

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ГОРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Учебное пособие
для проведения лабораторных занятий
для студентов по специальности
36.05.01 – «Ветеринария»
(квалификация выпускника –
ветеринарный врач)

Владикавказ, 2022

УДК 636. 085, 16 (075.8)
ББК 28.673я 73
К 50

Составитель – **Б.А. Дзагуров**, доктор биологических наук,
профессор

Рецензент – **А.Р. Габолаева**, кандидат биологических наук,
доцент

Дзагуров Б.А. Биологически активные вещества / Учебное пособие для проведения лабораторных занятий / Б.А. Дзагуров. – Владикавказ: Издательство ФГБОУ ВО «Горский госагроуниверситет», 2022, – 76с.

В учебном пособии изложено краткое описание клинического и диагностического значения биологически активных веществ (витамины, ферменты, гормоны, антибиотики, антиоксиданты, др.) используемые для профилактики, лечения, повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы и методы определения их качественного и количественного состава в различных субстратах. Рекомендуются для студентов ветеринарного факультета, обучающихся по специальности «Ветеринария» и смежных с ним других специальностей биологического профиля, слушателей ФПК, аспирантов, преподавателей и практических работников сельского хозяйства. Данное издание подготовлено по дисциплине «Биологически активные вещества» в соответствии с ФГОС ВО от 19 сентября 2017 г. № 939 (зарегистрировано Министерством юстиции Российской Федерации 11.10.2017 г. № 48500).

*Рекомендовано Центральным учебно-методическим советом
ФГБОУ ВО Горский ГАУ в качестве учебного пособия
(протокол №9 от 30 июня 2022 г.).*

© Дзагуров Б.А., 2022

© Издательство ФГБОУ ВО «Горский госагроуниверситет», 2022

ВВЕДЕНИЕ

Рост производства продукции животноводства базируется на дальнейшей интенсификации отрасли путем повышения продуктивности животных и птицы, увеличения поголовья, сохранения здоровья на основе эффективного использования кормов, совершенствования племенной работы и внедрения в производство прогрессивных технологий. При этом одним из главных составляющих достижения указанных условий считается использование в кормлении и ветеринарии биологически активных веществ (витаминов, ферментных и гормональных препаратов, антибиотиков, антиоксидантов, макро- и микроэлементов, кормовых премиксов и др.).

Современные животноводческие комплексы и птицеводческие предприятия, как правило имеют хорошо оснащенные лаборатории, выполняющие ветеринарные и зоотехнические исследования. Подготовка специалистов к работе в новых условиях начинается в лабораториях высших учебных заведений, где студенты ветеринарных и зооинженерных специальностей осваивают навыки определения в субстратах биологически активных веществ, используемых как в кормлении, так и в профилактических и лечебных целях, позволяющих осуществлять контроль за состоянием обмена веществ и здоровья в целом по стаду, своевременно выявлять преобладающие и сопутствующие болезни, их этиологию, патогенез, терапию, соответственно продуктивность, качественный состав продукции и конверсию кормов.

Настоящий лабораторный практикум, предназначенный для студентов ветеринарных факультетов по своему содержанию отвечает программе курса «Биологически активные вещества», где перед проведением каждого лабораторного занятия приводятся краткие теоретические предпосылки по клиническому и диагностическому значению тех или иных биологически активных веществ, методы их качественного и количественного определения, метаболизму этих веществ, разбору их сущности и назначения, что дает студенту проводить самостоятельно лабораторный анализ. При этом достоверность получаемых результатов анализов зависит от условий выбора

метода анализа, подготовки лабораторной посуды, реактивов, условий взятия, подготовки, хранения образцов биологического материала, использования антикоагулянтов, консервантов, качества и добросовестности выполнения анализа и др.

Лабораторный практикум изложен с определенной детализацией проведения лабораторных анализов, краткой характеристике тех или иных биологически активных веществ и дает возможность студенту выполнять тот или иной анализ самостоятельно и использовать методики проведения анализов не только для обязательных учебных занятий, но и при выполнении студентом учебно-исследовательской работы, предусмотренной рабочей программой, при проведении занятий в научных кружках, а также при подготовке докладов на студенческую научную конференцию и публикации результатов анализов в научных изданиях.

Многие методы лабораторных анализов, изложенных в данном лабораторном практикуме имеют прямое отношение к работе современных лабораторий промышленных животноводческих и птицеводческих комплексов и ветеринарных бактериологических лабораторий, имея ввиду их клиническое и диагностическое значение.

Настоящий лабораторный практикум содержит элементы теории и методики практических исследований по изучению действия биологически активных веществ на метаболизм в организме животных и птицы.

Автор благодарен рецензенту, кандидату биологических наук, доценту А. Р. Габолаевой за ценные замечания и пожелания, высказанные при рецензировании и подготовке данного лабораторного практикума.

Требования к результатам освоения программы специалиста при выполнении лабораторных работ по дисциплине «Биологически активные вещества»

Целью освоения дисциплины «Биологически активные вещества» является обучение студентов навыкам лабораторного анализа по определению качества и количества биологически активных веществ в различных субстратах.

Задачами дисциплины являются формирование у студентов знаний и приобретение навыков при проведении лабораторного анализа отдельных биологически активных веществ и использование при этом необходимого оборудования и реактивов в лабораторных условиях.

В результате освоения дисциплины «Биологически активные вещества» студент должен:

знать: клиническое и диагностическое значение отдельных биологически активных веществ и их механизм действия на целостный организм, отдельные системы, органы и ткани организма животных или птицы;

уметь: производить лабораторные анализы по установлению количественного и качественного содержания тех или иных биологически активных веществ в биологических субстратах;

владеть: навыками проведения лабораторных анализов, правильному подбору реактивов и оборудования использованию биологических, химических, физико-химических, изотопных и других методов анализов, по определению содержания в биологических субстратах биологически активных веществ с помощью колориметрических, спектрофотометрических, спектрофлуориметрических, газохроматографических методов.

ТЕМА 1. ВИТАМИНЫ

Методы определения витаминов в различных субстратах

Содержание и методики проведения занятия

Для контроля за обеспечением животных витаминами, своевременной диагностики гиповитаминозов анализируют не только обеспеченность витаминами рационов, но и определяют их содержание в крови, молозиве, молоке, печени и других тканях, а также используют косвенные показатели. При изучении обмена витаминов применяют биологические, химические, физико-химические, изотопные и другие методы. Содержание витаминов в биологических субстратах чаще определяют с помощью колориметрических, спектрофотометрических, спектрофлуориметрических и газохроматографических методов. Из-за сложности методов прямое определение концентрации многих витаминов в крови и других биологических субстратах проводится редко.

Занятие 1. Методы определения витамина А и провитамина А (каротина)

- 1.1. Определение витамина А в сыворотке крови.
- 1.2. Определение каротина в сыворотке (плазме) крови.

1.1. Определение витамина А и каротина в сыворотке крови по Бессею в модификации В. И. Левченко и сотр.

Принцип. Метод основан на щелочном гидролизе и экстракции витамина А и каротина из сыворотки крови, молозива (молока) малолетучими растворителями и последующем спектрофотометрическом измерении поглощения света раствором (при длине волны 328 нм для витамина А и 460 нм для каротина) до и после разрушения витамина А ультрафиолетовыми лучами.

Клиническое и диагностическое значение определения витамина А в сыворотке крови. Основными формами витамина А является витамин А-спирт (ретинол) и его производные в форме

сложного эфира (ретинолпальмитата) с пальмитиновой кислотой. Главный источник витамина А в организме животных – каротин. Усвоение его и витамина А происходит в кишечнике, при этом принято считать, что усваивается только 1/3–1/4 часть каротина и около 1/7 части его превращается в витамин А. 25–50 % витамина А переходит в печень.

В условиях полноценного белкового питания, хорошей обеспеченности витамином В₁₂, а также использования антиоксидантов повышается активность каротиндиоксигеназы, увеличивается количество молекул каротина, расщепляющихся по центру, в 1,5–2 раза возрастает эффективность синтеза витамина А.

Действие витамина А проявляется в обеспечении нормального роста и развития животных, дифференцировании эпителиальной и костной тканей, регуляции обмена веществ.

Содержание витамина А в сыворотке крови у клинически здоровых телят 5–10-дневного возраста составляет 9–15 мкг/100 мл, у телят месячного возраста 12,5–25; у 3-месячных – 15–35; у молодняка старше 3-месячного возраста 30–80; у коров в стойловый период 25–80, в пастбищный период 40–150; у свиней 20–50; у овец и лошадей 15–25 мкг/100 мл. В молозиве коров первого удоя в стойловый период содержится 140–500 мкг/100 мл витамина А, в пастбищный период 150–580 мкг/100 мл, в молоке соответственно 30–80 и 80–210 мкг/100 мл. В желтке куриных яиц – 6–75 мкг/г.

Снижение количества витамина А в крови, печени, молозиве и молоке отмечают при недостатке каротина и витамина А в кормах, плохом усвоении их вследствие хронических заболеваний органов пищеварения и печени. При снижении в крови витамина А ниже 10 мкг%, а в печени ниже 50 мкг% у взрослых животных появляются симптомы гиповитаминоза, задерживается спермогенез, сперматозоиды становятся малоподвижными, теряют оплодотворяющую способность, нарушается строение и функция эпителия органов дыхания, пищеварения, репродуктивная способность самок, появляются респираторные болезни и др.

Реактивы: раствор калия гидроксида 1 моль/л в 96%-ном этиловом спирте. К 5,6 г КОН добавляют 6 мл дистиллированной воды, растворяют и доводят объем до 100 мл этанолом, тщательно перемешивают (или берут 1 объем 1 н. КОН и 10 объемов 96%-ного этанола). Реактив готовят перед работой. Ксилол-октановая смесь

(1:1, х.ч.). В необходимых случаях ксилол перегоняют. Реактив готовят за несколько часов до начала анализа.

Оборудование: спектрофотометр СФ-46, СФ-16 или фотоэлектроколориметр КФК-2, КФК-3; ртутно-кварцевая лампа ДРТ-400; вентилятор настольный; водяная баня; пробирки из стекла «пирекс», пропускающие ультрафиолетовые лучи с притертыми пробками (55–8 мм); пипетки с резиновыми баллончиками или со шприцом для отсасывания жидкости.

Ход определения. В центрифужные пробирки вносят по 2 мл сыворотки крови (молозива) и 1 моль/л спиртового раствора КОН, перемешивают тонкой стеклянной палочкой до образования однородной смеси и ставят для гидролиза в водяную баню на 20 мин при 60°C (через каждые 10 мин перемешивают). После гидролиза пробирки охлаждают в течение 10 мин в морозильной камере холодильника. В каждую из них вносят по 4 мл ксилол-октановой смеси, закрывают пробками, интенсивно встряхивают в течение 2–3 мин, снова охлаждают 5–7 мин, а затем центрифугируют 10–15 мин при 3000 мин. Верхний слой, который содержит экстракт витамина А и каротиноидов в ксилол-октановой смеси, отбирают пипеткой в пробирки из стекла «пирекс».

Фотометрию проводят в кювете с толщиной слоя 10 мм, а для контроля используют ксилол-октановую смесь. На СФ-46 каротин определяют при длине волны 460 нм, ретинол – при 328 нм; на КФК-2 или КФК-3 при длине волн соответственно 440 и 315 нм.

Оптическую плотность смеси для определения витамина А проводят до и после обработки пробирок ультрафиолетовыми лучами в течение 50 мин. Для этого пробирки из стекла «пирекс» плотно закрывают притертыми стеклянными пробками и ставят на расстояние 15–20 см от лампы ДРТ-400 или ПРК-5. Для охлаждения пробирок тотчас включают два настенных вентилятора. По разнице оптической плотности смеси, полученной при фотометрии до и после облучения ультрафиолетовыми лучами, находят концентрацию витамина А в сыворотке крови (молозиве).

Расчет ведут при определении витамина А на СФ-16 или СФ-46 по формуле:

$$A = (E_1 - E_2) \cdot 1274,$$

а при определении на КФК-2 или КФК-3 по формуле:

$$A = (E_1 - E_2) \cdot 1500,$$

где: А – концентрация витамина А, мкг/100 мл; E_1 – экстинкция раствора до воздействия волной 315 нм; E_2 – экстинкция раствора после воздействия волной 315 нм; 1274 и 1500 – коэффициенты для определения витамина А.

