором, суспензией, эмульсией) с интенсивностью света, прошедшего через кювету. В нефелометрах используются сравнения интенсивностей падающего и рассеянного («вбок», впоследствие эффекта Тиндаля) света. Для сравнения используют либо отношения интенсивностей, либо десятичный логарифм их отношения. Современные фотометры могут быть предназначены как для работы в области видимой части ОП – оптического спектра (400-700 нм), так и для УФ - ультрафиолетовой (200-400 нм) и ИК – инфракрасной (700-3000 нм).

1.1. КОЛОРИМЕТРЫ



Рис. 1. Фотоколориметр

Наиболее просты по конструкции и правилам эксплуатации колориметры – приборы, предназначенные для измерения интенсивности окраски растворов и решения некоторых близких задач (рис. 1). При фотометрировании цветных растворов в диапазоне оптических плотностей, не превышающих 2 (иногда 0,4), оптическая

плотность прямо пропорциональна концентрации окрашивающего растворы вещества.



Рис.2. Концентрационный фотоколориметр

Во всех современных колориметрах используется фотоэлектрическая регистрация интенсивности света, прошедшего через кювету с образцом, поэтому их называют фотоэлектроколориметрами (ФЭК) или концентрационными фотоколориметрами (КФК) (рис. 2). В большинстве случаев фотоэлектроколориметры оборудованы комплексом сменных светофильтров, что позволяет производить измерения в широком диапазоне фиксированных значений длин волн света, падающего на кювету с образцом. Возможность выделения нужного участка спектра в некоторых колориметрах решена путем использования широкополосных светофильтров, в других – узкополосных - интерференционных (10-20 нм).

1.2. СПЕКТРОФОТОМЕТРЫ

Спектрофотометрия применяется не только для количественных измерений, но и для качественного анализа (рис. 3). Во многих случаях для аналитических целей необходимо установить точное положение максимумов и минимумов в спектре поглощения. В спектрофотометре нужные участки спектра выделяются при помощи поворота специальных стеклянных призм, кварцевых призм, вогнутых зеркал или дифракционных решеток, поэтому можно устанавливать любую длину волны в заданном диапазоне. Многие спектрофотометры оснащены графической регистрацией. В этих случаях предусмотрено плавное автоматическое изменение длины волны. Как правило, такие приборы позволяют полностью автоматически регулировать спектры поглощения либо на диаграммной ленте, либо на экране монитора компьютера.



Рис. 3. Спектрофотометр

1.3. ФЛЮОРИМЕТРЫ (ЛЮМИНОМЕТРЫ)



Рис. 4. Флюориметр

Принцип работы флюориметров основан на измерении величины люминесценции – интенсивности излучения некоторых веществ вследствие возбуждения под действием света определенной длины волны, причем длина волны возбуждающего света всегда короче длины волны света излучаемого (рис. 4). Поэтому для возбуждения в люминометрах используют различные источники ультрафиолетового излучения, как правило, достаточно мощные. Свет от источника ультрафиолетового излучения с помощью специальных линз фокусируется на кювете с исследуемым веществом и возбуждает флуоресценцию в растворе, которая с помощью специальных линз фокусируется на фотодетектирующем устройстве. Благодаря работе фотодетектора происходит пропорциональное преобразование светового сигнала в электрический.

Область применения приборов довольно широкая – от биохимических аналитических (витаминов, гормонов, ферментов) до микробиологических (определение концентрации микробных тел, связанных с мечеными флуоресцеином антителами) и иммунологических исследований.

1.4. ПЛАМЕННЫЕ ФОТОМЕТРЫ


Рис. 5. Пламенный фотометр

Применяются при количественном элементном анализе (рис. 5). Принцип работы пламенных фотометров основан на изучении окраски пламени при внесении в пламя горелки исследуемого вещества в виде аэрозоля. Окраска пламени, точнее, изменение окраски, обусловлено излучением, сопровождающим переход атомов распыленного в пламени вещества из более высокого энергетического состояния в более низкое. Молекулы

солей металлов, попадая в пламя, вследствие высокой температуры распадаются на отдельные ионы, электроны которых непрерывно переходят из одного энергетического состояния в другое, что сопровождается непрерывным излучением и поглощением света. Минимальная температура, необходимая для атомизации и возбуждения, зависит от природы исследуемого элемента, но довольно мало от состава соединения, в который этот элемент входит. Поэтому возможности метода пламенной фотометрии ограничиваются возможностями создания пламени высокой температуры. При сгорании бытового газа (метана) в воздухе метод позволяет определять содержание лишь легковозбудимых щелочных металлов – лития, калия, натрия. При переходе к высокотемпературному пламени, такому, как водород в кислороде или ацетилен в кислороде, возможности метода значительно расширяются.

Наиболее часто в клинических лабораториях пламенную фотометрию используют для определения содержания калия и натрия, тем более что обычные химические методы определения этих элементов сложны и неточны.

1.5. АТОМНО-АДСОРБЦИОННЫЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРЫ

Атомная абсорбциометрия используется для количественного определения содержания металлов в растворах (рис. 6). Принцип работы атомных абсорбциометров основан на поглощении ультрафиолетового или видимого излучения атомами газа. Для перевода образца растворенного вещества в газообразное состояние раствор впрыскивают в пламя. В качестве источника излучения применяют лампу с полым катодом из того же металла, что и определяется в данный момент. Спектральная ширина линии, испускаемая источником света, как и линии поглощения того же самого элемента в пламени, порядка 0,001 нм, поэтому мешающее поглощение других присутствующих элементов практически исключено.

Температура пламени, как и в случае пламенной фотометрии, определяется горючей газовой смесью. При определении элементов,

образующих труднодиссоциирующие соединения (алюминий, бериллий, кремний, ванадий, молибден), используют высокотемпературное пламя (ацетилен – оксид азота). Для клинической лаборатории в большинстве случаев достаточно воздушно-пропанового пламени.



Рис. 6. Атомно-абсорбционная спектрофотометр

Фотометры для атомной абсорбции – высокочувствительные приборы, но для каждого определяемого элемента должна быть своя лампа, что конструктивно усложняет прибор.

Преимущество атомной абсорбциометрии перед традиционными методами анализа проявляется в полной мере в клинической лаборатории при определении таких микроэлементов, как медь, марганец, цинк, а также при токсикологических исследованиях при определении содержания ртути.

1.6. ПОЛЯРИМЕТРЫ



Рис.7. Поляриметр

Приборы этой группы применяются для поляриметрического анализа, основанного на измерении угла вращения плоскости поляризации луча света, прошедшего через оптически активную среду (рис. 7).

Многие вещества способны изменять плоскость поляризации поляризационного света, причем угол изменения плоскости поляризации бывает пропорционален концентрации этого вещества.

Поляриметры имеют источник света – поляризатор – прозрачную кристаллическую пластинку, пропускающую свет, поляризованный в определенной плоскости; устройство для кювет с анализируемым веществом и анализатор – вторую пластинку, пропускающую поляризационный свет, вращая которую, можно измерить угол смещения поляризации в луче света, прошедшем через раствор, по отношению к плоскости исходного луча.

Особое место занимают специализированные поляриметры - сахариметры, специально предназначенные для определения содержания сахаров в различных жидкостях. В лабораторной клинической практике широко применяется для анализа глюкозы в моче поляриметр МР - 1010, используемый для выявления фальсификации меда сахаром при ветеринарно-санитарной экспертизе.

1.7. РЕФРАКТОМЕТРЫ



Рис. 8. Рефрактометр Аббе

Рефрактометры предназначены для определения показателя преломления вещества. В наиболее распространенных среди них (за основу конструкции взяты рефрактометры Аббе и Пульфриха) луч света от зеркала попадает на призму из двух половинок, между которыми помещают слой исследуемого вещества (несколько капель) (рис. 8). Поле окуляра рефрактометра выглядит равномерно освещенным. Поворотом призмы достигается полное внутренне отражение света от поверхности раздела между нижней половиной призмы и анализируемым веществом, что наблюдается в окуляре появлением темного поля с резко очерченными границами.



Рис. 9. Рефрактометр ИРФ 470

После этого перекресток нитей в окуляре специальным микрометрическим винтом наводят на границу темного поля, делают отсчет значения *n* по шкале прибора. В зависимости от типа рефрактометра точность измерения показателя преломления может достигать от 0,0001 до 0,00001.

Часто данные рефрактометрического анализа используют в ветеринарно-санитарной экспертизе для определения натуральности молока (рис. 9). Метод основан на осаждении белков молока с последующим измерением показателя преломления молочной сыворотки, который зависит от кислотности молока и содержания в нем воды.

1.8. ПРИБОРЫ В ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Принцип действия физических приборов, используемых в иммунологии, как правило, базируется на изучении физических характеристик, складывающихся в результате взаимодействия антигена с иммуноглобулинами (и некоторых других реакций) макромолекулярных иммунных комплексов. Основной силой меняющихся в процессе реакции физической характеристики среды, в которой происходит образование иммунных комплексов, является ее светорассеивающая способность. Поэтому в современном иммунохимическом анализе большое распространение получили методы турбидиметрического и нефелометрического анализов. Оба метода позволяют количественно судить о мутности раствора: либо по количеству рассеянного света, либо по количеству прошедшего света; в первом случае говорят о нефелометрии, во втором – о турбидиметрии.



Рис. 10. Турбидиметрия

Турбидиметрическим методом анализа (турбидиметрией) называют метод, основанный на измерении интенсивности света, прошедшего через суспензию или эмульсию, т.е. через мутную среду (рис. 10). Интенсивность уменьшается вследствие рассеяния света.



Рис. 11. Нефелометрия

Нефелометрическим методом анализа (нефелометрией) называют метод, основанный на измерении интенсивности света, рассеянного мутной средой – суспензией или эмульсией (рис. 11). При отсутствии поглощения интенсивность рассеянного света пропорциональна числу дисперсных частиц.

Тема 2. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ К БИОХИМИЧЕСКИМ ИССЛЕДОВАНИЯМ

Анализ крови является наиболее распространенным методом лабораторного исследования. Наиболее широко используются общий и биохимический анализы крови, информативность которых в отражении состояния здоровья животного и динамики развития болезни очень велика.

Для общего анализа можно использовать периферическую, в том числе венозную, кровь. Небольшое количество крови для общего анализа берут из сосудов внутренней или наружной поверхности ушной раковины. У собак, кошек и пушных зверей кровь берут из латеральной подкожной вены предплечья или голени, лапки (пальца), кончика хвоста. Когда для анализа необходимо большое количество цельной крови, сыворотки или плазмы, кровь у крупного рогатого скота, лошадей, овец, коз берут из яремной вены, у свиней - из орбитального венозного синуса, у плотоядных - из вены конечностей.

У моногастричных животных кровь берут до кормления в утренние часы, у жвачных – утром через 4 ч после кормления. Время кормления существенно влияет на содержание в крови липидов, сахара, холестерина и некоторые

другие показатели. Чрезмерное возбуждение животного во время отбора проб крови (стресс) влияет на показатели кислотно-щелочного равновесия, сахара, многих гормонов, количество эозинофилов и лимфоцитов.