Концентрация каротина при определении на СФ-16 или СФ-46 равна $E \cdot 762$, а при определении на КФК-2 или КФК-3 – $E \cdot 850$, где E – экстинкция раствора при воздействии длины волны 440 нм; 762 и 850 – коэффициенты для определения каротина.

1.2. Определение каротина в сыворотке (плазме) крови по Карп и Прейсу в модификации Юджина

Принцип. Извлечение каротина из белков сыворотки (плазмы) крови производится петролевым эфиром или авиационным бензином. Экстинкции экстракта каротина измеряются на фотоэлектроколориметре. Расчет ведут по стандартному раствору калия двухромовокислого.

Клиническое и диагностическое значение определения каротина в сыворотке (плазме) крови по Карп и Прейсу в модификации Юджина. Каротин – основной источник витамина А. Для клинических целей каротин определяют в сыворотке (плазме) крови крупного рогатого скота с 3-месячного возраста. У телят молочного периода его содержание в сыворотке крови очень низкое, поэтому анализы не имеют практического значения. У свиней, лошадей, овец и коз каротин в пищеварительном тракте всасывается только в трансформированной в витамин А форме, т. е. каротин через стенку кишечника не проникает, поэтому в крови, печени и молоке этих животных каротин не обнаруживают или находят следовые концентрации.

Концентрация каротина в крови крупного рогатого скота составляет в пастбищный период 1–2,8 мг%, в стойловый период 0,4–1,0 мг%. Снижение каротина наблюдается при дефиците его в кормах, плохом усвоении вследствие болезней желудочно-кишечного тракта, гепатитах и гепатозах, недостатке в рационах белка и легкоусвояемых углеводов, витамина B_{12} , разрушении каротиноидов вследствие порчи кормов, различных токсикозах, включая нитратные.

Реактивы: петроленый эфир (ч) или авиационный бензин марки Б-70; 96% этиловый спирт; основной калибровочный раствор. 360 мг

калия двуххромовокислого растворяют в мерной колбе на 500 мл небольшим количеством дистиллированной воды и затем доводят до метки; рабочий калибровочный раствор. Готовят перед анализом. Смешивают 2,4 мл основного калибровочного раствора и 2,6 мл дистиллированной воды. Приготовленный рабочий калибровочный раствор соответствует интенсивности окраски 1 мг/% концентрации каротина.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; центрифуга; центрифужные пробирки; стеклянные палочки.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки (плазмы) крови, 3 мл 96%-ного этилового спирта, перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 10 мин при 3000 мин⁻¹. Верхний слой (этиловый спирт) сливают, к осадку добавляют 5 мл эфира, тщательно перемешивают стеклянной палочкой в течение 2 мин. Снова центрифугируют 10 мин при 3000 мин⁻¹. Эфир с экстракцией каротина сливают в пробирку и фотометрируют при синем светофильтре (длина волны 400–500 нм) в кювете с толщиной слоя 1 см против воды. Параллельно фотометрируют рабочий калибровочный раствор калия двуххромовокислого, соответствующий по окраске 1 мг% каротина.

Расчет ведут по формуле:

$$X = 1 + \frac{E_{\text{пр}}}{E_{\text{к}}} \cdot 1,0,$$

где: x – количество каротина, мг; $E_{\text{пр}}$ – экстинкция испытуемого образца; $E_{\text{к}}$ – экстинкция калибровочного рабочего раствора; 1,0 – коэффициент для пересчета в мг%.

Примечание. Уровень каротина в сыворотке (плазме) крови при хранении снижается, что следует учитывать при проведении анализов.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения витамина А и каротина в сыворотке крови.
2. Какие заболевания развиваются у животных при недостатке в кормах витаминов А и провитамина А (каротина).
3. Какие корма считаются источником витамина А и провитамина каротина.
4. Суточная потребность разных видов животных в витамине А и провитамина каротине.

Занятие 2. Методы определения витамина тиамин (В-1) и рибофлавина (В-2)

- 2.1. Метод определения общего тиамин в крови и печени.
- 2.2. Метод определения общего рибофлавина в крови.

2.1. Флуориметрический метод определения общего тиамин в крови и печени (по Г. Д. Елисейевой)

Клиническое и диагностическое значение определения общего тиамин в крови и печени (по Г. Д. Елисейевой). Тиамин к животным поступает с кормом в свободном, этерифицированном и связанном видах. В кровь в основном попадает свободный тиамин, который фосфорилируется в печени. Часть его в виде свободного тиамин поступает в общий кровоток и распределяется по другим тканям. В тканях основная масса тиамин фосфорилируется до тиаминдифосфата (ТДФ), который является коферментной формой витамина В₁. ТДФ катализирует реакции окислительного декарбоксилирования б-кетокислот, участвуя таким образом в процессе аэробного окисления углеводов, взаимопревращения аминокислот. Недостаток тиамин сопровождается торможением процесса распада пировиноградной кислоты и накоплением ее в крови и моче.

О степени обеспеченности организма тиамином судят по его содержанию в крови, моче, печени, а также по содержанию в крови и моче пировиноградной кислоты. В крови, тканях и других биологических объектах постоянно присутствует сам тиамин и его производные: ТДФ, тиаминмонофосфат (ТМФ), тиохром. В крови в основном содержится фосфорилированный тиамин (ТДФ и др). Свободного тиамин в крови очень мало (0,3–0,9 мкг%), поэтому для клинических целей исследуют общий тиамин. Однако при заболеваниях почек целесообразно определять в крови и моче также и свободный тиамин.

Содержание общего тиамин в крови колеблется в пределах 7–15 мкг%, в печени 8–13 мкг/г. При этом в плазме крови обнаруживается преимущественно свободный тиамин, в эритроцитах и лейкоцитах – фосфорилированный. Сезонной зависимости содержания тиамин в крови не обнаружено.

Гиповитаминоз В₁ проявляется при содержании общего тиамин в цельной крови ниже 5–6 мкг%, в печени менее 0,3 мкг/г. Уровень

пировиноградной кислоты при этом превышает 0,7–1,2 мг%. В условиях интенсивного выращивания и откорма бычков в промкомплексах при содержании общего тиамин в крови 5 мкг% и ниже И. С. Шалатонов (1982) отмечал выраженные признаки алопеции. Низкий уровень тиамин в крови, печени и других тканях наблюдается при цереброкортикальном некрозе. Подавляется бактериальный синтез витамина В₁ в желудочно-кишечном тракте при скармливания животным антибиотиков и аминазина.

Принцип. Метод основан на окислении тиамин в тиохром экстракции последнего в органический растворитель и измерения интенсивности флуоресценции.

Реактивы: калибровочный раствор тиамин. 100 мг тиамин-хлорида растворяют в 100 мл 0,01 н. растворе соляной кислоты. Хранят в холодильнике до 1 месяца. Рабочий раствор готовят в день определения разведения стандартного раствора в 1000 раз, получают раствор с содержанием тиамин 1 мкг/мл; 2%-ный раствор калия железосинеродистого красной кровяной соли, свежеприготовленный; 30%-ный раствор натрия гидроксида; 96%-ный этиловый спирт; 0,25 моль/л раствор хлористоводородной кислоты; изо-бутиловый спирт, насыщенный водой; 20%-ный раствор натрия карбоната; 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; фосфатаза щелочная лиофильная; универсальный индикатор или 0,04%-ный спиртовой раствор бромкрезоловой пупуровой.

Для того чтобы спирты (изобутиловый, изоамиловый, этиловый) не флуорисциновали, их очищают путем взбалтывания с активированным углем и последующим фильтрованием до полного отсутствия сине-голубого свечения на флуориметре.

Оборудование: флуориметр типа ЭФ-3; термостат; водяная баня; ступки фарфоровые; стаканчики сахарные (Хагедорна); цилиндры на 100 мл с притертыми пробками; делительные воронки; пипетки; пробирки центрифужные без деления и с делением.

Ход определения. В стаканчик Хагедорна или большую пробирку вносят 1 мл оксалатной крови (2–3 мг оксалата на 1 мл крови), 10 мл 0,25 моль/л соляной кислоты и нагревают в кипящей водяной бане в течение 15 мин для частичного разрушения флуоресцирующих примесей. К теплomu раствору при взбалтывании прибавляют по каплям 20 %-ный раствор натрия карбоната до получения рН 5,2 (по универсальному индикатору или по 0,04 %-ному раствору бромк-

резолпурпура). Затем добавляют 2–3 капли хлороформа, 50 мг фосфатазы и перемешивают стеклянной палочкой. Стаканчик закрывают ватной пробкой и выдерживают в термостате 24 ч при 37°C для ферментативного расщепления кокарбоксылазы.

По истечении этого времени смесь нагревают в течение 3 мин на кипящей водяной бане. Затем через фильтр, предварительно отмытый от флуоресцирующих веществ горячей бидистиллированной водой, раствор фильтруют в чистый стаканчик Хагедорна. Остающийся при этом на фильтре осадок во избежание потери тиамин промывают с добавлением 3 мл горячей бидистиллированной воды. Смесь после нагревания можно центрифугировать при 3000 мин⁻¹ в течение 10–15 мин.

К полученному желтоватому раствору прибавляют 2 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения остальной части белков. Смесь нагревают на водяной бане при 40–50°C в течение 10 мин, после чего снова фильтруют через другой отмытый фильтр в делительную воронку. Остаток на фильтре, как и в первый раз, промывают 3 мл горячей бидистиллированной воды. К фильтрату добавляют двойной объем изоамилового спирта. Смесь энергично встряхивают 2 мин для извлечения мешающих определению тиамин примесей и оставляют до разделения слоев (примерно на 2 ч). Верхний слой – изоамиловый спирт с посторонними флуоресцирующими веществами отбрасывают. Центрифугируют при 3000 мин⁻¹ в течение 15 мин. Нижний, водный, слой делят на две равные части, разливая в делительные воронки (или большие пробирки). Одна служит опытом, другая – контролем.

В опытную пробу вносят смесь, состоящую из 2 мл 1 %-ного раствора красной кровяной соли (калия железистосинеродистого) и 2 мл 30%-ного раствора натрия гидроксида (смесь готовят перед применением и выдерживают 2 мин). В контрольную пробу добавляют 2 мл 30%-ного раствора натрия гидроксида. В обе делительные воронки с приготовленными таким образом растворами приливают по 8 мл изоамилового спирта.

Смесь встряхивают 2 мин, при этом тиохром извлекается изоамиловым спиртом. После разделения слоев (через 6–24 ч) отбрасывают теперь уже нижний, водный, слой, а верхний промывают добавлением 4 мл бидистиллированной воды с последующим встряхива-

нием и отстаиванием. После отстаивания нижний, водный, слой отбрасывают, а верхний переносят в мерную пробирку, доливают изоамиловым спиртом до 8 мл (если есть помутнение, то прибавляют еще 1 мл 96%-ного этилового спирта для просветления) и флуориметрируют.

Одновременно точно так же, как опытные пробы, обрабатывают калибровочный раствор тиамин с содержанием 1 мкг в 1 мл.

Флуориметрия. Настраивают флуориметр по калибровочному раствору тиамин путем регулирования светового потока до тех пор, пока стрелка гальванометра не покажет величину, выбранную для калибровочного раствора (обычно на делении 40 или 80). Используют флуориметр, снабженный чувствительным гальванометром, специфическим светофильтром с максимумом поглощения около 390 нм и одинаковыми пробирками или кюветами из нефлуоресцирующего стекла. В каждую из взятых пробирок вносят около 8 мл испытуемых окисленных и неокисленных изоамиловых растворов (опыт и контроль), а также изоамиловые растворы окисленного и неокисленного калибровочного раствора тиамин и определяют интенсивность флуоресценции по шкале гальванометра.

Расчет количества общего тиамин ведут по формуле:

$$x = \frac{(A - B)K}{H} \cdot 100,$$

где: x – содержание тиамин в 100 мл крови, мкг%; A – показатель гальванометра для опытной пробы; B – показатель гальванометра для контрольной пробы; K – цена одного деления шкалы гальванометра при данном режиме работы, мкг тиамин; H – количество крови, взятой в опытную пробу, мл; 100 – коэффициент для перевода в проценты.

Ход определения общего тиамин в печени. Навеску печени массой 3 г растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком, приливают 15 мл 0,25 моль/л раствора кислоты хлористоводородной, размешивают и выливают в стаканчик Хагедорна или в большую пробирку. Ступку промывают еще 5 мл 0,25 моль/л раствора кислоты хлористоводородной и выливают в этот же стаканчик. Исследование проводят, как описано в методике определения общего тиамин в крови.

Расчет проводят по формуле:

$$x = \frac{(A - B)K}{H},$$

где: x – содержание тиамин, мкг/г; A – показатель гальванометра для опытной пробы; B – показатель гальванометра для контрольной пробы; K – цена одного деления шкалы гальванометра при данном режиме работы; H – масса навески ткани, г.

2.2. Определение общего рибофлавин в крови

Клиническое и диагностическое значение определения общего рибофлавин в крови. Источник рибофлавин – корма, кроме того, он синтезируется бактериями преджелудков и кишечника. Бактериальный синтез рибофлавин наиболее выражен у жвачных животных, поэтому при рациональном их кормлении они не испытывают недостатка этого витамина. В слизистой оболочке кишечника, в печени и других тканях рибофлавин при участии АТФ фосфорилируется и превращается в активные соединения – коферменты флавин-мононуклеотид (ФМН) и флавин-адениннуклеотид (ФАД).

Оба они участвуют в окислительно-восстановительных процессах в составе дегидрогеназ и оксидаз. ФМН служит коферментом дегидрогеназ, которые катализируют окислительное дезаминирование некоторых аминокислот и других веществ. ФАД является коферментом дегидрогеназ (в-окисления жирных кислот, сукцинаддегидрогеназы, ксантинкиназы и других ферментов).

У здоровых животных в крови 8–15 мкг%, в печени 39,6–46,6 мкг/г общего рибофлавин. Снижение содержания рибофлавин в крови и печени отмечается при недостаточном его поступлении с кормом, даче животным внутрь антибиотиков, аминазина, обладающих антивитаминым действием и подавляющих бактериальный синтез. При гиповитаминозе B_2 уровень рибофлавин в крови телят составляет 6 мкг% и ниже.

Принцип. Метод основан на экстракции различных форм рибофлавин из крови при помощи трихлоруксусной кислоты с последующим кислотным гидролизом флавинадениндинуклеотида (ФАД) и флуориметрическим определением содержания общего рибофлавина.

Реактивы: 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 4 моль/л раствор калия фосфата двузамещенного; 10%-ный раствор натрия гидросульфата в 5%-ном растворе натрия гидрокарбоната. Готовят непосредственно перед анализом.

Калибровочный основной раствор рибофлавина, содержащий 100 мкг в 1 мл. Рабочий калибровочный раствор рибофлавина с содержанием 20 мкг в 1 мл: 10 мл осеовного раствора разводят до 50 мл дистиллированной водой.

Оборудование: пробирки центрифужные; пипетки на 1 мл; пробирки с притертыми пробками; термостат; флуориметр.

Ход определения. Первый вариант. В центрифужную пробирку вносят 2 мл оксалатной крови и 8 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (или 2 мл крови, 3 мл дистиллированной воды и 5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты). Тщательно перемешивают стеклянной палочкой, оставляют в темноте на 60 мин. Затем содержимое пробирки снова перемешивают и центрифугируют при 3000 мин⁻¹ в течение 30 мин. Прозрачную надосадочную жидкость помещают в термостат при температуре 37–38 °С на 20 ч или при комнатной температуре на 2 сут. для гидролиза ФАД. После этого пробирку охлаждают и к 8 мл гидролизата приливают 2 мл 4 моль/л раствора K₂HPO₄, перемешивают и оставляют стоять 1–2 ч в темноте для нейтрализации. Затем измеряют флуоресценцию при помощи флуориметра с первичным светофильтром, имеющим максимум поглощения около 420 нм, и со вторичным – с максимумом поглощения около 560 нм.

Для измерения нейтрализованный раствор вносят в кювету флуориметра и делают первый замер интенсивности флуоресценции (P₁). Затем сливают из кюветы испытуемую жидкость обратно в пробирку и добавляют туда 0,1 мл рабочего калибровочного раствора рибофлавина (0,1 мл содержит 2 мкг рибофлавина) и получают раствор, содержащий 0,2 мкг в 1 мл. Полученный раствор снова измеряют на флуориметре и получают второй замер (P₂). После этого гасят флуоресценцию, приливая 0,5 мл 10%-ного раствора NaHS₂P₄. Сразу после добавления этого раствора во избежание частичного обратного окисления рибофлавина производят третий замер (P₃).

Расчет содержания рибофлавина (x) ведут по формуле:

$$x = \frac{\text{Количество мкг рибофлавина в 1 мл стандарта } (P_1 - P_3)}{\text{Количество мл крови } (P_2 - P_1)} \cdot 100$$

Второй вариант. Вытяжку и калибровочный рабочий раствор рибофлавина вносят в две одинаковые пробирки или кюветы и измеряют интенсивность их флуоресценции посредством флуориметра по шкале гальванометра. В обе пробирки прибавляют на кончике шпателя NaHCO₃ и NaHS₂O₄ (примерно по 0,1 г) для гашения флуоресценции рибофлавина и снова измеряют флуоресценцию.

Расчет содержания рибофлавина ведут по формуле:

$$x = \frac{(A - B) \cdot 20 \cdot VV_2}{BnV_1} \cdot 100,$$

где: x – содержание рибофлавина, мкг%; A – показания флуориметра для испытуемого раствора (первый отсчет); B – показания флуориметра для испытуемого раствора после погашения (второй отсчет); B – показания флуориметра для калибровочного раствора, содержащего 20 мкг в 1 мл; 20 – содержание рибофлавина в 1 мл калибровочного рабочего раствора, мкг; n – количество крови, мл; V – общее разведение, мл; V₂ – фильтрат, взятый на окисление, мл; ??? – фильтрат после окисления, мл.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение витаминов B₁ и B₂.
2. Как проявляется гиповитаминоз B₁ и B₂ в организме животных?
3. Суточная потребность разных видов животных в витаминах B₁ и B₂.
4. Какие корма считаются источниками витаминов B₁ и B₂?
5. В каких органах и субстратах организма синтезируются витамины B₁ и B₂?

Занятие 3. Методы определения витамина токоферола (E) и аскорбиновой кислоты (C)

- 3.1. Определение токоферолов в плазме крови.
- 3.2. Определение аскорбиновой кислоты в плазме крови.

3.1. Определение токоферолов в плазме крови с α, α-дипиридилем (2, 2-дипиридил)

Клиническое и диагностическое значение определения токоферолов в плазме крови с α, α-дипиридилем (2, 2-дипи-

ридил). Богаты токоферолами растительные масла, зародыши пшеницы, ячменя и других злаковых культур. Всасываются токоферолы в тонком кишечнике при наличии в корме жиров. Непосредственное участие в этом процессе принимают желчные кислоты. Основная функция токоферола – регуляция интенсивности свободных радикалов в клетках, ограничение скорости процессов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот в липидах биологических мембран. Благодаря токоферолу обеспечивается стабильность клеточных мембран. Токоферолы защищают витамин А от перекисного окисления, являются синергистами селена – тормозят перекисное окисление липидов. Селен как кофактор глутатионпероксидазы участвует в инактивировании гидропероксидов липидов.

Недостаточность токоферола сопровождается усилением процессов перекисного окисления липидов, атрофией семенников и бесплодием, рассасыванием плода на ранних сроках беременности, мышечной дистрофией, некрозами печени и мозга и т. д.

В норме сыворотка крови здоровых животных содержит 0,6–1,4 мг% (14–34 мкмоль/л) токоферолов. У новорожденных животных их 0,3–0,5 мг% (7–12 мкмоль/л). Причина гиповитаминоза Е – недостаток в кормах токоферолов, плохое их усвоение вследствие заболевания печени, желудка и кишечника. Уровень витамина Е в крови также зависит от степени обеспеченности организма (β-липопротеидами, ответственными за транспорт токоферолов в организме).

Принцип. Метод основан на окислении токоферолов хлорным железом и определении образовавшегося Fe в виде окрашенного комплекса с α, α'-дипиридилем, обладающим максимумом поглощения при 520 нм. Поправка на каротиноиды вносится по поглощению при 460 нм. Эфиры токоферолов при их определении гидролизуют KOH в присутствии аскорбиновой кислоты. Свободный токоферол определяют без окисления.

Реактивы: абсолютный этиловый спирт, перегнанный над таблетками калия гидроксида (KOH) и кристаллами калия перманганата. Очистка от альдегидов: этиловый спирт перегоняют над таблетками калия и кристаллами перманганата калия, выбрасывая первую и последнюю фракции (до 10% общего объема); концентрированный раствор калия гидроксида – 50 г KOH в 50 мл дистиллированной воды; 10%-ный раствор кислоты аскорбиновой в дистиллированной воде. Готовят непосредственно перед опытом и нейтрализуют несколько-

ми каплями концентрированной KOH; 0,3%-ный раствор α, α'-дипиридила в *n*-пропиловом спирте. Сохраняют в склянке из темного стекла; ксилол очищенный (х. ч.). Препарат встряхивают в делительной воронке с 3–4 порциями концентрированной серной кислоты, пока кислотный слой не перестанет окрашиваться, промывают водой, насыщенным раствором перманганата калия, вновь водой до удаления окраски перманганата калия, сушат над безводным сульфатом натрия и перегоняют, отбрасывая первые и последние 10% отгона; 0,12-ный раствор хлорного железа в абсолютном этиловом спирте. Сохраняют в темной склянке; D, L-α-токоферол, калибровочный раствор в абсолютном спирте этиловом концентрацией 100 мкг/л.

Оборудование: фотоэлектроколориметр или спектрофотометр; пробирки 18 x 1,5 см с притертыми пробками; пробирки центрифужные; центрифуга.

Ход определения свободного токоферола. К 2 мл плазмы (сыворотки) крови приливают 1 мл дистиллированной воды и 3 мл абсолютного этилового спирта, добавляемого по каплям при перемешивании.

Доливают 5 мл ксилола, закрывают пробкой, интенсивно перемешивают 6 мин и центрифугируют 5–10 мин при 3000 мин⁻¹. Отбирают 3 мл ксилолового экстракта, измеряют его оптическую плотность при длине волны 460 нм (поправка на каротиноиды) против воды, прибавляют 1 мл раствора α, α'-дипиридила в *n*-пропиловом спирте, перемешивают, добавляют 1 мл раствора FeCl₃·6H₂O, тщательно перемешивают и точно через 2 мин фотометрируют при длине волны 520 нм против воды. Одновременно таким же образом обрабатывают контроль на реактивы, содержащий вместо плазмы (сыворотки) крови 2 мл воды. Для определения содержания токоферолов рассчитывают оптическую плотность токоферолов по формуле:

$$D_e = D_{520} - (D_k + 0,217)D_{460},$$

где: D_e – оптическая плотность токоферолов; D_{520} – оптическая плотность опытной пробы при 520 нм; D_k – оптическая плотность контрольной пробы при 520 нм; 0,217 – экспериментально определенная поправка на оптическую плотность, обусловленную присутствием каротиноидов; D_{460} – оптическая плотность опытной пробы при 460 нм.

Концентрацию свободного токоферола рассчитывают по калибровочной кривой, для построения которой используют калибровоч-

ный раствор D, L – α -токоферола при содержании последнего от 10 до 100 мкг в пробе.

Ход определения суммарного токоферола и его эфиров. В пробирках 18 x 1,5 см с притертыми пробками смешивают 2 мл плазмы (сыворотки) крови, 1 мл 10%-ного раствора аскорбиновой кислоты, 0,2 мл концентрированной КОН и 3 мл абсолютного спирта. Вносят в пробирки шарики или осколки кварцевого стекла, накрывают их небольшими воронками и помещают на 10 мин в кипящую водяную баню так, чтобы пробирки были углублены в воду на 2 см. Верхнюю часть пробирок охлаждают током воздуха из воздуходува. Через 10 мин пробирки охлаждают холодной водой, добавляют 5 мл ксилола, интенсивно перемешивают 8 мин, центрифугируют 5–10 мин при 3000 об/мин и далее обрабатывают, как описано выше.

Содержание эфиров токоферола рассчитывают по разности между количеством суммарного и свободного токоферола. По данным ряда авторов, содержание свободного токоферола в плазме крови в 6–6,5 раза больше эфиров.

Примечания. 1. Желательно работать в затемненном помещении и проводить фотометрирование через строго определенное время после добавления дипиридила, так как окраска нестабильна. 2. Сыворотку (плазму) крови можно хранить при комнатной температуре в течение 1 сут., при 5 °С 2 нед. и при минус 20°С 2 мес.