Для венозной крови необходимы следующие стабилизаторы: на 7-10 мл крови необходимо взять 2 капли 1%-го раствора гепарина или 3-4 капли раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты натриевой соли (ЭДТА натрия, трилон Б) или 15-20 мг натрия лимоннокислого или натрия щавелевокислого.

Для биохимического анализа кровь берут строго натощак из вены без антикоагулянтов, избегая гемолиза (набирают по стенке пробирки). Во многом биохимические показатели крови зависят от фармакологических препаратов, токсических веществ, испорченных кормов. Все эти факторы должны быть учтены при отборе проб крови.

В лабораторию пробы крови доставляют в день ее взятия.

В лабораторных условиях проводят исследования цельной крови, плазмы и сыворотки.

Цельную кровь подвергают гематологическому анализу, а также определяют содержание в ней сахара, кетоновых тел, меди, цинка, кобальта, марганца, селена и др.

В плазме крови определяют резервную щелочность, содержание натрия, калия, хлора, кальция, магния, мочевины, билирубина, креатинкиназы, витаминов А и С.

В сыворотке крови исследуют общий белок и его фракции, мочевину, мочевую кислоту, креатинин, свободные аминокислоты, липиды, холестерин, билирубин, кальций, фосфор, ферменты, белково-осадочные пробы и т.д.

Образцы мочи берут от животных в утренние часы при самопроизвольном или вызванном рефлекторно специальными приемами мочеиспускании. В редких случаях делают катетеризацию мочевого пузыря. Посуда для сбора мочи должна быть чистой. У пушных зверей при клеточном их содержании

мочу собирают в подвешенные под клетку чистые эмалированные кюветы. Для уменьшения степени ее загрязнения кюветы покрывают марлей.

Собранную мочу фильтруют. В некоторых случаях мочу консервируют раствором хлороформа (0,6 мл на 100 мл воды) – 2-3 мл на 10 мл мочи; тимолом – 1 кристаллик тимола на 100 мл мочи; жидкостью Мюллера – (10 г натрия сульфата, 25 г калия бихромата на 100 мл воды) – 1 мл на 20 мл мочи.

Анализ неконсервированной мочи проводят в течение 1,5 ч от момента ее взятия. Длительное стояние пробы мочи ведет к изменению физико-химических свойств, размножению бактерий и разрушению элементов осадка мочи. При исследовании уробилиногена мочу защищают от прямого солнечного света.

В образцах мочи не должно быть истечений из половых органов.

Пробы молока или молозива берут только из здоровых долей вымени, поэтому перед взятием образцов проводят диагностику на клинический и субклинический маститы.

Образцы молока берут из утреннего удоя, молозива – из первого, второго, третьего и последующих удоев. Отбирают среднюю пробу нужного объема, вносят в чистую склянку и закрывают пробкой. Пробы в термосе со льдом доставляют в лабораторию, где обрабатывают с учетом характера проводимого анализа.

Многие биохимические показатели определяют в обезжиренном молоке или молозиве. Молоко (молозиво) центрифугируют при 3000-4000 об/мин в течение 30 мин, после этого пробу ставят в морозильную камеру холодильника на 20-30 мин, затем через тонкую иглу со шприцем, не затрагивая слой жира, набирают нужное количество обезжиренного молока или молозива и проводят соответствующие исследования.

Тема 3. БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КРОВИ

Для оценки состояния белкового обмена, а также функций отдельных органов проводят определение в сыворотке крови общего белка и его фракций, мочевины, креатинина и других составляющих остаточного азота.

Для определения общего белка сыворотки крови используют методы сжигания (къельдалеметрические), рефрактометрические, спектрофотометрические и др. В лабораториях преимущественно пользуются рефрактометрическим и колориметрическим (биуретовым) методами. При определении белковых фракций сыворотки крови используют электрофоретические (на агаровом геле, в полиакриламидном геле, на бумаге, ацетате целлюлозы), турбидиметрические (высаливание нейтральными солями), седиментационные (разделение белков на фракции ультрацентрифугированием) методы и др.

В клинической практике для разделения белков пользуются чаще электрофоретическими и турбидиметрическими методами. При электрофорезе на бумаге или геле агарозы получают 5 основных фракций: альбумины, α_1-, α_2-, β- и γ-глобулины. Недостаток метода на бумаге – не совсем четкое разделение белковых фракций. Электрофорезом в агаре Дифко или агарозе получают более четкое разделение фракций белков. С помощью электрофореза на полиакриламидном геле можно получать около 30 фракций белка. Недостаток метода – трудность количественной оценки полученных фракций. Унифицированным признан метод электрофореза на ацетате целлюлозы.

Кроме того, можно пользоваться методами осаждения белков нейтральными солями с последующим турбидиметрическим измерением степени помутнения среды на ФЭК. Соотношение альбуминов и глобулинов определяют белково-осадочными пробами.

Лабораторная работа 1. **Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом**

В основу рефрактометрического метода анализа положено определение показателя (коэффициента) преломления исследуемого вещества – отношение синуса угла падения луча света к синусу угла его преломления. В сыворотке крови величина рефракции в первую очередь зависит от количества белков.

Реактивы: этиловый спирт.

Оборудование: рефрактометры ИРФ-4546, УРЛ, RL и др.

Ход определения. Предварительно верхнюю и нижнюю камеры протирают марлевой салфеткой, смоченной спиртом, и насухо – ватным тампоном. Поверхность призм должна быть чистой и сухой, от этого во многом зависит результат анализа.

Затем приступают к исследованию образцов крови. Автоматической или обычной пипеткой наносят на нижнюю призму 0,1 мл (2 капли) сыворотки крови. Камеру закрывают, окуляр зрительной трубы устанавливают на резкость. Дисперсию в окуляре зрительной трубы устраняют вращением винта лимба дисперсии.

Через окуляр по шкале отсчета показателя преломления дважды отсчитывают показатель преломления. Вычисляют среднее показание. Марлевой салфеткой удаляют с поверхности призм сыворотку, протирают поочередно ватными тампонами - сухим и смоченным спиртово-эфирной смесью до чистого сухого состояния. В случае использования стеклянной палочки ее после каждого образца сыворотки крови промывают и высушивают марлей. Затем исследуют следующую пробу.

Расчет. Содержание белка определяют по таблице с учетом величины показателя преломления рефрактометра (прил. 1). Если температура в камере во время исследования не соответствует 20^0С, то вводят поправку 0,0001 на каждый градус, в случае низкой температуры поправку вычитают. При более высокой прибавляют.

Примечание. Рефрактометрический метод дает ошибку в случаях использования сыворотки со следами гемолиза, содержащей много липидов, билирубина, а также сахара и мочевины. Недостаточное промывание линз между анализами приводит к контаминации последних и завышению результатов.

Клиническое значение. Белки крови выполняют различные функции: поддерживают постоянство онкотического давления, pH крови, играют важную роль в кровеобразовании крови, поддержании уровня катионов в

крови, образуют комплексы с углеводами, липидами, гормонами и другими веществами, обеспечивают иммунную защиту.

Альбумины и фибриноген крови образуются в печеночных клетках, глобулины – в клетках ретикуло-гистиоцитарной системы (РГС) костного мозга и ретикулогистиоцитарных (купферовых или звездчатых) клетках печени. Поэтому содержание сывороточных белков во многом зависит от состояния печени. При болезнях печени снижается синтез альбуминов и фибриногена, развивается протеинемия, нарушаются процессы обновления белков.

Снижение количества общего белка в сыворотке крови (гипопротеинемия) отмечается при длительном недокорме животных, алиментарной остеодистрофии, уровской болезни, гипокобальтозе, эндемическом зобе, хронических расстройствах желудочно-кишечного тракта, нефрите, нефрозе, циррозе печени, туберкулезе и других заболеваниях, при которых снижается аппетит и усвоение питательных веществ корма.

Повышение уровня общего белка в сыворотке крови (гиперпротеинемия) в условиях интенсивного животноводства встречается значительно чаще, чем гипопротеинемия. Оно бывает при белковом перекорме, кетозе, вторичной остеодистрофии, токсикозах и других болезнях, сопровождающихся дистрофией или воспалением печени. Повышение содержания общего белка в сыворотке крови в этих случаях идет за счет глобулиновых фракций при одновременном уменьшении концентрации альбуминов (приложение 1, 2).

Гиперпротеинемия бывает при тяжелых формах диареи, дегидратации организма, острых воспалительных процессах, флегмоне, сепсисе, пневмонии, бронхопневмонии и др.

Лабораторная работа 2. Количественное определение белковых фракций в сыворотке крови методом электрофореза в агаровом геле

Коллоидные частицы белка перемещаются в электрическом поле постоянного тока: в щелочной среде – к аноду, в кислой – к катоду. В

щелочной среде в электрическом поле наиболее быстро перемещаются альбумины, затем α_1-, α_2-, β- и γ-глобулины.

Реактивы: раствор агарозы В, 1%-й, гель в веронал-мединаловом буфере 1%-й, эфир петролейный.

Оборудование: предметные стекла размером 6×9 см, фотоэлектроколориметр (ФЭК) или спектрофотометр, электрофоретическая камера.

Ход определения. Изучаемую белковую смесь, чаще сыворотку крови, фракционируют в толще агаровой пластины (гель агара или агарозы) постоянным током.

В электрофоретической камере соединение электронных отсеков с электрофоретической пластиной осуществляют с помощью промежуточного блока, более чем на ¾ заполненного мезгой хроматографической бумаги, растертой в буфере, используемом в электронных отсеках. Сверху мезга заливается гелем агара или агарозы.

На обезжиренные стекла размером 6×9 см, помещенные на строго горизонтальный манипуляционный столик, наслаивают из пипетки 8 мл расплавленного в водяной бане 1%-го геля в мединаловом буфере. В затвердевшем геле штампом пробивают стартовые лунки. После удаления геля из лунок тонким капилляром пастеровских пипеток вносят сыворотку крови или другую белковую смесь. Пластинку с внесенными пробами помещают в электрофоретическую камеру. Для осуществления контакта геля пластинки и электронных блоков между ними наслаивают дополнительное количество расплавленного геля. Затеем в электрофоретический отсек, в качестве хладогента наливают петролейный эфир на 1-1,5 см выше уровня пластинки.

Анодный электрод камеры должен быть выполнен из платиновой проволоки (сечение 0,1-0,5 мм), а катодный – как из платины, так и других металлов, не окисляющихся при обычных условиях.

Электрофорез проводят при градиенте потенциала 5 V/см в течение 2 ч. Для визуального контроля за анодным фронтом миграции в одну из лунок

вносят раствор альбумина или сыворотки крови, подкрашенный синькой Эванса.

После завершения электрофореза агаровые пластины отмывают 2%-м раствором уксусной кислоты. После этого пластины обертывают влажной фильтровальной бумагой и помещают в кювету на сутки.