3.2. Определение витамина С в плазме крови

Клиническое и диагностическое значение определения витамина С в плазме крови. Аскорбиновая кислота участвует в различных обменных реакциях: гидроксирование пролина при синтезе коллагена; превращение 3,4-диоксифенилэтиламина в норадреналин; превращение кортикостероидов и трансферина, и т. д. Всасывается она в желудочно-кишечном тракте, главным образом в тонком кишечнике. Уровень аскорбиновой кислоты в сыворотке крови животных колеблется в пределах 0,2–1,5 мг%. В плазме крови он несколько выше, чем в сыворотке. Снижение содержания в сыворотке крови до 0,3–0,4 мг% и ниже сопровождается клиническими симптомами гиповитаминоза.

Принцип. Аскорбиновая кислота (витамин С) восстанавливает трехвалентное железо в двухвалентное. Последнее образует с α , α' -дипиридилком комплексное соединение розового цвета.

Реактивы: 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 5 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 95 мл дистиллированной воды; 40%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. 40 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 60 мл дистиллированной воды; 3%-ный раствор железа хлорного. 1,5 г хлорного железа растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Хранят не более 3 суток; 1%-ный раствор α , α' -дипиридила. В воде α , α' -дипиридил растворяется плохо, поэтому навеску его необходимо смочить 96%-ным этиловым спиртом. К 0,5 г α , α' -дипиридила приливают 4 мл спирта, а затем в мерной колбе на 50 мл доливают дистиллированной водой до метки; 85%-ная фосфорная кислота; аскорбиновая кислота.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; центрифуга; центрифужные пробирки; мерные колбы на 50 и 100 мл.

Ход определения. К 2 мл плазмы крови добавляют 0,3 мл охлажденного 40%-ного раствора ТХУ, перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 мин на холоде (в воде со льдом) с целью более полной денатурации белков. Центрифугируют 20 мин при 2000 мин⁻¹. К 1 мл надосадочной жидкости прибавляют 0,5 мл бидистиллированной воды, 0,1 мл 85%-ного раствора фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора α , α' -дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора FeCl₃. Содержимое пробирки после добавления каждого реактива тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин для развития окраски. Окраска стабильна в течение 1 сут. По истечении 30 мин пробы центрифугируют при 2000 мин⁻¹ и колориметрируют на ФЭКе при длине волны 525 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм против контрольной пробы (вместо надосадочной жидкости берут дистиллированную воду, а затем поступают так же, как с опытной пробой).

Расчет содержания витамина С ведут с помощью калибровочного графика. 33,3 г аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл 5%-ного раствора ТХУ. 10 мл этого раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки 5%-ный раствор ТХУ. В 6 мерных колб на 100 мл вносят последовательно 4, 6, 8, 10, 20 и 30 мл стандартного раствора и доводят объем до метки дистиллированной водой. По 1,5 мл раствора из каждой колбочки вносят в центрифужные пробирки, прибавляют по 0,1 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора α , α' -дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора FeCl₃, перемешивают, ставят на 30 мин для проявления окраски.

Перед колориметрированием пробы центрифугируют 5 мин при 2000 мин⁻¹. Полученные результаты изображают графически на миллиметровой бумаге.

Примечания: 1. Стандартные растворы аскорбиновой кислоты нестойки. Их готовят непосредственно перед определением. 2. Содержание витамина С в плазме крови при ее хранении снижается. 3. Определять количество витамина С необходимо в свежей плазме, отделенной от форменных элементов в течение 4 ч после отбора проб крови.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение витаминов токоферола и аскорбиновой кислоты в организме животных.
2. Какие патологии развиваются в организме животных и птицы при недостатке токоферола и аскорбиновой кислоты?
3. Суточная потребность животных и птицы в витаминах Е и С.
4. Корма, содержащие максимальное количество витаминов Е и С.

Занятие 4. Методы определения витамина цианкобаламина (В₁₂)

4.1. Определение витамина В₁₂ в биологических жидкостях и тканях

Клиническое и диагностическое значение определения витамина В₁₂ в биологических жидкостях и тканях. Витамин В₁₂ синтезируется микроорганизмами рубца и кишечника. Для синтеза цианкобаламина используют микроэлемент кобальт. В тканях кобаламин образует коферментные формы: метилкобаламин и дезоксиаденозин-кобаламин, которые участвуют в реакциях образования метионина, превращения метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА, в образовании коферментных форм фолатина, а следовательно, в синтезе ДНК и в пролиферации кроветворных клеток.

Недостаток кобаламина отмечается при дефиците протеина, кобальта, болезнях желудочно-кишечного тракта, сопровождаемых нарушением микробиального синтеза витамина В₁₂. Гиповитаминоз В₁₂ характеризуется нормо- или гиперхромной мегалобластической анемией, плохим усвоением белка и как следствие этого исхуданием,

снижением в крови, тканях, рубцовом содержимом концентрации кобаламина.

Принцип. Количественное определение витамина В₁₂ (кобаламин, цианкобаламин) в настоящее время проводится химическими и микробиологическими методами. Наибольшей точностью и специфичностью обладает микробиологический метод.

Содержание витамина В₁₂ в различных биологических субстратах

Содержимое рубца жвачных животных	5–12 мкг %
Печень крупного рогатого скота	300–600 мкг/кг
Почки крупного рогатого скота	200–500 мкг/кг
Мышцы крупного рогатого скота	10–18 мкг/кг
Печень свиньи	60–84 мкг/кг
Кровь крупного рогатого скота	10–18 мг %
Кровь свиньи	5–14 мг %

При гиповитаминозе В₁₂ кобаламина в крови телят и поросят содержится менее 78 нмоль/л, в печени – менее 0,1 мкг/г; выделение метилмалоновой кислоты с мочой возрастает до 30 мкг/л (В. В. Яшин).

Реактивы: 1) культура *Escherichia coli* 13-3. Ее выращивают на агаровых косяках и хранят в холодильнике. Раз в месяц культуру пересевают на свежую агаровую среду и после посева выдерживают 24 часа в термостате при 37° С;

- 2) агаровая среда. Состав агаровой среды в расчете на 100 мл:
 - а) казеиновый кислотный 10%-ный гидролизат - 6 мл;
 - б) калия фосфат двузамещенный - 20 мг;
 - в) железа сульфат разводят в 100 мл дистиллированной воды, отсюда берут 0,5 мл;
 - г) магния сульфат - 20 мг. Указанные компоненты растворяют последовательно в одной порции воды;
 - д) L-аспаргин - 20 мл (L-аспаргин растворяют отдельно с прибавлением нескольких капель 1 н. раствора HCl при слабом подогревании и затем прибавляют к вышеуказанному раствору. pH раствора доводят 1 н. раствором NaOH до 7,0;
 - е) глицерин (10 г глицерина добавляют к 50 мл дистиллированной воды, отсюда берут 1 мл); ж) агар-агар - 1,5 г;
 - з) витамин В₁₂ (из ампулы, содержащей 100 мкг/мл, берут 0,1) - 10 мкг; и) вода дистиллированная - 100 мл.

После подогревания на водяной бане до растворения агара вносят витамин B_{12} , смесь тщательно перемешивают, разливают в пробирки по 50 мл и стерилизуют в автоклаве 15 минут при 10^5 Па (1 атм.);

3) основная среда. Состав основной среды на 1 л:

а) калий фосфорнокислый двузамещенный - 14 г;

б) калий фосфорнокислый однозамещенный - 6 г;

в) натрий лимоннокислый - 1 г;

г) магний сернокислый - 0,2 г;

д) аммоний сернокислый - 2 г;

е) натрия хлорид - 1,0 г;

ж) калия цианид - 2 мг;

з) вода дистиллированная - до 1 л.

Указанные ингредиенты растворяют последовательно в дистиллированной воде. Калия цианид добавляют в виде раствора, в 1 мл которого содержится 0,1–0,2 мг. Конечный pH среды должен быть в пределах 6,8–7,0. Во избежание потемнения при повторных стерилизациях растворы солей и глюкозы (4 г на 1 л дистиллированной воды) готовят и стерилизуют отдельно кипячением в течение 30 минут. Непосредственно перед опытом оба раствора, т.е. основную массу с калия цианидом и раствор глюкозы, смешивают в соотношении 1:1;

4) агар;

5) ацетатный буфер. Готовят растворением в ацетате натрия тригидрата 13,61 г и 6 г 100%-ной уксусной кислоты в 1 л дистиллированной воды;

6) 1 н. раствор NaOH;

7) 0,2 н. раствор NaOH;

8) 1 н. раствор HCl;

9) 0,2 н. раствор NaOH;

10) толуол;

11) витамин B_{12} в ампулах, применяемый для терапевтических целей;

12) дистиллированная вода;

Оборудование: термостат; сушильный шкаф; автоклав; аналитические весы; водяная баня; фарфоровые ступки и пестики; бюретки; мерные колбы на 100, 250 и 1000 мл; мерные цилиндры на 100 мл; воронки; стаканчики на 150–200 мл; пипетки; промывная колба; беззольные фильтры; пробирки 20×160 мм; центрифужные пробирки; марлево-ватные пробки; бактериальная петля.

Ход определения. Обработка содержимого рубца. Содержимое рубца разводят дистиллированной водой в соотношении 1:100. К 1 мл разведения, взятого в пробирку, добавляют 1 мл ацетатного буфера с pH 4,63 и доводят водным раствором калия цианида (концентрация 1,2 мг/л) до объема 20 мл.

Пробирку закупоривают пробкой, перемешивают содержимое и помещают на 15 мин в кипящую баню. После остывания содержимое пробирки взбалтывают и фильтруют через сухой беззольный фильтр в сухую стерильную пробирку. Фильтрат должен быть совершенно прозрачным. Его pH при помощи 1 н. раствора NaOH и 0,2 н. раствора HCl доводят до 6,8–7,0. Этот фильтрат в случае необходимости может храниться в холодильнике в закрытой пробирке до 7 дней.

Обработка ткани печени. Ткань печени, замороженную в жидком кислороде или азоте, растирают в фарфоровой ступке. Берут навеску 100 мг и тщательно растирают с 0,5 мл ацетатного буфера и небольшим количеством вышеупомянутого раствора калия цианида, переносят в колбочку и доводят раствором последнего до 50 мл. Затем колбочки закрывают марлево-ватными пробками и помещают на 15 мин в кипящую водяную баню, дают остыть, фильтруют, разводят дистиллированной водой 1:10 000 и при помощи 1 н. раствора NaOH или 0,2 н. раствора HCl доводят pH до 6,8–7,0.

Обработка ткани мышц. Ткань мышц, замороженную в жидком кислороде или азоте, растирают в фарфоровой ступке. Берут 200 мг ее и тщательно растирают с 1 мл ацетатного буфера и небольшим количеством раствора калия цианида, переносят в колбочку и доводят этим раствором до 20 мл. Затем колбочку закрывают марлево-ватными пробками и помещают на 15 мин в кипящую водяную баню, дают остыть, фильтруют и при помощи 1 н. раствора NaOH или 0,2 н. раствора HCl доводят pH до 6,8–7,0.

Приготовление стандартного раствора витамина B_{12} . Для получения калибровочной кривой используют водный раствор витамина B_{12} , в 1 мл которого содержится 0,1 мкг витамина. Раствор хранят в холодильнике с притертой пробкой под слоем толуола. В день опыта делают дальнейшее разведение в 2000 раз до содержания 0,00005 мкг витамина B_{12} в 1 мл (50 пкг).

Постановка опыта включает приготовление стандартного ряда исследуемых и контрольных образцов.

Стандартный ряд. По стандартному ряду строится стандартная (калибровочная) кривая. Для стандартного ряда готовят 30 одинаковых пробирок (размером 20x160 мм). В каждую пробирку наливают 5 мл основной среды и возрастающее количество раствора витамина B_{12} концентрации 50 мкг/мл, а именно 0, 0,5, 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 мл и дополняют дистиллированной водой до 10 мл. Пробирки с раствором закрывают марлево-ватными пробками и стерилизуют в кипящей водяной бане в течение 30 мин, дают остыть и до посева сохраняют при комнатной температуре.