Затем, смочив фильтровальную бумагу водой, очищают поверхность геля, после чего пластины окрашивают 1%-м раствором амидошварца в ацетатном буфере в течение 1,5-2 ч. Окрашенные пластины отмывают от излишков краски 2%-м раствором уксусной кислоты в течение часа.

Белковые фракции сразу же после обсыхания пластин снимают лезвием и краску элюируют 0,2 М раствором NaCl. Интенсивность окраски замеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре.

Расчет относительного и абсолютного содержания белковых фракций производят по общепринятой методике.

Клиническое значение. Альбумин – простой низкомолекулярный белок (40-70 тыс. дальтон), синтезируется в печени. Основные его функции – связывание воды, обеспечение коллоидно-осмотического (онкотического) давления, транспорт ионов магния, кальция, билирубина, СЖК, стероидных гормонов и других веществ эндогенного и экзогенного происхождения.

Снижение содержания альбумина (гипоальбуминемия) наблюдается при уменьшении его синтеза, обусловленного поражением печени (гепатит, гепатоз, цирроз, амилоидоз печени), острой и хронической пневмонией, бронхопневмонией, лейкозом и др.; при недостатке протеина в кормах, плохом его усвоении, больших потерях с мочой (алиментарная дистрофия, гипокобальтоз, диарея до наступления обезвоживания).

Увеличение содержания альбуминов (гиперальбуминемия) встречается очень редко и чаще связано с дегидратацией организма.

Из α_1-глобулинов в сыворотке крови обнаруживают два белка: α_1-антитрипсин и α_1-гликопротеин. Первый из них, α_1-антитрипсин, – ингибитор ряда протеаз. Его содержание повышается при механическом повреждении

тканей и воспалительных заболеваний. Второй - α_1-гликопротеин - участвует в транспорте прогестерона и тестостерона. Содержание его возрастает при воспалительных процессах, снижается при циррозе печени.

α_2-Глобулины содержат α_2-макроглобин, гаптоглобин и церулоплазмин. α_2-Макроглобин – цинкосодержащий гликопротеин с большой молекулярной массой. Ингибирует протеолитические ферменты трипсин, химотрипсин, тромбин, плазмин и калликреин. Содержание его увеличивается при циррозе печени, нефрозе, сахарном диабете и снижается при ревматоидном полиартрите.

Гаптоглобин связывает и транспортирует свободный гемоглобин А в клетки ретикулоэндотелия. Содержание его снижается при гепатите, гемолитической анемии и увеличивается при острых воспалительных процессах, сахарном диабете.

Церулоплазмин – медьсодержащий белок, окисляет трехвалентное железо в двухвалентное. Уровень его растет при остром воспалительном процессе, холестазе, ревматоидном артрите и снижается при циррозе печени, хроническом гепатите.

Содержание α_2-глобулинов в крови здоровых животных незначительное.

β-Глобулины содержат два белка – трансферрин и гемопексин. Трансферрин участвует в транспорте трехвалентного железа, его содержание снижается при воспалительных процессах. Гемопексин переносит сывороточный гем. Уровень его падает при гемолитической анемии, заболеваниях печени, нефротическом синдроме и повышается при воспалительном процессе.

γ-Глобулины – иммунные белки. Уровень их повышается при инфекционном воспалительном процессе, а также за счет патологических белков - парапротеинов, относящихся к иммуноглобулинам. Увеличение содержания γ-глобулинов, умеренное повышение уровня β-глобулинов при заметном снижении альбуминов присуще гепатиту, токсическому гепатозу,

лейкемии, злокачественным новообразованиям, воспалению легких и бронхов.

Снижение γ-глобулинов отмечают у новорожденных животных при физиологической незрелости иммунной системы, иммунных дефицитах. Гипогаммаглобинемию отмечают при белковом недокорме, истощении, воздействии на организм радиации.

Выраженное увеличение количества α-глобулинов с умеренным снижением альбуминов характерно для поздней стадии пневмонии, хронического эндокардита, холецистита, уроцистита, токсикозов беременности.

Повышение уровня α_2 и β-глобулинов при значительном снижении количества γ-глобулинов бывает при липоидном и амилоидном нефрозе, нефрите, нефросклерозе, токсикозе беременности, кахексии, злокачественных новообразованиях.

Значительное увеличение содержания γ-глобулинов, умеренное увеличение β-глобулинов при заметном снижении количества альбуминов присуще гепатитам, токсическому гепатозу, кетозу, гемолитическим процессам, лейкемиям и злокачественным новообразованиям в кроветворной системе.

При циррозе печени, коллагенозе и некоторых других болезнях наблюдают значительное снижение содержания альбуминов и заметное увеличение γ-глобулинов. Для механической желтухи характерно уменьшение уровня альбуминов и умеренное увеличение содержания α_2-, β- и γ-глобулинов (приложение 3).

Лабораторная работа 3. **Определение белковых фракций в сыворотке крови нефелометрическим методом**

Отдельные фракции белка способны осаждаться фосфатными растворами определенной концентрации.

Реактивы. Основной фосфатный раствор (33,5 г едкого натра растворяют в 400 мл дистиллированной води, добавляют 226,8 г фосфорнокислого калия однозамещенного. После растворения охлаждают до комнатной температуры и добавляют дистиллированную воду до объема 500 мл).

Рабочие фосфатные растворы. Из основного раствора берут в мерные колбы на 100 мл: 92,4 мл (№ 1), 74,9 мл (№ 2), 58,8 мл (№ 3), 48,7 мл (№ 4) и доводят дистиллированной водой до метки, тщательно размешивают путем встряхивания. При хранении добавляют по 1 капле хлороформа на 100 мл раствора.

Оборудование: фотоэлектроколориметр.

Ход определения. Устанавливают в штативе 6 пробирок на каждую пробу, обозначив их цифрами 0, 1, 2, 3, 4, 5. В пробирку № 0 вносят 10 мл дистиллированной воды, в пробирки №1,2,3,4 – по 5 мл соответствующих рабочих фосфатных растворов.

В пробирку № 5 вносят 0,5 мл сыворотки крови, 0,75 мл дистиллированной воды и 3,75 мл основного фосфатного раствора, закрывают пробкой и перемешивают путем перевертывания ее 5-6 раз, после чего переносят по 0,5 мл смеси в пробирки № 1, 2, 3, 4 и 1 мл в пробирку №0.

Содержимое пробирок тщательно, но осторожно перемешивают, избегая образования пузырьков воздуха, и через 15 мин определяют оптическую плотность (ОП) растворов в пробирках 1, 2, 3, 4 против контроля (№ 0) на ФЭК при красном светофильтре в кювете шириной 1 см. Измерения оптической плотности проводят в обратной последовательности, сначала в пробирке № 4, а затем в пробирках № 3, 2 и 1.

Расчет результатов. Расчет производится по схеме:

ОП пробирка №1 - ОП пробирка №2 = ОП альбуминов.

ОП пробирка №2 - ОП пробирка №3 = ОП α - глобулинов.

ОП пробирка №3 - ОП пробирка №4 = ОП β - глобулинов.

ОП пробирка №4 – ОП γ - глобулинов.

Принимая сумму ОП альбуминов и всех глобулиновых фракций за 100%, вычисляют содержание каждой фракции в относительных процентах. Зная концентрацию общего белка, можно произвести расчет в абсолютных величинах.

Пример расчета:

ОП пробирка №1 =0,800; ОП пробирка №2 = 0,400;

ОП пробирка №3 = 0,300; ОП пробирка №4 = 0,200;

тогда ОП альбуминов = 0,800 – 0,400 = 0,400;

ОП α - глобулинов = 0,400 – 0,300 = 0,100;

ОП β - глобулинов = 0,300 – 0,200 = 0,100;

ОП γ - глобулинов = 0,200;

относительный % альбуминов = 0,400·100/0,800 = 50%;

α - глобулинов = 0,100*100/0,800 = 12,5%;

β - глобулинов = 0,100*100/0,800 = 12,5%;

γ - глобулинов = 0,200*100/0,800 = 25%.

Ошибка метода. Ошибка метода составляет 74%.

Тема 4. Биохимические исследования молока.

Молоко - полноценный и полезный продукт питания. Оно содержит все необходимые для жизни питательные вещества, нужные для построения организма. Естественное назначение молока в природе заключается в обеспечении питанием молодого организма после рождения. Состав молока различных млекопитающих в целом определяется теми условиями окружающей среды, в которых происходит рост молодого организма.

Лабораторная работа 1. Определение титруемой кислотности молока (молозива) по Тернеру

Реактивы. 0,1 моль/л раствор натрия (калия) гидроксида (4 г NaOH или 5,6 г KOH растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл); 1%

раствор фенолфталеина (1 г фенолфталеина растворяют в 70 мл 96% этилового спирта и доводят объем водой до 100 мл).

Оборудование: бюретка, колба или стакан на 50-100 мл, мерные колбы, пипетки на 10 и 25 мл.

Ход определения. Отбирают среднюю порцию молока. В колбу или стакан на 50-100 мл вносят 10 мл молока (молозива), 20 мл дистиллированной воды и 3 капли 1%-го раствора фенолфталеина, перемешивают и титруют из бюретки 0,1 моль/л раствором натрия (калия) гидроксида до появления не исчезающего в течение 30 с розового окрашивания.

Расчет ведут по формуле

$x = A \cdot 10$,

где x – кислотность молока (молозива), ^{0}Т, что равно числу милллиметров 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида, затраченного на нейтрализацию кислотности 100 мл молока (молозива);

A – количество 0,1 моль/л раствора натрия (калия) гидроксида, пошедшего на титрование 10 мл молока (молозива), мл; 10 – коэффициент для пересчета кислотности в 100 мл молока (молозива).

Клиническое значение. Титруемая кислотность молока (молозива) обусловлена кислотным характером казеина, наличием в нем фосфорнокислых, лимоннокислых солей и растворенного углекислого газа.

У коров, содержащихся на полноценных рационах, кислотность молозива 1-го удоя равна 45-55 ^{0}Т, 1-го дня – 39 ^{0}Т, 2-го дня – 33 ^{0}Т, 3-го дня – 27,3 ^{0}Т, 7-го дня – 19,5 ^{0}Т. Низкая кислотность молозива свидетельствует о неполноценном кормлении животных, скармливание такого молозива способствует развитию диспепсии у новорожденных телят.

Кислотность свежего молока буйволицы – 18,7 ^{0}Т, зебу – 19,5 ^{0}Т, верблюдицы – 17,2 ^{0}Т, ослицы – 6 ^{0}Т. Этот показатель в основном характеризует свежесть молока, однако при ацидотическом состоянии у животных кислотность молока может повышаться. Титруемая кислотность

молока в начале лактации может составлять 20 ^{0}Т, постепенно снижаясь в последнем месяце до 12-14 ^{0}Т и ниже.

Лабораторная работа 2. **Определение ацетоновых тел в молоке реактивом Лестрада**

Реактивы: реактив Лестрада (1 г натрия нитропруссида, 20 г аммония сернокислого, 20 г натрия углекислого безводного тщательно измельчают в фарфоровой ступке. Хранят в закрытых балках из темного стекла. При длительном хранения активность реактива снижается).

Ход определения. На фильтровальную бумагу наносят на кончике скальпеля реактив Лестрада и смачивают его 2-3 каплями молока.

Появление через 0,5-1,0 мин сиреневого или розового окрашивания свидетельствует о наличии ацетоновых тел (ацетона и ацетоуксуоной кислоты) в молоке выше 10 мг%. Чем интенсивнее окраска смеси, тем выше концентрация ацетоновых тал в молоке. У здоровых коров она не превышает 8 мг/%.

Таблица 1. Оценка молока по реакции на кетоновые тела

Показатели реакции с молоком по Марковой и др.	Оценка реакции
Слабо-розовая окраска	+ слабоположительная реакция
Ярко-розовая окраска	++ положительная реакция
Пурпурная окраска	+++ резко положительная реакция

Клиническое значение. Под кетозом понимают глубокие нарушения обмена веществ, характеризующиеся повышенным образованием и резким увеличением содержания кетоновых тел в крови, моче и молоке, снижением количества сахара в крови и ацидозом.

Кетоновые тела, выделяемые больными животными, проникают через плаценту и нарушают нормальное развитие плода.

Кетозом болеет в основном крупный рогатый скот, но могут поражаться и другие виды животных: мелкий рогатый скот, свиньи, норки.

Лабораторная работа 3. Концентрация водородных ионов (pH)

Проба с бромтимоловым синим

Концентрацию водородных ионов (pH) определяют с помощью приборов – pH-метров и различных индикаторов.

Реактивы: раствор бромтимола *(*0,5 г бромтимола растворяют в 50 мл этилового спирта и добавляют 50 мл дистиллированной воды).

Ход определения. На поверхность предметного стекла наносят 1 каплю исследуемого молока и добавляют 1 каплю раствора бромтимолового синего. Учитывают цвет смеси.

Оценка результатов:

желтый, желто-зеленый - pH молока 6,3-6,8;

беловато-желтый, белый - pH молока меньше 6,3;

зеленый, синий - pH молока щелочная, больше 6,8.

Клиническое значение. Активная кислотность выражается величиной pH. Она характеризует концентрацию свободных водородных ионов (активность) в молоке и численно равна отрицательному десятичному логарифму концентрации водородных ионов (H^+), выраженной в молях на 1 л.

Величина pH цельного молока составляет в среднем 6,7-6,5 и колеблется в пределах от 6,3 до 6,9, что свидетельствует о слабокислой реакции.

Показатель pH имеет большое значение, так как от него зависят стабильность полидисперсной системы молока, условия роста микрофлоры и ее влияние на процессы созревания сыра, быстрота образования компонентов, которые определяют вкус и запах молочных продуктов, термо-устойчивость

белков молока, активность ферментов. По величине pH оценивается качество сырого молока и молочных продуктов.

Кислотная диссоциация белков незначительна, поэтому концентрация ионов водорода остается постоянной, в то время как титруемая кислотность повышается, поскольку при ее определении в реакцию со щелочью вступают как активные, так и связанные ионы водорода.

Лабораторная работа 4. **Проба на предварительное нагревание молока.**

Реактивы: йодокалиевый крахмал (3 г крахмала смешивают с небольшим количеством холодной дестиллированной воды до образования однородной мути и к этой массе при постоянном помешивании прибавляют небольшими порциями 100 мл кипящей воды. В полученной однородной жидкости, не содержащей комков, растворяют 3 г кристаллического йодистого калия).

Ход определения. Для проверки наличия предварительного нагревания иногда ставят пробы с заведомо кипячёным молоком, которое при этом не должно давать окраски.

Около 2 мл молока взбалтывают с 5 каплями раствора йодкалиевого крахмала, затем прибавляют 1 каплю 2%-го раствора перекиси водорода и полученную смесь взбалтывают. Сырое молоко при этом очень быстро даёт темно-голубое окрашивание, нагретое свыше 80° остаётся без изменения в цвете.

Лабораторная работа 5. **Проба на редуктазу**

Реакция основана на том, что в молоке всегда содержатся в значительном количестве микробы, выделяющие фермент редуктазу, восстанавливающую (следовательно, обесцвечивающую) некоторые красящие вещества, например, метиленовый синий. Чем больше в молоке микроорганизмов, тем быстрее происходит обесцвечивание, поэтому

быстрота обесцвечивания в молоке метиленового синего служит показателем степени загрязнения молока микрофлорой.

Реактивы: водный раствор метиленового синего (на 195 мл воды добавляют 5 мл насыщенного спиртового раствора красителя).

Ход определения. В пробирку наливают 20 мл молока и 1 мл раствора метиленового синего; жидкости смешивают. Пробирку закрывают металлическим колпачком, резиновой пробкой или же в пробирку наливают 1—2 мл жидкого парафина. Затем пробирку ставят на водяную баню или в термостат при температуре 37—40°. Моментом окончания испытания на редуктазу считается полное обесцвечивание молока. Наличие окрашенного кольцевидного слоя в верхней части пробирки или наблюдаемая иногда окраска небольшой части молока внизу пробирки в расчёт не принимаются.

О практическом значении реакции на редуктазу существуют такие указания:

1) обесцвечивание не менее чем через 5 ч —число микробов менее I 500 тыс. в 1 мл;

2) обесцвечивание от 2 до 5 ч—число микробов от 500 тыс. до 4 млн в 1 мл;

3) обесцвечивание от 20 мин до 2 ч—число микробов от 4 до 20 млн в 1 мл;

4) обесцвечивание меньше чем за 20 мин —число микробов свыше 20 млн в 1 мл.

Лабораторная работа 6. **Определение массовой доли белка (казеина, СБ).**

Реактивы: 4%-й раствор $CaCl_2$, 10%-й раствор уксусной кислоты.

Оборудование: рефрактометр, водяная баня, набор пенициллиновых флаконов вместимостью 10 мл, плитка электрическая, пипетка вместимостью 5 мл, набор индикаторной бумаги,

Ход определения. После настройки прибора насухо его протирают и проводят 3 замера по молоку. Призмы промывают водой и насухо вытирают; приступают к приготовлению сывороток:

а) приготовление безбелковой сыворотки: в три пенициллиновых флакона пипеткой отмеряют по 5 мл молока, добавляют по 6 капель 4%-го раствора $CaCl_2$. Флаконы закрывают, содержимое перемешивают и помещают в водяную баню. Нагревают содержимое в течение 10 мин при кипящей бане. Для выделения сыворотки из образовавшегося сгустка флаконы энергично встряхивают. Анализируют на рефрактометре 2-3 капли полученной сыворотки не менее 3 раз;

б) приготовление безказеиновой сыворотки: в три пенициллиновых флакона пипеткой отмеряют по 5 мл молока и добавляют по 10 капель 10%-го раствора CH_3COOH. Проверяют pH раствора (4,6-4,7) индикаторной бумагой. Для выделения сыворотки из образовавшегося сгустка флаконы энергично встряхивают. Анализируют на рефрактометре 2…3 капли полученной сыворотки не менее 3 раз.

Расчет. Массовую долю белка молока (Б) определяют по формуле

$$Б = (Б_м - Б_с) = 9{,}3 - 5{,}2 = 4{,}1\%.$$

Массовую долю казеина (К) рассчитывают аналогично:

$$К = (Б_м - Б_к) = (9{,}3 - 7{,}15) \cdot 1{,}1012 = 2{,}4\%.$$

Лабораторная работа 7. **Определение массовой доли углеводов (лактозы)**

Метод основан на способности сыворотки (полученной из молока осаждением белков) преломлять проходящий через нее свет в зависимости от концентрации лактозы. Показатель преломления молочной сыворотки устанавливают по углу отклонения светового луча слоем сыворотки, заключенной между призмами рефрактометра.

Реактивы: молоко свежее, 4%-й раствор хлорида кальция.

Оборудование: рефрактометр ИРФ, водяная баня, набор пенициллиновых флаконов вместимостью 10 мл, плитка электрическая, пипетка вместимостью 5 мл, термометр.

Ход определения. Содержание лактозы в сыворотке определяют при помощи рефрактометра. Откидывают верхнюю призму, на поверхность нижней призмы быстро наносят несколько капель молочной сыворотки и верхнюю призму опускают. Глядя в окуляр, движением специальной рукоятки вверх и вниз совмещают границу между темной и светлой частями поля зрения с пунктирной линией (указателем). Если граница между темным и светлым полем неотчетливая (радужная), вращением винта компенсатора достигают резкости (монохроматичности). Показатель преломления молочной сыворотки отсчитывают по левой шкале (деление шкалы должно совпадать с пунктирной линией, совмещенной с границей темного и светлого полей) с точностью до 0,0001. Массовую долю лактозы в молоке находят, пользуясь таблицей.

Зависимость массовой доли лактозы от показателя преломления молочной сыворотки

Показатель преломления при 17,5°С	Массовая доля лактозы, %	Показатель преломления при 17,5 С	Массовая доля лактозы, %
1,3390	3,01	1,3411	4,03
1,3391	3,06	1,3412	4,08
1,3392	3,11	1,3413	4,13
1,3393	3,16	1,3414	4,18
1,3394	3,21	1,3415	4,23
1,3395	3,26	1,3416	4,28
1,3396	3,31	1,3417	4,33
1,3397	3,36	1,3418	4,38
1,3398	3,42	1,3419	4,44
1,3399	3,47	1,3420	4,49
1,3400	3,52	1,3421	4,54
1,3401	3,57	1,3422	4,59
1,3402	3,62	1,3423	4,64
1,3403	3,67	1,3424	4,69

1,3404	3,70	1,3425	4,74
1,3405	3,72	1,3426	4,79
1,3406	3,77	1,3427	4,84
1,3407	3,82	1,3428	4,89
1,3408	3,87	1,3429	4,96
1,3409	3,93	1,3430	5,00
1,3410	3,98	1,3431	5,05

Тема 5. Биохимические исследования мочи.

Исследование мочи – неотъемлемая часть комплекса методов при постановке диагноза и контроле за эффективностью лечения животных. В моче в ряде случаев изменения происходят раньше, чем в крови. Ее физические, химические, цитологические изменения отражают состояние не только мочевой системы, но и печени, сердца и других органов, а также кислотно-щелочного равновесия в организме.

Химическое исследование мочи включает определение ее реакции (pH), обнаружение и определение белка, глюкозы, уробилинов, кетоновых тел и других веществ.

Лабораторная работа 1. Определение pH мочи

Концентрация свободных H^+- ионов – показатель истинной реакции мочи – активной кислотности (pH).