Исследуемые образцы. Для каждого исследуемого образца берут 6 пробирок (таких же, как для стандартного ряда). Затем в пробирки вносят по 5 мл основной среды и добавляют различные количества исследуемого материала (экстракта) – 0,5; 1,0; 1,5 мл, а на каждую градацию берут две пробирки. Объем раствора во всех пробирках доводят дистиллированной водой до 10 мл и стерилизуют, как стандартный ряд.

Контрольные образцы. 2 мл обработанного материала в пробирке смешивают с 2 мл 0,2 н. раствора NaOH и кипятят в водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения доводят pH раствора до 6,8–7,0 при помощи 10–12 капель 0,2 н. раствора HCl или 0,2 н. раствора NaOH и фильтруют через беззольный фильтр с последующим промыванием дистиллированной водой. Фильтрат переливают в пробирку, содержащую 5 мл опытной среды, дополняют дистиллированной водой до 10 мл и стерилизуют, как и опытные образцы. Для каждого исследуемого материала готовят два таких образца.

Посев. В стандартный ряд исследуемые и контрольные образцы вносят по одной капле из одной и той же пипетки бактериальной взвеси, приготовленной следующим образом. Две центрифужные пробирки с 5 мл опытной среды и 5 мл стандартного раствора витамина B_{12} (50 мкг/мл в каждой) стерилизуют в кипящей водяной бане в течение 30 мин и после охлаждения засевают *E. coli* с твердой агаровой средой. Засеянные пробирки ставят в термостат при 37 °С на 20–24 ч. Затем бактериальную суспензию центрифугируют 15–20 мин при 4000 мин.

Жидкость смывают, осадок промывают, центрифугируя с физиологическим раствором NaCl. Осадок суспензируют в 2 мл физиологического раствора NaCl и полученную взвесь используют для посева. Все пробирки на 20–24 ч помещают в термостат при 37 °С.

Учет интенсивности роста E. coli. По окончании инкубации содержимое каждой пробирки взбалтывают и измеряют мутность на фотоэлектроколориметре (ФЭК-М) при синем светофильтре по шкале, показывающей процент пропускания света. По полученным данным строят калибровочную кривую. При построении стандартной кривой лучше не соединять все полученные точки, а провести плавную кривую между ними. По величине светопропускания трех параллельных пробирок (берут среднее арифметическое) на оси абсцисс находят соответствующее количество витамина в данной пробирке. Для этого откладывают на оси ординат среднее значение мутности для каждой точки стандартного раствора витамина B_{12} , содержащегося в данной пробирке. Затем, учитывая количество обработанного материала, высчитывают концентрацию витамина умножением на разведение. Из полученных величин берут среднюю, а из полученной средней вычитают полученную в контрольном опыте.

Точность и воспроизводимость метода при прочих равных условиях в значительной степени зависят от применяемой культуры *E. coli*, чувствительность которой к витамину B_{12} может значительно меняться в зависимости от условий культивирования – частоты пересева, качества твердой среды, температурного режима и других факторов.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение цианкобаламина в организме.
2. Гиповитаминозы в организме животных и птицы при недостатке витамина цианкобаламина.
3. Кормовые источники витамина B_{12} .
4. Потребность разных видов животных и птицы в цианкобаламине.
5. Синергисты и антогонисты цианкобаламина.

ТЕМА 2. ФЕРМЕНТЫ

Методы определения свойств и активности ферментов

Ферментами называют специфические белки, обладающие каталитической функцией. С участием ферментов осуществляются многочисленные химические процессы, совокупность которых составляет сущность обмена веществ. Влияя на скорость метаболических реакций, ферменты способны эффективно регулировать процессы жизнедеятельности. Подобно неорганическим катализаторам ферменты повышают скорость химических реакций за счет понижения энергии активации. Однако биологические катализаторы обладают более высокой эффективностью в снижении энергии активации и, как правило, осуществляют свою функцию в условиях умеренной температуры, низкого давления и значений pH, близких к нейтральному. Вместе с тем ферменты чувствительны к изменению условий среды, в которой они функционируют, и имеют ряд особенностей, связанных с их белковой природой.

Общие свойства ферментов

Характерные особенности ферментов, их специфичность, чувствительность к изменению температуры и pH среды, а также к наличию активаторов и ингибиторов обусловлены белковой природой биологических катализаторов.

Каталитическая активность фермента связана с наличием в его молекуле особых участков, ответственных за связывание и активирование субстрата, – субстратный и активный центры. Это уникальное сочетание аминокислотных остатков, расположенных в полипептидной цепи на большом расстоянии друг от друга. Сближаясь, они образуют каталитический центр при формировании третичной структуры молекулы. В ферментах-протеидах в образовании каталитических центров участвуют также небелковые компоненты, непосредственно прилегающие к активному участку глобулы. Любое внешнее воздействие, нарушающее нативную конформацию белковой молекулы, приводит к инактивации фермента.

Занятие 5. Методы определения свойств ферментов

5.1. Определение термостабильности ферментов.

5.2. Определение влияния pH среды на активность ферментов.

5.1. Определение термостабильности ферментов

Клиническое и диагностическое значение определения термостабильности ферментов. Температура среды сильно влияет на активность ферментов. Оптимальная температура для действия фермента – температура тела животных, колеблющаяся в диапазоне 36–41°С.

При некотором повышении температуры среды происходит ускорение реакции вследствие повышения энергии активации молекул субстрата. Вместе с тем даже небольшое повышение температуры вызывает ослабление связей, которые поддерживают конформацию молекулы фермента, необходимую для проявления его каталитической активности. Постепенно начинается денатурация фермента, которая резко прогрессирует при температуре, превышающей 50°С. Инактивация фермента при повышении температуры среды необратима. При понижении температуры фермент также уменьшает свою активность. Механизм этого явления неясен. Однако денатурации фермента при охлаждении не происходит, поскольку инактивация фермента в этом случае может быть обратимой.

Принцип метода. Исследуется влияние изменения температуры внешней среды на активность фермента амилазы слюны.

Реактивы: разбавленная слюна (ополаскивают рот дистиллированной водой, а затем, набрав в рот 20-25 мл воды, собирают ее в стаканчик); хлорид натрия, 0,3%-ный раствор; крахмал, 1%-ный раствор на 0,3%-ном растворе хлорида натрия; реактив Люголя.

Оборудование: штатив с пробирками; стакан (50 мл); спиртовка; термостат; стакан со льдом.

Ход работы. В три пробирки наливают по 2-3 мл разбавленной слюны (амилаза). Слюну в пробирке 1 кипятят в течение 1-2 мин.

Затем во все пробирки добавляют по 4-5 мл крахмала. Пробирки 1 и 2 ставят в термостат (37°С) на 10 мин. Пробирку 3 погружают на 10 мин в лед. По истечении указанного времени во все «пробирки добавляют по 1 капле реактива Люголя. Результаты опыта заносят в таблицу 1 термостабильности ферментов и делают выводы.

Таблица 1. Термолабильность фермента амилазы

№ странички	Фермент	Условия опыта	Субстрат	Инкубация	Окраска с йодом
1	Амилаза	Фермент денатурирован	Крахмал	10 мин, 37°	
2	Амилаза	Фермент нативный	Крахмал	10 мин, 37°	
3	Амилаза	Фермент нативный	Крахмал	10 мин, 0°	

5.2. Определение влияния pH среды на активность ферментов

Клиническое и диагностическое значение определения влияния pH среды на активность ферментов. Для каждого фермента существует оптимум pH, при котором создаются наиболее благоприятные условия для поддержания функционально активной конформации молекулы. Ионизированные при определенном значении pH аминокислотные группы и карбоксильные группы аминокислотных остатков участвуют в поддержании конформации белковой молекулы, необходимой для образования каталитических центров фермента, и способствуют его связыванию с субстратом. При ином значении pH ионизация соответствующих групп изменяется, в результате разрываются связи; обеспечивающие образование каталитических центров, и фермент инактивируется. При очень высоких и очень низких значениях pH, ферменты денатурируются.

Принцип метода. Исследуется активность фермента амилазы слюны при различных значениях pH среды.

Реактивы: двузамещенный фосфат натрия, 0,2 М раствор (А); лимонная кислота, 0,1 М раствор (Б); буферные растворы (pH 5,0: 515 мл раствора смешать с 485 мл раствора Б; pH 6,8: 772,5 мл раствора А смешать с 227,5 раствора Б; pH 8,0: 972,5 мл раствора А смешать с 27,5 мл раствора Б; разбавленная слюна; крахмал, 1%-ный раствор; реактив Люголя.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки; термостат (37°C).

Ход работы. В три пробирки приливают по 2-3 мл буферных растворов с различными pH (5,0; 6,8; 8,0). Во все пробирки добавляют

по 2-3 мл разбавленной слюны (амилаза) и по 4-5 мл раствора крахмала, перемешивают и инкубируют 10 мин в термостате (37°C).

Таблица 2. Показатели активности фермента амилазы в слюне

№ пробирки	Фермент	pH среды	Субстрат	Инкубация	Окраска с йодом
1	Амилаза	5,0	Крахмал	10 мин, 37°C	
2	Амилаза	6,8	Крахмал	10 мин, 37°C	
3	Амилаза	8,0	Крахмал	10 мин, 37°C	

Затем в каждую пробирку добавляют по 1 капле реактива Люголя.

Результаты наблюдения заносят в таблицу 2, показывающую влияние pH на активность амилазы слюны:

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения свойств и активности ферментов.
2. Что означает термолабильность ферментов?
3. Какое влияние оказывает pH среда на физиологическую активность ферментов?
4. Систематизация ферментов по их действию на различные биохимические функции в организме.

Занятие 6. Методы определения специфичности ферментов

- 6.1. Определение специфичности ферментов.
- 6.2. Определение активаторов и ингибиторов ферментов.

6.1. Определение специфичности ферментов

Клиническое и диагностическое значение определения специфичности ферментов. Ферменты отличаются от неорганических катализаторов необычайно высокой специфичностью. Начальным этапом каталитического акта является образование фермент-субстратного комплекса, т. е. связывание субстрата с каталитическим центром фермента. Пространственная конформация субстрат-

ного центра должна находиться в точном геометрическом соответствии со структурой молекулы субстрата. Только в этом случае возможно образование фермент-субстратного комплекса и осуществление каталитической функции фермента. Таким образом, сущность специфичности ферментов состоит в том, что субстрат подходит к ферменту, как ключ к замку.

Принцип метода. Исследуется воздействие ферментов амилазы и сахаразы на различные субстраты – крахмал и сахарозу.

Реактивы: крахмал, 1%-ный раствор; сахароза, 2%-ный раствор; разбавленная слюна; сахароза, раствор (10 г дрожжей гомогенизируют в 100 мл воды); реактив Люголя; реактив Фелинга.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки; термостат; спиртовка.

Ход работы. В пробирки 1 и 2 наливают по 4–5 мл раствора крахмала, в пробирки 3 и 4 – по 4–5 мл раствора сахарозы. В пробирки 1 и 3 добавляют по 2–3 мл разбавленной слюны (амилаза), в пробирки 2 и 4 – по 2–3 мл раствора сахаразы. Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют 10 мин в термостате (37°C). Затем в пробирки 1 и 2 добавляют по 1 капле реактива Люголя, в пробирки 3 и 4 – по 1–2 мл реактива Фелинга и нагревают. Наблюдения записывают в таблицу 3 специфичности ферментов амилазы и сахаразы:

Таблица 3. Показатели специфичности ферментов

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Инкубация	Окраска с йодом	Реакция Фелинга
1	Крахмал	Амилаза	10 мин, 37°C		
2	Крахмал	Сахароза	10 мин, 37°C		
3	Сахароза	Амилаза	10 мин, 37°C		
4	Сахароза	Сахароза	10 мин, 37°C		

6.2. Определение активаторов и ингибиторов ферментов

Клиническое и диагностическое значение определения влияния активаторов и ингибиторов ферментов. Регуляция деятельности ферментов осуществляется как в клетке, так и вне ее пути присоединения к молекуле, фермента ряда низкомолекулярных

веществ. Такие вещества могут служить положительными или отрицательными эффекторами. Положительные эффекторы, или активаторы, присоединяясь к молекуле неактивного предшественника, способны изменять ее конформацию с образованием соединения, обладающего каталитической активностью. Функцию активаторов часто выполняют ионы металлов и некоторые анионы. Угнетающее действие отрицательных эффектов (ингибиторов) реализуется путем изменения нативной конформации фермента. Ингибиторами могут быть неорганические соли, метаболиты, гормоны. Место прикрепления эффектора к молекуле фермента называется аллостерическим центром.