Реактивы: универсальная индикаторная бумага

Ход определения. Определяют pH в свежеполученной моче с помощью с помощью универсальной индикаторной бумаги, тест-пластин или (точно) потенциометром (pH-метром). Некоторые фирмы выпускают индикаторную бумагу специальных видов, предназначенную для определения pH мочи в диапазоне от 5,0 до 8,0 или комбинированные экспресс-тесты (бумажные или пластиковые полоски), которые включают, кроме определения величины pH, несколько других показателей. Индикаторную бумагу или комбинированные экспресс-тесты (экспресс-полоски) смачивают мочой и немедленно

сравнивают появившуюся окраску со стандартной цветной шкалой. При использовании ионометра руководствуются соответствующей инструкцией.

При хранении pH мочи сдвигается в щелочную сторону из-за распада азотистых соединений, выделения аммиака, соединения его с водой и образования щелочи, а также распада клеточных элементов.

Клиническое значение. В норме pH мочи у крупного рогатого скота 7,0-8,6, у лошадей - 7,0-8,5, у овец и коз - 7,0-8,5, у свиней - 6,0-7,3, у собак и кошек - 5,0-6,5. У молодняка молочного периода pH мочи немного ниже, чем у взрослых.

Моча приобретает кислую реакцию при содержании животных на высококонцентрированных рационах, при ацидозе рубца, сахарном диабете, кетозе, хронической сердечной недостаточности, лихорадочных состояниях, миоглобинурии, остром гломерулонефрите, голодании, изнурительном поносе, почечной недостаточности, гипокалиемическом алкалозе (недостаток калия увеличивает секрецию H^+ - ионов почечными канальцами).

Мочу щелочной реакции регистрируют при алкалозе рубца, хронических инфекциях мочевыводящих путей вследствие бактериально-аммиачного брожения (цистит, уроцистит, пиелонефрит).

Лабораторная работа 2. **Обнаружение белка в моче и количественное его определение**

2.1. Проба с сульфосалициловой кислотой

Проба основана на коагуляции белка с кислотой.

Реактивы: 20%-й раствор сульфосалициловой кислоты.

Ход определения. В пробирку вносят 3-4 мл профильтрованной мочи и 5-6 капель 20%-го раствора сульфосалициловой кислоты. Появление хлопьев или помутнения в пробе указывает на наличие белка (положительная проба). Чувствительность пробы 0,015 г/л.

2.2. Кольцевая проба Геллера

Наличие белка в моче характеризуется ее помутнением или выпадением белого хлопьевидного осадка.

Реактивы: азотистая кислота концентрированная или реактив Ларионовой (насыщенный раствор хлорида натрия: 20-30 г соли растворяют в 100 мл воды при подогревании, дают отстояться до охлаждения; надосадочную жидкость сливают, фильтруют; к 99 мл фильтрата прибавляют 1 мл крепкой азотной кислоты; вместо азотной кислоты можно добавить 2 мл концентрированной соляной кислоты).

Ход определения. В пробирку наливают 1-1,5 мл азотной кислоты или реактив Ларионовой и пипеткой осторожно по стенке пробирки наслаивают мочу, стараясь не взбалтывать жидкость в пробирке. При наличии белка на границе двух жидкостей появляется белое кольцо. Беловатые кольца, появляющиеся выше границы наслоения, образуются за счет выпадения солей. Эти кольца исчезают при осторожном подогревании.

Проба с реактивом Ларионовой имеет ряд преимуществ: на границе наслоения не бывает пигментных колец, которые часто образуются при наслаивании мочи на азотную кислоту и мешают распознаванию белкового кольца; кольца получаются более четкие, чем с азотной кислотой; экономится азотная кислота; реактив более удобен в работе, попадая на ткань, не прожигает ее.

2.3. Определение белка методом Брадберга – Робертса – Стольникова

В основу метода положена кольцевая проба Геллера, заключающаяся в том, что на границе азотной кислоты и мочи при наличии белка происходит его коагуляция и появляется белое кольцо. Проба дает положительный результат при содержании белка выше 33 мг%. Ниже этой концентрации проба отрицательная.

Реактивы: 30%-й раствор азотной кислоты (относительная плотность 1,2) или реактив Ларионовой.

Ход определения. В пробирку вносят 1-2 мл азотной кислоты (или реактив Ларионовой) и осторожно по стенке пробирки наслаивают такое же количество профильтрованной мочи. Появление тонкого белого кольца на границе двух жидкостей между 2-й и 3-й мин указывает на наличие белка в концентрации 0,033 г/л. Если кольцо появляется раньше, чем через 2 мин после наслаивания, мочу разводят водой и повторяют исследование. Степень разведения подбирают в зависимости от вида кольца (ширины, компактности, времени появления): при нитевидном кольце, появившемся раньше 2 мин, мочу разводят в 2 раза, при широком – в 4 раза, при компактном – в 8 раз. Разведение подбирают так, чтобы при повторном наслаивании кольцо образовалось между 2-й и 3-й мин. Концентрацию белка находят путем умножения 0,033 на степень разведения.

Клиническое значение. Различают протеинурию преренальную, связанную с усиленным распадом белка тканей (паралитическая миоглобинурия), выраженным гемолизом (гемоспоридозные болезни, отравления гемолитическими ядами); ренальную, обусловленную патологией почек, которая разделяется на клубочковую и канальцевую; постренальную, связанную с патологией мочевыводящих путей.

Появление в моче большого количества белка обусловлено, прежде всего, повышением фильтрации белков через клубочковый капиллярный фильтр, а также снижением их канальцевой реабсорбции. Протеинурия, связанная с нарушением клубочковой проницаемости (клубочковая протеинурия), наблюдается при большинстве заболеваний почек – первичных и вторичных гломерулонефритах, вторичном амилоидозе почек, диабетическом гломерулосклерозе, тромбозе почечных вен, атеросклеротическом нефросклерозе. Временная, коротко протекающая протеинурия наблюдается при лихорадочных и острых токсических поражениях почек.

Длительная протеинурия характерна для хронического гломерулонефрита, вторичного амилоидоза почек; может наблюдаться месяцами и годами.

Функциональная протеинурия наблюдается при беременности, большой физической нагрузке, перегревании, переохлаждении, дегидратации, стрессе. Она связана с выявлением влияния этих факторов на почечную гемодинамику, в результате чего повышается проницаемость гломерулярных капилляров. Она исчезает после устранения причин, ее вызывающих. Канальцевая протеинурия – результат нарушения процессов реабсорбции белков первичной мочи (ультрафильтрата). Она характерна для хронических интерстициальных нефритов, вызванных отравлением солями свинца, ртути, острой почечной недостаточностью.

Смешанная протеинурия обусловлена сочетанием гломерулярных и тубулярных механизмов, имеющих место при гломерулонефритах, диабетической нефропатии, пиелонефрите и вторичном амилоидозе почек.

Инфраренальная (секреторная) протеинурия обусловлена повышенной секрецией разных белков клетками тубулярного эпителия, а также слизистой оболочкой и железами мочеполовых органов, наблюдаемой при пиелонефрите, интерстициальном нефрите, простатите. Протеинурия сочетается с патологическими изменениями осадка мочи.

Лабораторная работа 3. **Обнаружение и определение глюкозы в моче. Проба Гайнеса**

Метод основан на способности глюкозы восстанавливать в щелочной среде при нагревании гидрат оксида меди (синего цвета) в гидрат закиси меди (желтого цвета) и закись меди (красного цвета). Чтобы из гидрата оксида меди не образовался черный осадок оксида меди, к реактиву добавляют глицерин, который связывает гидрат оксида меди.

Реактивы: а) 13,3г меди сульфата ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) растворяют в 400мл дистиллированной воды; б) 50 г натрия (калия) гидроксида растворяют в 400 мл дистиллированной воды; в) 15 г глицерина растворяют в 200 мл дистиллированной воды. Растворы «а» и «б» смешивают и добавляют раствор «в». Реактив длительно сохраняется в холодильнике.

Ход определения. К 6-8 мл мочи прибавляют 20 капель реактива до появления голубоватой окраски, смешивают и нагревают верхнюю часть пробирки до начала кипения. Нижняя часть пробирки – контроль. При наличии глюкозы в верхней части пробирки в моче появляется желтая окраска.

Клиническое значение. В моче здоровых животных концентрация глюкозы ничтожно мала и обнаружить или определить ее невозможно. Повышение содержания глюкозы в моче (глюкозурия) отмечается при сахарном диабете, нарушении почечной фильтрации (почечная глюкозурия, «почечный диабет»), поражении печени, стрессах, гипертиреозе и многих других патологических состояниях. Наибольшее клиническое значение имеет контроль глюкозы в моче при диагностике и лечении сахарного диабета.

Лабораторная работа 4. Обнаружение билирубина. Проба Розина

Качественные реакции на билирубин основаны на превращении его в зеленый биливердин под воздействием окислителей (йод, азотная кислота и т.д.)

Реактивы: люголевский раствор (1 г йода, 2 г йодида калия и 300 мл дистиллированной воды) или 1%-й спиртовой раствор йода.

Ход определения. В пробирку наливают 4-5 мл мочи и осторожно по стенкам пробирки наслаивают раствор йода. Появление на границе между жидкостями зеленого кольца свидетельствует о наличии билирубина.

Клиническое значение. У здоровых животных билирубин в моче качественными пробами не обнаруживается. При заболеваниях печени и желчных путей в моче появляется билирубинглюкуронид (связанный с глюкуроновой кислотой билирубин – водорастворимый). Билирубинурию наблюдают при гепатите (паренхиматозная желтуха), застое желчи в желчном пузыре и желчных протоках – холестазе (желчно-каменная болезнь, холецистит). Так как несвязанный (непрямой) билирубин водонерастворимый и не проходит через почечный фильтр, то для гемолитической желтухи

(гемоспоридиозные болезни, отравления гемолитическими ядами) билирубинурия не характерна.

Лабораторная работа 5. **Обнаружение желчных кислот. Проба Петтенкофера**

Желчные кислоты при соединении с серной кислотой дают пурпурно-красное окрашивание.

Реактивы: 10%-й раствор сахара, концентрированная серная кислота.

Ход определения. К 10 мл мочи добавляют небольшое количество сахара и взбалтывают до образования пены. Затем по каплям добавляют концентрированную серную кислоту. При наличии желчных кислот пена становится пурпурно-красной.

Клиническое значение. В нормальной моче содержится минимальное количество желчных кислот. При механической желтухе оно постоянно повышено; часто отмечается увеличение его и при паренхиматозной желтухе. При гемолитической желтухе количество желчных кислот не увеличено.

Лабораторная работа 6. **Обнаружение и определение уробилиноидов (уробилина и уробилиногена). Проба Флоренса**

С кислотой хлористоводородной уробилин образует соединение, окрашенное в красный цвет.

Реактивы: концентрированная серная кислота, диэтиловый эфир, концентрированная хлористоводородная кислота.

Ход определения. В пробирку вносят 8-10 мл мочи, подкисляют 8-10 каплями концентрированной серной кислоты, перемешивают, затем приливают 2-3 мл эфира, закрывают пробкой, несколько раз осторожно пропускают эфир через слой мочи для экстрагирования уробилина. Затем эфирную вытяжку мочи наслаивают (лучше пастеровской пипеткой) на 2-3 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и помещают в другую

пробирку. При наличии уробилина на границе жидкости образуется розовое кольцо. Проба очень чувствительная.