Принцип метода. Исследуется, активность амилазы слюны в присутствии соединений, обладающих свойствами положительных и отрицательных эффекторов.

Реактивы: разбавленная слюна; крахмал, 1%-ный раствор; хлорид натрия, 1%-ный раствор; сульфат меди, 1%-ный раствор; реактив Люголя.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки; термостат.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 4–5 мл раствора крахмала, в пробирку 1 добавляют 1–2 мл раствора хлорида натрия, в пробирку 2–1–2 мл раствора сульфата меди. В обе пробирки приливают по 1–2 мл разбавленной слюны, содержимое пробирок перемешивают и пробирки инкубируют 10 мин в термостате (37°C). Затем в обе пробирки добавляют по 1 капле реактива Люголя. Наблюдения заносят в таблицу 4, показывающую влияние хлорида натрия и сульфата меди на активность амилазы.

Таблица 4. Показатели активности фермента амилазы

№ пробирки	Фермент	Эффект	Субстрат	Инкубация	Окраски с йодом
1	Амилаза	NaCl	Крахмал	10 мин, 37°C	
2	Амилаза	CuSO ₄	Крахмал	10 мин, 37°C	

Согласно классификации, разработанной Международной комиссией по ферментам, все ферменты подразделяются на шесть главных классов в соответствии с характером катализируемой ими

реакции: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения специфичности ферментов.
2. Какие показатели и свойства характеризуют специфичность ферментов.
3. Что представляют собой активаторы и ингибиторы ферментов.

Занятие 7. Методы определения активности ферментов

ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Оксидоредуктазы – класс ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции.

- 7.1. Определение активности фермента дегидрогеназы янтарной кислоты.
- 7.2. Определение активности каталазы крови

7.1. Определение активности фермента дегидрогеназы янтарной кислоты

Клиническое и диагностическое значение определения активности дегидрогеназы янтарной кислоты. Дегидрогеназа янтарной кислоты (сукцинатдегидрогеназа) – фермент, катализирующий окисление янтарной кислоты. Коферментом является флавинадениндинуклеотид (ФАД). В клетках фермент прочно связан с мембраной митохондрий. Восстановленный фермент легко отдает водород, акцептором которого могут быть восстанавливающиеся красители.

Принцип метода. Водород, отщепляемый от янтарной кислоты под влиянием фермента дегидрогеназы, восстанавливает метиленовую синь (М. С.), превращая ее в бесцветное соединение (М.С.Н₂).

Реактивы: мышца свежая (измельченная в мясорубке); гидроокись натрия, 10%-ный раствор; янтарная кислота, 3%-ный раствор (3 г янтарной кислоты растворяют при нагревании в 97 мл воды и нейтрализуют по индикаторной бумаге 10%-ным раствором гидро-

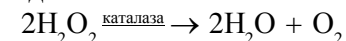
ксида натрия до рН 7,4); метиленовая синь, 0,001%-ный водный раствор; вазелиновая или растительное масло; трехлоруксусная кислота, 20%-ный раствор.

Оборудование: ступка с пестиком; стеклянный песок; штатив с пробирками; пипетки; водяная баня (50°С); термометр.

Ход работы. В ступке со стеклянным песком тщательно растирают около 1 г измельченной мышечной ткани, добавляя 3–4 мл раствора янтарной кислоты, и полученный гомогенат переносят поровну в 2 пробирки. В пробирку 1 (контроль) добавляют 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты для разрушения фермента. В пробирке 2 (опыт) фермент активен. В обе пробирки добавляют по 1–2 капли раствора метиленовой сини, перемешивают и заливают поверхность жидкости 0,5–1 мл масла для изоляции от кислорода воздуха. Обе пробирки инкубируют в водяной бане (50° С) в течение 10 мин. По истечении указанного времени наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в пробирке 2.

7.2. Определение активности каталазы крови

Клиническое и диагностическое значение определения активности каталазы крови. Некоторая часть водорода, передаваемого по системе окислительно-восстановительных ферментов, может непосредственно соединяться с кислородом, образуя перекись водорода – ядовитого соединения для клеток. Фермент каталаза, расщепляя перекись водорода, предохраняет клетки от вредного воздействия этого соединения:



Особенно чувствителен к окисляющему действию перекиси водорода гемоглобин, поэтому каталаза эритроцитов имеет особое значение в организме.

Количество каталазы резко повышается у больных пернициозной анемией. Снижение активности каталазы крови наблюдается у больных, страдающих вирусным гепатитом, злокачественными новообразованиями, брюшным тифом, малярией, туберкулезом легких, а также при лейкозе и тейлериозе крупного рогатого скота. Изменение активности каталазы происходит во время беременности: в начальный период – снижение, в последние месяцы – повышение.

Принцип метода. Показателем активности фермента является выделение молекулярного кислорода, образующегося при расщеплении перекиси водорода каталазой крови.

Реактивы: кровь цельная, цитратная; пипетки; перекись водорода, 3%-ный раствор.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки; спиртовки.

Ход работы. В две пробирки наливают по 2–3 мл дистиллированной воды, добавляют по 1–2 капли крови и содержимое пробирки 1 (контроль) нагревают до кипения для разрушения фермента. В пробирке 2 (опыт) фермент активен. В обе пробирки добавляют по 1 мл раствора перекиси водорода. В пробирке 2 наблюдают бурное выделение кислорода.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения активности дегидрогеназы янтарной кислоты и каталазы в крови.
2. Ход работы по определению активности дегидрогеназы янтарной кислоты.
3. Методика определения активности каталазы в крови и его диагностическое значение.

Занятие 8. Методы определения активности ферментов

ТРАНСФЕРАЗЫ

Трансферазы катализируют перенос атомных группировок с одного субстрата на другой. В соответствии с характером транспортируемых групп различают 8 подклассов трансфераз, среди которых имеются аланинаминотрансферазы и фосфоорилазы.

- 8.1. Определение активности аланинаминотрансферазы.
- 8.2. Определение активности фосфоорилазы.

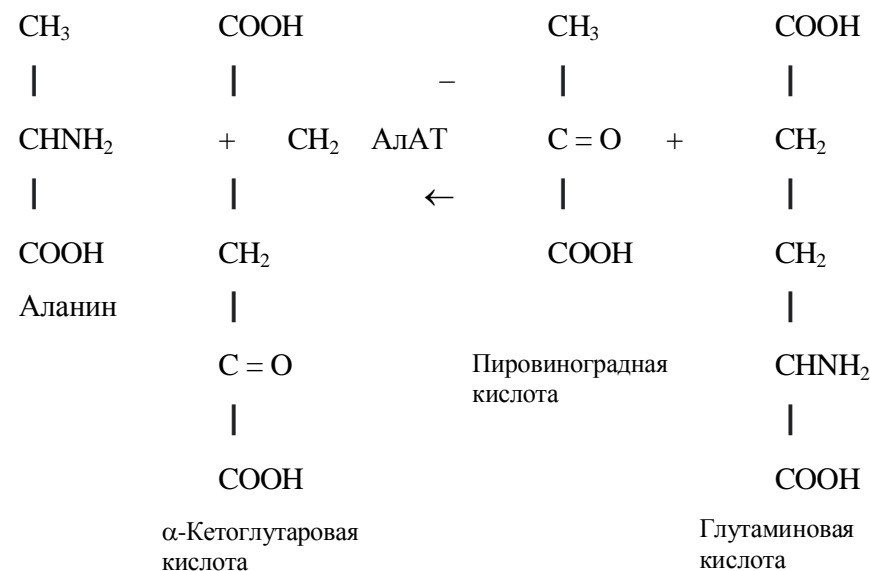
8.1. Определение активности аланинаминотрансферазы

Клиническое и диагностическое значение определения активности аланинаминотрансферазы. К подклассу аминотрансфераз относят ферменты, которые катализируют обратимый перенос аминокислот на кетокислоты (реакция трансаминирования). Коферментом аминотрансфераз служит пиридоксальфосфат (производное витамина B₆).

Определение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) имеет клиническое значение, так как увеличение активности фермента отмечено при заболевании инфекционным гепатитом, инфарктом миокарда, при лейкозе крупного рогатого скота, пневмонии и диспепсии телят.

Активность АлАТ в крови сельскохозяйственных животных и птиц имеет следующие значения (ед./мл): коровы – 35,0; телята α – 34,5; свиньи – 11,1; овцы – 8,8; куры – 23,8.

АлАТ катализирует обратимую реакцию переноса аминокислоты с аланина на α-кетоглутаровую кислоту:



Принцип метода. Метод основан на определении оптической плотности растворов динитрофенилгидразонов пировиноградной кислоты, образующейся в результате деятельности сывороточной АлАТ.

Реактивы: сыворотка крови, свежая, без признаков гемолиза; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; смесь субстратов, раствор (в мерной колбе на 50 мл в 10 мл воды растворяют 0,89 г D,L-аланина или 0,445 г L-аланина; 0,073 г б-кетоглутаровой кислоты; 0,4 г двузамещенного фосфата натрия; 0,07 г однозамещенного фосфата калия, добавляют 0,4 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия, 0,2 мл хлороформа, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают).

Полученный раствор можно хранить в холодильнике в замороженном виде до 5 дней (перед употреблением замороженный раствор должен полностью оттаять); 2,4-динитрофенилгидрозин; 0,1%-ный раствор (0,2 г 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 100 мл воды в мерной колбе на 200 мл, добавляют 40 мл концентрированной соляной кислоты, нагревают на кипящей водяной бане в течение 1-2 мин для растворения реактива и после охлаждения раствора доводят по объему водой до метки); толуол водонасыщенный (250 г толуола в делительной воронке тщательно перемешивают с 20 мл воды, затем отделяют слой толуола); гидроксид калия, 2,5%-ный спиртовой раствор (25 г гидроксида калия растворяют в 1 л спирта. Раствор хранить в склянке, защищенной от углекислого газа воздуха. При появлении мути раствор фильтруют через сухой фильтр).

Оборудование: штатив с пробирками; центрифужные пробирки с притертыми пробками; пипетки; водяная баня (25°C); термометр; центрифуга электрическая; шприц медицинский с резиновой трубкой вместо иглы; ФЭК-М.

Ход работы. В 2 центрифужные пробирки с притертыми пробками вносят по 0,5 мл раствора смеси субстратов и помещают их на 5 мин в водяную баню (25° С), затем в пробирку 1 (опыт) добавляют 0,5 мл сыворотки крови, а в пробирку 2 (контроль) – 0,5 мл воды. Обе пробирки снова помещают в водяную баню (25° С) и инкубируют в течение 10 мин, затем добавляют по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают и оставляют на 5 мин при комнатной температуре. Далее в обе пробирки добавляют по 2,5 мл толуола. Пробирки закрывают пробками и энергично встряхивают в течение 0,5 мин. Для лучшего расслаивания жидкостей полученные эмульсии центрифугируют при 2000 об/мин в течение 5 мин. С помощью сухой градуированной пипетки, соединенной резиновой трубкой со шприцем, осторожно отбирают 1,5 мл толуолового экстракта (верхний слой) и переносят его в чистую сухую пробирку. Добавляют 4,5 мл спиртового раствора гидроксида калия, тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 мин при комнатной температуре. Колориметрируют на ФЭК-М или ФЭКН-57 относительно контрольной пробы с синим светофильтром (470 нм) в кюветах толщиной 1 см между рабочими гранями.

Активность аланинаминотрансферазы выражают числом единиц фермента в 1 мл сыворотки крови (ед/мл). За одну единицу принима-

ют количество фермента, образующее 1 мкг пировиноградной кислоты в стандартных условиях (т. е. при строгом соблюдении метода). 1 мкг пировиноградной кислоты соответствует оптической плотности 0,015.

Расчет ведут по формуле:

$$E = \frac{A}{0,5 \cdot 0,015},$$

где: E - единицы активности фермента АлАТ; A - оптическая плотность раствора в опытной пробирке (показания ФЭК); 0,5 - количество мл сыворотки, взятой для исследования; 0,015 - оптическая плотность, соответствующая одной единице активности фермента.

8.2. Определение активности фосфорилазы

Клиническое и диагностическое значение определения активности фосфорилазы. Фосфорилаза является представителем гликозилтрансфераз. Расщепляя гликозидную связь в молекуле гликогена, фосфорилаза переносит освободившийся остаток глюкозы на неорганический фосфат с образованием глюкозо-1-фосфата. Коферментом фосфорилазы служит пиридоксальфосфат (производное витамина В₆).



Определение активности фосфорилазы позволяет судить об интенсивности гликогенолиза в животных тканях.

Принцип метода. Показателем активности фермента является убыль неорганического фосфата, используемого для расщепления гликогена под влиянием фосфорилазы.

Реактивы: печень свежая; фосфат калия однозамещенный М/15 раствор (А); фосфат натрия двузамещенный, М/15 раствор (Б); фосфатный буфер, рН 7,2 (смешивают 140 мл раствора А с 360 мл раствором Б, рН раствора проверяют по индикаторной бумаге); хлорид натрия, 0,9%-ный раствор; сульфат магния, 0,8%-ный раствор; реактив С (смешать 60 мл фосфатного буфера, 100 мл раствора хлорида натрия и 1 мл раствора сульфата магния); трихлоруксусная кислота, 20%-ный раствор; гликоген, 1%-ный раствор (растворяют в горячей воде); фторид натрия, 0,1 М раствор; серная кислота, 5 н. раствор; молибдат аммония, 2,5%-ный раствор в 5 н. серной кислоте; аскорбиновая кислота, 0,4%-ный раствор свежеприготовленный; фосфат калия однозамещенный (0, 1099 г растворяют в воде, в мерной колбе емкостью 1 л, 1 мл раствора содержит 0,025 мг Р).

Для построения стандартной кривой в 6 пробирок с меткой 20 мл наливают по 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мл стандартного раствора, добавляют, добавляют по 2,0 мл раствора молибдата аммония, по 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, доводят водой до метки и через 30 мин колориметрируют на ФЭКе относительно воды с красным светофильтром в кюветах с расстоянием 1 см между рабочими пространствами. На основании полученных данных строят стандартную кривую.

Оборудование: гомогенизатор; весы торсионные; пробирки с меткой 20 мл; пипетки; термостат (37°C); воронки; штатив с пробирками; фильтры бумажные.

Ход работы. Гомогенизируют 100 мг печени с 5 мл реактива С. В 2 пробирки с меткой на 20 мл переносят по 2 мл полученного гомогената и в пробирку 1 (контроль) добавляют 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирка 2 – опытная. В обе пробирки добавляют по 1 мл раствора гликогена и по 1 мл раствора фторида натрия. Обе пробирки инкубируют в течение 30 мин в термостате (37°C). Затем в пробирку 2 добавляют 1 мл трихлоруксусной кислоты, содержимое обеих пробирок доводят водой до метки 20 мл, перемешивают и фильтруют. В мерные пробирки на 20 мл переносят 1 мл фильтрата, добавляют 2 мл раствора молибдата аммония и 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, доводят водой до метки, перемешивают и через 30 мин колориметрируют на ФЭКе.

Активность фосфорилазы выражают количеством микромолей глюкозо-1-фосфата, образуемого за 1 мин ферментом, содержащимся в 1 г ткани (единица активности *E*).

Расчет ведут по формуле:

$$E = \frac{(b - a) \cdot 20 \cdot 5}{0,031 \cdot 2 \cdot c \cdot 30},$$

где: *E* – активность фосфорилазы; *b* – количество фосфора (мг) в контрольной пробирке, найденное по стандартной кривой; *a* – количество фосфора (мг) в опытной пробирке, найденное по стандартной кривой; 20 – общий объем фильтрата, мл; 5 – общий объем гомогената, мл; 2 – количество гомогената (мл), взятое для исследования; 0,031 – количество фосфора (мг), содержащееся в 1 мкмолье глюкозо-1-фосфата; *c* – навеска ткани, г; 30 – время инкубации, мин.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения активности аланинаминотрансферазы и фосфорилазы в крови.
2. Реактивы, используемые для определения аланинаминотрансферазы.
3. Расскажите ход определения фосфорилазы в крови животных.

Занятие 9. Методы определения активности ферментов

ГИДРОЛАЗЫ

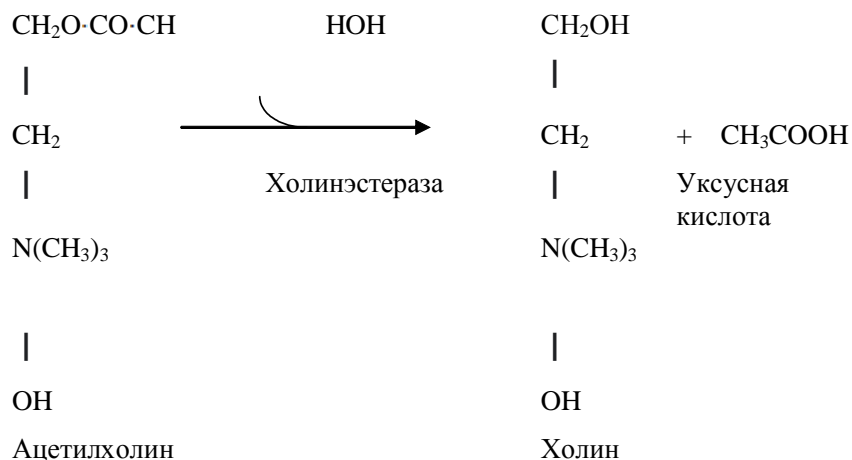
Гидролазами называют большой класс ферментов, катализирующих процессы расщепления различных химических связей с участием воды (реакции гидролиза).

- 9.1. Определение активности холинэстеразы.
- 9.2. Определение активности щелочной фосфатазы.

9.1. Определение активности холинэстеразы

Клиническое и диагностическое значение определения активности холинэстеразы. Холинэстераза (подкласс эстераз) катализирует гидролитическое расщепление ацетилхолина с образованием холина и уксусной кислоты.

В крови основная масса холинэстеразы содержится в эритроцитах и значительно меньше в плазме крови и в сыворотке. Уровень холинэстеразы в сыворотке крови уменьшается при заболеваниях печени; повышается у животных, больных ящуром.



Принцип метода. Показателем активности холинэстеразы является нарастание в среде свободной уксусной кислоты, отщепившейся от ацетилхолина за счет деятельности фермента, содержащегося в сыворотке крови. Количество уксусной кислоты определяют титрованием.

Реактивы: гидроксид натрия, 0,1 н. раствор; гидроксид натрия 0,005 н. раствор (разбавляют 0,1 н. раствора в 20 раз, годен в течение одного дня); хлорид натрия, 0,9%-ный раствор (рН раствора доводят до 7,6 по индикаторной бумаге при помощи 0,005 н. раствора гидроксида натрия); бромтимолблау, 0,05 %-ный водный раствор свежеприготовленный (индикатор в кислой среде - желтый, в слабощелочной - голубой; ацетилхолин, 2%-ный раствор (содержимое одной ампулы промышленного препарата ацетилхолина, 0,2 г, растворяют в 10 мл свежеекипяченой дистиллированной воды); сыворотка крови свежая без признаков гемолиза.

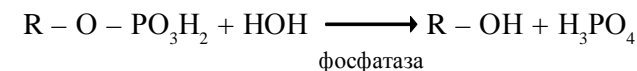
Ход работы. Берут две пробирки. В пробирку 1 (контроль) переносят 1,9 мл, а в пробирку 2 (опыт) – 1,8 мл раствора хлорида натрия (рН 7,6). В опытную пробирку добавляют 0,1 мл раствора ацетилхолина. В обе пробирки переносят по 0,1 мл сыворотки крови и по 1 мл раствора бромтимолблау. Жидкость в пробирках должна быть окрашена в одинаковый голубой цвет. В случае необходимости в пробирку 2 добавляют 1–2 капли 0,005 н. раствора гидроксида натрия для выравнивания окраски в пробирках. Обе пробирки помещают в тер-

мостат (37°C), где инкубируют в течение 30 мин. Раствор в пробирке 2 окрашивается в желтый цвет вследствие изменения рН раствора (освобождается уксусная кислота). Содержимое пробирки 2 оттитровывают из микробюретки 0,005 н. раствором гидроксида натрия до перехода желтой окраски в голубую (одинаковую с окраской раствора в пробирке 1).

Активность холинэстеразы выражают количеством мл 0,005 н. раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование уксусной кислоты, освободившейся из ацетилхолина в течение 30 мин за счет деятельности фермента, содержащегося в 0,1 мл сыворотки крови.

9.2. Определение активности щелочной фосфатазы

Клиническое и диагностическое значение определения активности щелочной фосфатазы. Щелочная фосфатаза катализирует гидролиз моноэфиров ортофосфорной кислоты (оптимум рН 9,2–9,6):



Повышение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови наблюдается при заболеваниях печени и поджелудочной железы, а также костной системы (при рахите, остеомалации и других нарушениях, которые могут быть вызваны гиперпаратидеозом или гиповитаминозом D). У здоровых кур повышение активности фермента наблюдается в период яйцекладки и патологическое повышение – при заболевании желточным перитонитом. Активность щелочной фосфатазы понижается при диспепсии телят в лейкозе. Ниже приведены данные об активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови у здоровых животных (ед. Боданского):

Телята (4–8 дн.)	3,87
Поросята	4,26
Телята (12 мес.)	2,48
Свиньи	3,90
Коровы	1,57
Куры	9,00

Принцип метода. Показателем активности фермента является прирост неорганического фосфата, отщепляемого от глицерофосфата под действием щелочной фосфатазы сыворотки крови.

Реактивы: сыворотка крови, свежая без признаков гемолиза; гидроксид натрия, 0,1 н. раствор; глицерид натрия, 0,1 н. раствор; глицерофосфат, раствор (0,85 г медиала и 10 г патентованного препарата глицерофосфата в гранулах, содержащего 10 частей глицерофосфата кальция, 2 части глицерофосфата натрия и 88 частей сахара, растворяют в 150 мл воды в мерной колбе емкостью 200 мл за день до опыта. Затем добавляют 5,6 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия и доводят водой до метки. Раствор перемешивают и фильтруют. pH раствора доводят до величины 9,2-9,6 по индикаторной бумаге с помощью 0,1 н. раствора гидроксида натрия, консервируют 3 мл петролейного эфира и хранят в холодильнике); трихлоруксусная кислота, 10%-ный раствор в 5 н. серной кислоте; аскорбиновая кислота, 0,4%-ный раствор; фосфат калия, однозамещенный раствор (0,025 мгР/мл) для построения стандартной кривой (в 5 пробирок с меткой 10 мл переносят по 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 стандартного раствора, проводят цветную реакцию на фосфор и колориметрируют).

Ход работы. В две пробирки переносят по 1 мл сыворотки крови. В пробирку 1 (контроль) тотчас же приливают 4 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирка 2 – опытная. В обе пробирки добавляют по 5 мл раствора глицерофосфата и помещают их в термостат (37°C) на 30 мин. По истечении указанного времени в пробирку 2 добавляют 4 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирок перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. В мерные пробирки с меткой 10 мл переносят по 5 мл фильтрата, проводят цветную реакцию на фосфор и колориметрируют.

Активность щелочной фосфатазы выражают количеством фосфора (мг), которое способно отщепить в течение 1 ч фермент, содержащийся в 100 мл сыворотки крови.

Расчет ведут по формуле:

$$E = \frac{(a - b) \cdot 10 \cdot 100 \cdot 60}{5 \cdot 30},$$

где: E - активность щелочной фосфатазы; a - количество фосфора (мг) в опытной пробирке, найденное по стандартной кривой; b - количество фосфора (мг) в контрольной пробирке, найденное по стандартной кривой; 5 - количество фильтрата (мл), взятого для цветной реакции; 10 - общий объем фильтрата, мл; 100 - количество сыворотки (мл); 30 - время инкубации, мин; 60 - время в минутах для пересчета активности фермента за 1 ч.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения активности холинэстеразы и щелочной фосфатазы в крови.
2. Ход определения активности холинэстеразы в крови.
3. Оборудование и реактивы для определения щелочной фосфатазы в крови животных.
4. Ход определения лабораторного анализа щелочной фосфатазы в крови.

Занятие 10. Методы определения активности ферментов

ГИДРОЛАЗЫ

- 10.1. Определение активности амилазы.
- 10.2. Определение активности протеиназы.