Клиническое значение. Определение уробилина имеет большое клиническое значение. Присутствие его, превышающее норму, может встречаться при гемолитических состояниях, при заболеваниях печени, при кишечных заболеваниях и лихорадочных состояниях, что связано с токсическим поражением печени. Полное отсутствие уробилина указывает на обтурационную желтуху.

Лабораторная работа 7. Проба на миоглобин

Метод основан на осаждении гемоглобина аммония сульфатом и способности миоглобина при этом окрашиваться в красно-коричневый цвет.

Реактивы: аммония сульфат кристаллический

Ход определения. В 5 мл мочи растворяют 2,8 г аммония сульфата, смесь фильтруют. Если фильтрат приобретает красновато-коричневый цвет, значит, в моче имеется миоглобин, а если фильтрат не окрашен - присутствует гемоглобин.

Клиническое значение. Моча здоровых животных не содержит миоглобина. Появление его в моче наблюдается при паралитической миоглобинурии, травмах мышц, электротравмах, отравлениях барбитуратами, окисью углерода, при пищевых токсикоинфекциях.

Лабораторная работа 8. Обнаружение индикана. Проба Обермайера

Превращение индикана в индоксил минеральной кислотой и последующее окисление индоксила в синее или красное индиго.

Реактивы: 0,2-0,4 г хлористого железа, растворенного в 100 мл концентрированной соляной кислоты (реактив нестоек), хлороформ.

Ход определения. В пробирку вносят 6 мл мочи и 6 мл раствора железа хлорида. Через 5 мин в пробирку добавляют 1-2 мл хлороформа и

опрокидывают ее несколько раз. При наличии индикана хлороформ в нижней части пробирки окрашивается в синий цвет.

Лабораторная работа 9. Обнаружение кетоновых тел

9.1. Проба Ланге

Натрия нитропруссид в щелочной среде реагирует с кетоновыми телами, прежде всего, с ацетоуксусной кислотой и ацетоном, с появлением окрашивания от сиреневого до темно-фиолетового. При этом чем больше в моче ацетоновых тел, тем интенсивнее окраска.

Реактивы: раствор натрия нитропруссида 5г/100 мл (готовят перед употреблением), уксусная кислота концентрированная, 25%-й раствор аммиака водного (NH_4OH).

Ход определения. Исследуют мочу не позже чем через 3 ч после ее получения. В пробирку вносят 3-5 мл мочи, приливают 5-10 капель раствора натрия нитропруссида и 0,5 мл уксусной кислоты, смешивают и осторожно по стенке пробирки пипеткой наливают 2-3 мл водного раствора аммиака. Пробу считают положительной, если в течение 3 мин на границе сред образуется красно-фиолетовое кольцо.

9.2. Проба Лестраде

Реактивы: 1 г натрия нитропруссида [$Na_2(FeCNO_2)(CN)_5 \cdot 2H_2O$]; 20 г аммония сульфата [$(NH_4)_2SO_4$], 20 г натрия карбоната безводного. Компоненты мелко измельчают в фарфоровой ступке в однородный порошок, который помещают в склянку из темного стекла с пробкой. Хранят 1-2 мес.

Ход определения. Исследуют свежеполученную мочу на ферме или в лаборатории. На фильтровальную бумагу на кончике скальпеля наносят реактив и смачивают несколькими каплями мочи, через 30 сек учитывают результат. Появление сиреневой, красной или темно-фиолетовой окраски свидетельствует о наличии в моче повышенной или высокой концентрации ацетоновых тел.

Клиническое значение. Кетоновые тела не имеют почечного порога и выделяются с мочой в степени, пропорциональной нарастанию концентрации их в крови. Обнаружение кетоновых тел в моче является наиболее доступным и ранним тестом диагностики кетоза у коров и овцематок. При кетозе концентрация кетоновых тел в моче нарастает главным образом за счет ацетоуксусной кислоты и ацетона, которые вступают в реакцию с натрия нитропруссидом. Наиболее высокая концентрация кетоновых тел в моче (около 800-1000 мг/100 мл) отмечается при остром тяжелом течении кетоза. Кетоновые тела в моче в высокой концентрации обнаруживают при тяжелом течении сахарного диабета (кетоацидоз). Незначительное повышение кетоновых тел в моче можно установить при задержке последа, тяжелой хирургической инфекции и некоторых других патологических состояниях. При этом повышение кетоновых тел идет преимущественно за счет β-оксимасляной кислоты.

Тема 6. Биохимические исследования мяса и мышечной ткани

Для определения pH мяса готовят водную вытяжку в соотношении 1:10, для чего навеску образца мяса массой (10,00+0,02) г тщательно измельчают (ножницами или на мясорубке), помещают в химический стакан вместимостью 50 см и экстрагируют дистиллированной водой в течение 30 мин при температуре окружающей среды и периодическом помешивании стеклянной палочкой. Экстракт фильтруют через складчатый бумажный фильтр и используют для определения интересующего показателя.

Подготовка проб для количественного определения гликогена, молочной кислоты, АТФ в мышечной ткани - в соответствии с методическими указаниями.

Для приготовления вытяжки сахаров (глюкозы) навеску предварительно измельченной мышечной ткани массой (10,00+0,02) г тщательно растирают в ступке с 1-2 г кварцевого песка и количественно переносят в коническую колбу вместимостью 150 мл с 50 мл воды. Затем колбу ставят на 30 мин на

водяную баню при температуре 70-80 °С. Из охлажденной смеси удаляют белки и коллоидные вещества, мешающие определению сахаров, путем добавления в колбу 5 мл раствора сульфата цинка с массовой долей 15 % и 5 мл раствора желтой кровяной соли с массовой долей 10 %. Смесь перемешивают, фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл и промывными водами доводят до указанного объема. На этом этапе работу можно прервать, добавив в вытяжку несколько капель толуола и закрыв колбу пробкой.

Лабораторная работа 1. **Определение pH**

Реактивы. Универсальная индикаторная бумага, экстракт мышечной ткани.

Ход определения. pH водного экстракта мышечной ткани определяют на потенциометре (pH-метре) любой марки или индикаторной бумаге.

Лабораторная работа 2. **Определение неорганических соединений в мышечной ткани**

Реактивы: раствор нитрата серебра, хлорид бария, молибдат аммония, азотная кислота концентрированная.

Ход определения:

а) определение хлорид-ионов: в пробирку вносят 0,5 мл мясного экстракта и добавляют 8 -10 капель раствора нитрата серебра. Образуется белый творожистый осадок;

б) определение сульфат-ионов: в пробирку вносят 0,5 мл мясного экстракта и добавляют 8 -10 капель хлорида бария. Образуется белый кристаллический осадок, нерастворимый в минеральных кислотах;

в) определение фосфат-ионов: в пробирку вносят 0,5 мл мясного экстракта и добавляют 8 -10 капель молибдата аммония (подогревают), 1 каплю азотной кислоты (конц.). Дают пробирке с раствором немного постоять и наблюдают выпадение осадка.

Лабораторная работа 2. **Обнаружение дегидрогеназы янтарной кислоты в мясе**

Реактивы: фосфатный буфер pH 6,8, 0,1н. раствор янтарной кислоты, 0,02% - й раствор метиленовой сини, масло вазелиновое.

Ход определения. В две пробирки наливают по 1 мл фосфатного буфера pH 6,8. В каждую пробирку помещают по 100 мл суспензии мышечной ткани или печени, предварительно промытой дистиллированной водой. В 1-ю пробирку приливают 2 мл 0,1н. раствора янтарной кислоты, во вторую – 2 мл дистиллированной воды, в каждую добавляют по 2 капли 0,02% - го раствора метиленовой сини; перемешивают содержимое пробирок и заливают 3-6 каплями вазелинового масла. Обе пробирки помещают в термостат или водяную баню на 30 мин, после этого наблюдают исчезновения окраски.

Лабораторная работа 3. **Определение влагосвязывающей способности мяса методом прессования**

Ход определения. Навеску исследуемого мясного образца массой 0,3 г взвешивают на торзионных весах и помещают на кружок из полиэтилена диаметром 15-20 мм, после этого его переносят на беззольный фильтр, помещенный на стеклянную или плексигласовую пластинку, так чтобы навеска оказалась под кружком. Сверху навеску накрывают такой же пластинкой, что и нижнюю, устанавливают на нее груз массой 1 кг и выдерживают в течение 10 мин. По истечении времени фильтр с навеской освобождают от груза и пластин, а затем карандашом очерчивают контур пятна вокруг спрессованного мяса.

Внешний контур вырисовывается при высыхании фильтровальной бумаги на воздухе. Площади пятен, образованных спрессованным мясом и адсорбированной влагой, измеряют при помощи миллиметровой бумаги.

Размер влажного пятна (внешнего) вычисляют по разности между общей площадью пятна и площадью пятна, образованного мясом. Экспериментально

установлено, что 1 см^2 площади влажного пятна фильтра соответствует 8,4 мг влаги.

Массовую долю связанной влаги в образце вычисляют по формулам

$X_1 = (M - 8{,}4 \cdot S) \cdot 100/m$;

$X_2 = (M - 8{,}4 \cdot S) \cdot 100/M$,

где X_1 -массовая доля связанной влаги в мясном фарше, % к массе мяса;

X_2 -массовая доля связанной влаги в мясном фарше, % к общей влаге;

M - общая масса влаги в навеске, мг;

S- площадь влажного пятна, мм^2;

m- масса навески образца, мг.

РАЗДЕЛ 3. ТЕСТОВЫЙ ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ КОНТРОЛЬ.

Тестовые задания по теме «Отбор проб для биохимического анализа»

1. Проведение биохимических анализов крайне важно для:

а) постановки диагноза;

б) проведения дифференциальной диагностики;

в) контроля за лечением;

г) все перечисленное верно.

2. Сыворотка - это жидкая часть крови без форменных элементов и фибриногена:

а) да;

б) нет.

3. Плазма - это жидкая часть крови без форменных элементов:

а) да;

б) нет.

4. Денатурацию белка можно вызвать воздействием:

а) концентрированных кислот;

б) концентрированных щелочей;

в) высокой температуры;

г) всех перечисленных факторов.

5. Температура, оптимальная для проведения ферментативных реакций:

а) 10°С;

б) 37°С;

в) 55°С;

г) 65°С.

6. Иктеричной принято называть сыворотку:

а) оранжево - желтого цвета;

б) мутную;

в) соломенно-желтого цвета;

г) красного - розового цвета.

7. Гемолиз эритроцитов может вызвать:

а) попадание в пробирку влаги;

б) механическая тряска при транспортировке крови;

в) следы моющих средств в пробирке;

г) все перечисленное верно.

8. Источником ошибок при проведении биохимических исследований может быть:

а) нарушение схемы анализа;

б) неправильное пипетирование;

в) нарушения в работе прибора;

г) все перечисленное верно.

9. Остатки биологических жидкостей после работы заливаются:

а) 10 %-м хлорамином на 1 ч;

б) 3 %-м хлорамином на 1 ч;

в) 10 %-м хлорамином на 24 ч;

г) 1 %-м перекисью водорода на 45 мин.

10. Мутность сыворотки обусловлена повышенным содержанием в ней:

а) альбуминов;

б) хиломикронов;

в) холестерина;

г) глобулинов.

11. Температура, оптимальная для ферментативной реакции:

а) 25^0C;

б) 37^0C;

в) 80^0C;

г) 100^0C.

12. На скорость ферментативной реакции влияет:

а) pH среды;

б) молекулярная масса субстрата;

в) молекулярная масса фермента;

г) влажность воздуха.

13. При определении активности ферментов:

а) кровь следует оставить при комнатной температуре на 24 ч;

б) сгусток следует немедленно отделить от сыворотки;

в) допускается использование гемолизированной сыворотки;

г) кровь выдерживают в термостате 12 час.

14. Правильность измерений - это:

а) качество измерений, отражающее близость к нулю систематических погрешностей в результатах;

б) качество измерений, отражающее близость их к истинному значению измеряемой величины;

в) качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов анализов, выполненных в разных условиях;

г) нет правильного ответа.

15. Для ускорения процесса свёртывания кровь помещают:

а) в термостат при 70^{o}C;

б) в термостат при 37^{o}C;

в) в центрифугу и центрифугируют;

г) в холодильник.

16. Клинически ценные результаты исследования плазмы сохраняются:

а) в течение суток;

б) в течение 2 ч после взятия;

в) в течение 15 мин после взятия;

г) все ответы верны.

17. Антикоагулянт - это:

а) химическое вещество, препятствующее свёртыванию;

б) химическое вещество, усиливающее свёртывание;

в) ингибитор ферментативных реакций;

г) активатор ферментативных реакций.

Тестовые задания по теме «Биохимические исследования крови»

1. Общий белок крови определяют методом:

а) Иендрашика;

б) рефрактометрии;

в) Илька;

г) Альтгаузена.

2. К белкам плазмы относится:

а) альбумин;

б) глобула;

в) фибрилла;

г) гистамин.

3. Разделение общего белка на белковые фракции проводится методом электрофореза:

а) да;

б) нет.

4. Нарушение процентного соотношения белковых фракций крови:

а) гипопротеинемия;

б) диспротеинемия;

в) парапротеинемия;

г) гиперпротеинемия.

5. Белки:

а) транспортируют различные соединения по крови;

б) составляют основу соединительной ткани;

в) поддерживают гомеостаз;

г) все перечисленное верно.

6. Нарушение пространственной структуры белков:

а) высаливание;

б) денатурация;

в) диспротеинемия;

г) дегидратирование.

7. Высаливание белков можно вызвать воздействием:

а) солей щелочных и щелочно-земельных металлов;

б) радиации;

в) солей тяжелых металлов;

г) концентрированных щелочей.

8. Простетическая группа хромопротеидов:

а) нуклеиновые кислоты;

б) окрашенные вещества;

в) производные углеводов;

г) липиды.

9. Мочевина в организме образуется для обезвреживания:

а) индола;

б) скатола;

в) аммиака;

г) билирубина.

10. Мочевина синтезируется в:

а) почках;

б) печени;

в) поджелудочной железе;

г) легких.

11. Основной путь обезвреживания аммиака в организме человека:

а) образование биогенных аминов;

б) синтез аминов;

в) образование мочевины;

г) синтез мочевой кислоты.

12. Мочевина в крови повышается при:

а) почечной недостаточности;

б) гепатитах;

в) мышечной дистрофии;

г) все перечисленное верно.

13. К остаточному азоту относится:

а) аммиак;

б) мочевина;

в) мочевая кислота;

г) все перечисленное верно.

14. Остаточный азот повышается при:

а) заболеваниях почек;

б) злокачественных опухолях;

в) лейкозах;

г) всех перечисленных заболеваниях.

15. Креатинин крови повышается при:

а) циррозах печени;

б) почечной недостаточности;

в) гепатитах;

г) гастритах.

16. Креатинин крови понижается при:

а) заболеваниях почек;

б) гастритах;

в) мышечной дистрофии;

г) заболеваниях печени.

17. Мочевая кислота образуется при распаде:

а) гема;

б) пуриновых оснований;

в) пиримидиновых оснований;

г) аминокислот.

18. Мочевая кислота повышается в крови при:

а) подагре;

б) лейкозах;

в) гломерулонефритах;

г) все перечисленное верно.

19. Повышение общего билирубина крови только за счёт свободного наблюдается при:

а) паренхиматозной желтухе;

б) гемолитической желтухе;

в) механической желтухе с частичной закупоркой желчного протока;

г) механической желтухе с полной закупоркой желчного протока.

20. Повышение общего билирубина крови только за счёт связанного наблюдается при:

а) переливании несовместимой крови;

б) гемолитической анемии;

в) опухоли желчного пузыря;

г) паренхиматозной желтухе.

21. Билирубин в крови определяют по методу:

а) Илька;

б) Иендрашика;

в) Мюллера – Зейферта;

г) Фолина.

22. К хроматографическим методам разделения белков относят:

а) ионообменную хроматографию;

б) радиальную хроматографию;

в) хроматографию на бумаге;

г) все перечисленные методы.

23. Общий белок крови повышается при:

а) миеломной болезни;

б) заболеваниях почек;

в) заболеваниях печени;

г) злокачественных опухолях.

21. Причины гипопротеинемии:

а) сгущение крови;

б) задержка белка в организме;

в) нарушение синтеза белков;

г) потери воды.

22. К гипергликемии может привести:

а) повышенная выработка инсулина;

б) стресс;

в) снижение всасывания глюкозы в тонком кишечнике;

г) инсулома.

23. К гипогликемии может привести:

а) передозировка инсулина;

б) стресс;

в) повышенная выработка глюкокортикоидов;

г) повышенная выработка адреналина.

24. В крови повышен уровень глюкозы. К норме его приводит гормон:

а) глюкагон;

б) инсулин;

в) тироксин;

г) альдостерон.

25. В крови понижен уровень глюкозы. К норме его приводит гормон:

а) адреналин;

б) вазопрессин;

в) паратгормон;

г) альдостерон.

26. Основная функция липопротеидов:

а) транспортная;

б) терморегуляторная;

в) защитная;

г) поддержание осмотического давления.

27. Холестерин является предшественником:

а) половых гормонов;

б) желчных кислот;

в) витамина D;

г) все перечисленное верно.

28. Увеличение содержания триглицеридов в крови наблюдается при:

а) ожирении;

б) атеросклерозе;

в) гипотериозе;

г) все перечисленное верно.

29. При обтурационной желтухе активность трансаминаз:

а) резко повышается;

б) понижается;

в) незначительно повышается;

г) резко понижается.

30. Изоферменты отличаются:

а) местом локализации в организме;

б) типом катализируемой связи;

в) субстратом;

г) катализируемой реакцией.

31. При инфаркте миокарда активность общей ЛДГ повышается за счёт изофермента:

а) ЛДГ-1;

б) ЛДГ-3;

в) ЛДГ-4;

г) ЛДГ-5.

32. Дегидратация развивается при:

а) недостаточном поступлении воды в организм;

б) усиленном потоотделении;

в) острых кишечных инфекциях;

г) все перечисленное верно.

33. Реабсорбцию воды из первичной мочи усиливает гормон:

а) альдостерон;

б) вазопрессин;

в) инсулин;

г) глюкагон.

34. Гиперкалиемия развивается при:

а) гемолитических анемиях;

б) гломерулонефритах;

в) сахарном диабете;

г) почечной недостаточности.

35. Гиперхлоремия развивается при:

а) гемолитической анемии;

б) декомпенсации сердечно-сосудистой деятельности;

в) рвоте;

г) поносах.

36. Понижение содержания железа в крови характерно для:

а) гемолитических анемий;

б) гемофилии А;

в) железодефицитных анемий;

г) гемофилии Б.

37. Метод определения кальция:

а) цветная реакция с глиоксаль-бис-2-оксианилом;

б) цветная реакция с флуреконом;

в) атомная адсорбционная спектроскопия;

г) все перечисленное верно.

38. Ацидоз:

а) снижение pH крови;

б) увеличение pH крови;

в) развивается при гипокалиемии;

г) соответствует pH 8,1.

39. Алкалоз:

а) снижение pH крови;

б) увеличение pH крови;

в) соответствует pH 3,8;

г) накопление углекислоты в крови.

Тестовые задания по теме «Биохимические исследования молока»

1.Содержание воды в молоке:

а) 88%;

б) 50%;

в) 40%;

г) 30%;

д) 20%.

2. Кобылье молоко отличается от женского:

а) повышенным содержанием жира;

б) пониженным содержанием жира;

в) повышенным содержанием лактозы;

г) пониженным содержанием лактозы;

д) повышенным содержанием витаминов.

3. Кобылье молоко превосходит молоко других сельскохозяйственных животных по содержанию:

а) витамина Е;

б) витамина С;

в) жира;

г) казеиногена;

д) витамина D.

4. Основным белком молока является:

а) казеиноген;

б) альбумин;

в) глобулин;

г) гистон;

д) коллаген.

5. По строению казеиноген относится к:

а) простым белкам;

б) НП;

в) ФП;

г) ГП;

д) ХП.

6. В молоке содержится железосодержащий гликопротеин, играющий важную роль в профилактике рака:

а) лактальбумин;

б) лактглобулин;

в) казеиноген;

г) ферритин;

д) лактоферрин.

7. Основными липидами молока являются:

а) ТАГ;

б) ХСН;

в) СФЛ;

г) фосфатиды;

д) гликолипиды.

8. Основным углеводом молока является:

а) лактоза;

б) фруктоза;

в) сахароза;

г) мальтоза;

д) крахмал.

9. Основными катионами молока являются:

а) медь и кобальт;

б) кальций и фосфор;

в) железо и селен;

г) цинк и марганец;

д) магний и молибден.

10. Молоко богато следующими витаминами:

а) А, Е, B_1, B_2, B_{12},

б) К, Д, РР, Н, B_3,

в) С, Р, B_5, Н, К,

г) В3, Вс, С, Р, К,

д) РР, Р, С, Вс, B_3.

11. Доля сухого остатка в молоке составляет:

а) 2-3%;

б) 5-8%;

в) 10-15%;

г) 20-25%;

д) 50-55%.

12. Казеиноген содержит фосфор в количестве:

а) 0,1%;

б) 0,2%;

в) 0,5%;

г) 0,9%;

д) 5%.

13. В молоке казеиноген преимущественно находится в виде:

а) растворимой соли казеиногената кальция;

б) нерастворимой соли казеината кальция;

в) соли калия;

г) соли натрия;

д) соли магния.

14. Створаживание молока происходит под действием:

а) солей тяжелых металлов;

б) нейтральных солей;

в) пепсина и химозина;

г) высокой температуры;

д) концентрированных кислот.

15. Липиды молока образуют:

а) мицеллы;

б) хиломикроны;

в) липопротеиды;

г) молочные шарики;

д) молочную плазму.

16. В результате брожения лактозы в кисломолочных продуктах появляются:

а) винный спирт, ацетоин, эфиры;

б) винный спирт, метиловый спирт, эфиры;

в) винный спирт, лактат, АУК;

г) этиловый спирт, галактоза, глюкоза;

д) фенол, этанол, диацетил.

Тестовые задания по теме «Биохимические исследования мочи»

1. Преобладание ночного диуреза над дневным – это:

а) поллакиурия;

б) олигурия;

в) никтурия;

г) полиурия.

2. Кислотность мочи повышается:

а) при употреблении преимущественно мясной пищи;

б) в присутствии ацетона в моче;

в) при употреблении овощной пищи;

д) при отравлении ядами.

3. К физическим свойствам мочи относятся:

а) цвет, запах, консистенция;

б) цвет, плотность, количество, реакция среды;

в) прозрачность, наличие белка, цвет;

д) плотность, прозрачность, лейкоциты.

4. При несоблюдении правил сбора мочи для общего анализа в осадке появляются:

а) кристаллы солей;

б) цилиндрический эпителий;

в) плоский эпителий в большом количестве;

д) кубический эпителий в большом количестве.

5. Помутнение мочи не может быть связано:

а) с наличием слизи;

б) с наличием эпителия;

в) с наличием глюкозы;

д) с наличием солей.

6. К химическим свойствам мочи относится:

а) белок;

б) реакция среды;

в) удельный вес;

д) прозрачность.

7. Для получения осадка мочу:

а) отстаивают;

б) центрифугируют;

в) фильтруют;

д) выпаривают.

8. Осадок мочи микроскопируют:

а) окрашенным по Граму;

б) нативным;

в) фиксированным;

д) окрашенным по Романовскому.

9. При микроскопии осадка мочи лейкоцитов в норме:

а) до 6 клеток в поле зрения;

б) 10 – 20 клеток в поле зрения;

в) 45 – 50 клеток в поле зрения;

д) отсутствуют.

10. Проба по Нечипоренко исследует:

а) количество сахара в моче;

б) выделительную функцию почек;

в) количество форменных элементов в 1 мл мочи;

д) концентрационную функцию почек.

11. Учащенное мочеиспускание называется:

а) олигурия;

б) никтурия;

в) дизурия;

д) поллакиурия.

12. При поллакиурии наблюдается:

а) урежение мочеиспускания;

б) увеличение количества мочи;

в) мочеиспускание 15 раз в сутки;

д) затрудненное мочеиспускание.

13. Для качественного определения белка в моче применяют:

а) 3%-й р-р хлорида натрия;

б) 20%-й р-р сульфосалициловой кислоты;

в) 3%-й р-р уксусной кислоты;

д) физиологический раствор.

14. Для определения белка в моче по методу Стольникова в пробирку сначала наливают:

а) воду;

б) мочу;

в) реактив Ларионовой;

д) 20% р-р сульфосалициловой кислоты.

15. Нитевидное кольцо на 2-3 минуте при определении белка по методу Брандберга – Робертса – Стольникова соответствует:

а) 0,3 г/л белка;

б) 3 г/л белка;

в) 0,066 г/л белка;

д) 0,033 г/л белка.

16. Определение белка в моче основано на постановке пробы:

а) Аддиса – Каковского;

б) Геллера;

в) Зимницкого;

д) Нечипоренко.

17. Организованный осадок мочи состоит из:

а) клеточных элементов;

б) кристаллов солей;

в) слизи;

д) бактерий.

18. Кольцо при пробе Геллера образуется:

а) на дне пробирки;

б) на поверхности раствора;

в) при контакте с водой;

д) на границе жидкостей.

19. Метод Стольникова основан на:

а) растворении осадка при нагревании;

б) кольцевой пробе Геллера;

в) помутнении мочи при добавлении кислоты;

д) появлении осадка.

20. Олигурия встречается при:

а) избыточном употреблении жидкости;

б) рассасывании отеков;

в) склонности к образованию отеков;

д) печеночной недостаточности.

21. При длительном стоянии реакция мочи сдвигается в сторону:

а) кислую;

б) щелочную;

в) нейтральную;

д) остается неизмененной.

Тестовые задания по теме «Биохимический анализ мяса, яичной продукции»

1. Какое мясо применяют для производства всех видов мясопродуктов без ограничений;

а) PSE;

б) NOR;

в) DFD.

2. Степень гидратации мышц снижается, следовательно, увеличивается:

а) холодовое сжатие;

б) степень жесткости;

в) водосвязывающая способность.

3. Мышечная ткань расслаблена, высокая влагоемкость, pH 6,8 – 7,0, нет аромата и вкуса, мясо нежное, но кулинарные свойства отсутствуют. К какой фазе автолиза относятся все эти перечисленные показатели:

а) созревание;

б) глубокий автолиз;

в) посмертное окоченение.

4. Основными компонентами формирования вкуса и аромата являются:

а) пептиды;

б) аминокислоты;

в) амиды.

5. За счет чего в мясе происходит образование вкуса и ароматобразующих компонентов:

а) денатурация низкомолекулярных веществ мышечной ткани;

б) автолитические превращения белков, липидов, углеводов, нуклеотидов;

в) снижение протеолитической активности катепсинов внутри клетки.

6. Главная и ценная часть мяса:

а) жировая ткань;

б) мышечная ткань;

в) костная ткань.

7. При изучении кулинарных качеств мяса учитывают:

а) запах;

б) цвет;

в) нежность;

г) влагоёмкость;

д) диаметр волокон.

8. В какие часы после убоя скота глубинные слои мяса практически стерильны:

а) через 48 ч;

б) через 24 ч;

г) в первые ч.

9. Изменения в мясе после убоя характеризуются:

а) распадом прижизненно биологических систем;

б) приобретается синтез ферментативных биохимических процессов.

10. Какое мясо используют при изготовлении эмульгированных колбас, соленых изделий с коротким периодом хранения:

а) PSE;

б) NOR;

г) DFD.

11. В процессе созревания в мясе здоровых животных происходит:

а) повышение показателя pH;

б) снижение показателя pH.

Библиографический список

Основной литературы

1. *Барковский Е.В.* Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учеб. пособие / Е. В. Барковский - Минск : Высш. шк., 2013. - 496 с.

Дополнительной литературы

2. *Горбатова К.К.* Биохимия молока и молочных продуктов: учебник / К.К. Горбатова. - СПб.: Гиорд, 2015. - 336 с.

3. *Камышников В.С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2 т. – Минск.: Беларусь, 2000. – 495 с.

4. *Клиническая* биохимия/ под. ред. В.А. Ткачука. - М.: ГЭОТАР-медиа,

2004. – 512 с.

5. *Клиническая* биохимия: учеб. пособие/ А.Я. Цыганенко, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов. - М.: Триада-Х, 2002. – 498с.

6. *Кондрахин И.П.* Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник. – М.: Колос, 2004. – 520 с.

7. *Маршалл В.Дж.* Клиническая биохимия / В.Дж. Маршалл. - М.: Бином, 2011. - 408 с.

8. *Медведев В.В.* Клиническая лабораторная диагностика /В.В. Медведев, Ю.З. Волчек – СПб.: Гиппократ, 1997. – 208 с.

9. *Мейер Д.* Ветеринарная лабораторная медицина. Интер претация и диагностика /Д. Мейер, Дж. Харви - М.: Софион, 2007. – 456 с.

10. *Назаренко Г.И.* Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун – М.: Медицина, 2000. – 544с.

11. *Полотнянко Л.И.* Клиническая химия/ Л.И. Полотнянко. - М.: владос-пресс, 2008. – 343 с.

12. *Попечителев Е.П.* Аналитические исследования в медицине, биологии и экологии/ Е.П. Попечителев. - М.: Высш. шк. 2003. – 279 с.

13. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии/ под ред. К. Уилсон, Дж. Уолкер. – М.: бином. Лаборатория знаний, 2015. – 848 с.

14. Рогожкин В.В. Биохимия молока и мяса: учебник / В.В. Рогожкин. - СПб.: гиорд, 2012. - 456 с.

15. *Рогожкин В.В.* Биохимия мышц и мяса – СПб.: Гиорд, 2006.

16. *Розанцев Э.Г.* Биохимия мяса и мясных продуктов/ Э.Г. Розанцев - М.: ДеЛи принт, 2006. – 240 с.

17. *Справочник* по лабораторным методам исследования/ под. ред. Л.А. Даниловой. – СПб.: Питер, 2003. – 736 с.

Приложение 1

Вычисление содержания общего белка в сыворотке крови по показателю преломления при рефрактометрии

Показатель преломления	Белок, г/л	Показатель преломления	Белок, г/л	Показатель преломления	Белок, г/л
1,33743	8,6	1,34275	39,4	1,34873	74,2
1,33781	10,8	1,34350	43,8	1,34947	78,5
1,33820	13,0	1,34388	46,0	1,34984	80,6
1,33858	15,2	1,34420	48,1	1,35021	82,8
1,33896	17,4	1,34463	50,3	1,35058	84,9
1,33934	19,6	1,34500	52,5	1,35095	87,1
1,33972	21,8	1,34537	54,7	1,35132	89,2
1,34000	24,0	1,34575	36,8	1,35169	91,4
1,34048	26,2	1,34612	59,0	1,35205	93,5
1,34086	28,4	1,34650	61,2	1,35242	95,7
1,34124	30,6	1,34687	63,4	1,35279	97,8
1,34162	32,8	1,34724	65,5	1,35316	99,9
1,34199	35,0	1,34798	69,8	1,35352	102,0
1,34237	37,2	1,34836	72,0	1,35388	104,1

Приложение 2

Содержание общего белка в сыворотке крови по видам животных, г/л

Виды животных	Средний показатель	Пределы колебаний
Крупный рогатый скот. коровы телята	 76,4 54,3	 60,0-80,3 50,0-65,0
Мелкий рогатый скот.	61,9	41,8-80,0
Свиньи	71,6	65,0-85,0
Лошади	73,0	65,0-78,0
Собаки	65,2	54,2-75,4
Кошки	81,0	60,0-110,0

Приложение 3

Содержание белковых фракций в сыворотке крови по видам животных, г/л

Показатель	Крупный рогатый скот	Овцы	Свиньи	Лошади
альбумины	38-50	35-50	40-55	35-45
α_1-глобулины	12-20	13-20	14-20	14-18
β-глобулины	10-16	7-11	16-21	20-26
γ-глобулины	25-40	20-46	17-26	18-24

Составители:
Котлярова Ольга Сергеевна
Чыдым Сырга Март-ооловна

ОСНОВЫ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Методические указания
к лабораторным работам