10.1. Определение активности амилазы

Клиническое и диагностическое значение определения активности амилазы. Амилаза катализирует гидролитическое расщепление крахмала и гликогена в животном организме. Активность амилазы особенно высока в поджелудочной и слюнных железах, состояние которых до некоторой степени определяет уровень активности фермента в крови. При остром панкреатите активность фермента повышается, а при некрозе поджелудочной железы понижается. Активность сывороточной амилазы может повышаться также вследствие воспаления слюнных желез. Гиперамилаземия наблюдается при прободении язвы двенадцатиперстной кишки и острой непроходимости кишечника. Амилазная активность снижается при нарушениях функционального состояния печени и желчного пузыря, у больных пневмонией, декомпенсированным пороком сердца, при токсикозах беременности. У больных с обширными ожогами кожи наблюдается гиперамилаземия. Уменьшение активности амилазы наблюдается в сыворотке крови у коров, больных лейкозом. Активность амилазы в сыворотке крови здоровых животных, например у коровы, 2,1 мг %, у свиньи – 1,2 мг %.

Принцип метода. Показателем активности фермента является убыль крахмала, расщепляемого под действием сывороточной амилазы.

Для построения стандартной кривой в 5 мерных колбочек емкостью 50 мл наливают по 30–40 мл воды, переносят по 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 мл раствора крахмала, добавляют по 0,5 мл раствора соляной кислоты, по 0,1 мл раствора иода, доводят водой до метки и перемешивают. Колориметрируют через 5 мин на ФЭКе с красным светофильтром относительно воды в кюветах с расстоянием 1 см между рабочими гранями.

Реактивы: крахмал растворимый, 1%-ный раствор; хлорид натрия, 0,5 М раствор; смесь 1%-ного раствора крахмала с 0,5 М раствором хлорида натрия (4:1); фосфатный буфер, pH 7,2; сыворотка крови свежая без признаков гемолиза; соляная кислота, 1 н. раствор; йод, 0,3%-ный раствор в 3%-ном растворе йодистого калия (3 г йодистого калия растворяют в 70 мл воды в мерной колбе емкостью 100 мл добавляют 0,3 г растертого в ступке йода и после растворения йода доводят водой до метки. Раствор хранят в темной склянке).

Оборудование: штатив с центрифужными пробирками; пипетки; микропипетки (0,1 мл); термостат (37°C); центрифуга электрическая; мерные колбы (50 мл); фотоэлектроколориметр.

Ход работы. В 2 центрифужные пробирки наливают по 0,5 мл смеси растворов крахмала и хлорида натрия и по 0,3 мл фосфатной буферной смеси. В пробирку 1 (опыт) добавляют 0,1 мл сыворотки крови, в пробирку 2 (контроль) – 0,1 мл дистиллированной воды. Обе пробирки инкубируют в термостате (37° С) в течение 30 мин. Затем в обе пробирки добавляют по 0,1 мл 1 н. раствора соляной кислоты и центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин. В мерные колбы (50 мл) наливают по 30–40 мл воды, переносят по 0,2 мл центрифугата и проводят цветную реакцию, как это описано для построения стандартной кривой.

Активность амилазы (E) выражают количеством крахмала (мг), которое может расщепить за 30 мин фермент, содержащийся в 100 мл сыворотки. Расчет ведут по формуле:

$$E = \frac{(b - a) \cdot 100}{0,2 \cdot 0,1},$$

где: a – количество мг крахмала в опытной пробирке, найденное по стандартной кривой; b – количество мг крахмала в контрольной пробирке, найденное по стандартной кривой; 100 – пересчет на 100 мл сыворотки; 0,1 – количество мл сыворотки, взятое для исследования; 0,2 – количество центрифугата (мл), взятое для цветной реакции.

10.2. Определение активности протеиназ

Клиническое и диагностическое значение определения активности протеиназ

Протеиназы, или пептидазы, катализируют гидролитическое расщепление пептидных связей в полипептидах и белках, в результате чего отщепляются свободные аминокислоты. Уровень активности протеиназ служит показателем интенсивности белкового обмена в тканях.

Принцип метода. Показателем активности протеиназ является природный небелкового азота за счет протеолитической деятельности ферментов.

Реактивы: печень свежая; уксусная кислота, 0,2 н. раствор (11,3 мл ледяной уксусной кислоты растворяют в воде в мерной колбе емкостью 1 л); уксуснокислый натрий, 0,2 н. раствор (27, 22 г уксуснокислого натрия растворяют в воде в мерной колбе емкостью 1 л); ацетатный буфер, pH 4,6 (520 мл раствора уксусной кислоты смешивают с 480 мл раствора уксуснокислого натрия); трихлоруксусная кислота, 20%-ный раствор; серная кислота концентрированная; пергидроль; реактив Несслера; сернокислый аммоний, раствор (0,05 мгN/мл) для построения стандартной кривой.

Оборудование: гомогенизатор; штатив с пробирками; центрифужные пробирки; пипетки; центрифуга; термостат (37°C); колбы Кьельдаля (25 мл); фотоэлектроколориметр.

Ход работы. 100 мг ткани печени гомогенизируют в 5 мл ацетатного буфера. В 2 центрифужные пробирки переносят по 2 мл гомогената и в пробирку 1 (контроль) тотчас добавляют 2 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирку 2 (опыт) инкубируют в термостате (37° С) в течение 1 ч. Затем в пробирку 2 добавляют 2 мл раствора трихлоруксусной кислоты и обе пробирки центрифугируют. Из опытной и контрольной пробирок отбирают по 2 мл центрифугата, переносят в колбы Кьельдаля и проводят минерализацию и цветную реакцию с реактивом Несслера.

Активность тканевых протеиназ выражают количеством небелкового азота (мг), которое нарастает в течение 1 мин за счет деятельности ферментов, содержащихся в 1 г ткани. Расчет ведут по формуле:

$$E = \frac{(a - b) \cdot 4 \cdot 5}{2 \cdot 2 \cdot c \cdot 6}$$

где: E – активность протеиназ; a – количество мг азота в опытной пробирке, найденное по стандартной кривой; b – количество азота (мг) в контрольной пробирке, найденное по стандартной кривой; 2 – количество центрифугата, взятое для минерализации и цветной реакции; 4 – общее количество центрифугата, мл; 2 – количество гомогената (мл), используемого в опыте и контроле; 5 – общее количество гомогената, мл; c – навеска ткани, г; 60 – время инкубации, мин.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения активности амилазы и протеиназы в крови.
2. Реактивы, используемые при определении амилазы в крови.
3. Ход определения протеиназы в крови.
4. Методика определения активности амилазы в крови животных.

Занятие 11. Методы определения активности ферментов

ЛИАЗЫ

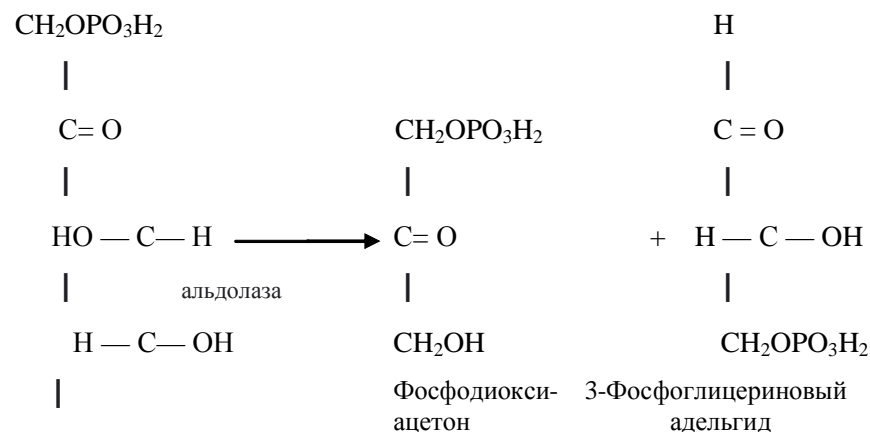
Лиазами называют ферменты, которые катализируют негидролитическое расщепление органических соединений.

11.1. Определение активности альдолазы

Клиническое и диагностическое значение определения активности альдолазы. Альдолаза катализирует процесс расщепления фруктозо-1,6-дифосфата на две фосфотриозы.

Активность альдолазы в сыворотке крови повышается у больных раком, прогрессирующей мышечной дистрофией, при заболеваниях сердца, кровоизлияниях в мозг, при болезни Боткина. В сыворотке крови коров альдолазная активность резко повышается при заболевании тейлериозом.

Принцип метода. Показателем активности фермента является увеличение концентрации фосфотриоз, образующихся при расщеплении фруктозо-1,6-дифосфата, катализируемом сывороточной альдолазой.



Реактивы: сыворотка крови свежая, без признаков гемолиза; гидроксид натрия, 1 н. раствор; гидроксид натрия, 0,6 н. раствор; фруктоза – 1,6-дифосфат; 0,005 М раствор в 0,056 М растворе солянокислого гидразина (250 мг бариевой соли фруктозо-1,6-дифосфата растворяют в 70 мл воды в мерной колбе емкостью 100 мл, добавляют 410 мг солянокислого гидразина, доводят до pH 8,2 с помощью 1 н. раствора гидроксида натрия, доливают водой до метки и перемешивают); соляная кислота, 2 н. раствор; 2,4 динитрофенилгидразин; 0,1%-ный раствор в 2 н. соляной кислоте.

Оборудование: штатив; пробирки центрифужные градуированные (10 мл); пипетки; микропипетки (0,1 мл); термостат (37°C); фотоэлектроколориметр.

Ход работы. В 2 градуированные центрифужные пробирки переносят по 0,1 мл сыворотки крови и в пробирку 1 (контроль) тотчас добавляют 0,1 мл раствора соляной кислоты. Пробирка 2 – опытная. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл раствора фруктозо-1,6-дифосфата и инкубируют 30 мин в термостате (37°C). Затем в пробирку 2 добавляют 0,1 мл раствора соляной кислоты. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл 0,6 н. раствора гидроксида натрия и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем добавляют по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина и снова оставляют на 30 мин при комнатной температуре. По истечении указанного времени в пробирки наливают по 4,5 мл 0,6 н. раствора гидроксида натрия, доводят водой до метки 7 мл, перемешивают и через 5 мин после добавления

щелочи колориметрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром относительно воды в кюветах с расстоянием 1 см между рабочими гранями.

Активность альдолазы выражают в условных единицах экстинкции, которые косвенно отражают прирост фосфотриоз за счет активности фермента, содержащегося в 0,1 мл сыворотки крови. Расчет ведут по формуле:

$$E = (a - b) \cdot 100,$$

где: E - активность альдолазы; a - показания ФЭКа, полученные при колориметрии опытной пробы (экстинкция); b - показания ФЭКа, полученные при колориметрии контрольной пробы (экстинкция); 100 - коэффициент для перевода дробных величин экстинкции в целые числа.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения активности альдолазы.
2. Методика определения альдолазы в крови.
3. Оборудование и реактивы для определения альдолазы в крови.

ТЕМА 3. ГОРМОНЫ

Наряду с витаминами и ферментами гормоны относят к биологически активным органическим веществам. Клетки желез внутренней секреции продуцируют гормоны, которые кровью транспортируются к органам-мишеням. Гормоны оказывают мощное воздействие на биохимические процессы путем регуляции активности многих ферментных систем. Гормональные факторы вместе с нервной системой регулируют физиологические функции организма, способствуя его адаптации к меняющимся условиям внешней среды.

Занятие 12. Методы определения активности гормонов внутренней секреции

12.1. Метод определения инсулина в крови

Клиническое и диагностическое значение определения инсулина в крови. Инсулин оказывает влияние на процессы углеводного обмена несколькими путями. Этот гормон способствует переходу глюкозы из крови в ткани, активируя процессы транспорта в клеточных мембранах; стимулирует фосфорилирование глюкозы в реакциях с АТФ путем усиления синтеза гексокиназы; ингибирует деятельность фермента глюкозо-6-фосфатазы, тем самым предохраняя от расщепления глюкозо-6-фосфатаз. Таким образом, под влиянием инсулина уменьшается количество глюкозы в крови и повышается использование этого сахара клетками.

Принцип метода. Содержание глюкозы в крови кролика определяют по методу Хагедорна-Иенсена до и после подкожной инъекции инсулина.

Реактивы: ксилол; вода теплая; хлорид натрия, 0,9% изотонический раствор (а ампулах); инсулин, раствор (в стерильных условиях к 1 мл раствора промышленного препарата инсулина, содержащему в ампуле 40 ЕД, добавляют 9 мл изотонического раствора хлорида натрия и перемешивают, концентрация полученного раствора 4 ЕД/мл); спирт; иод, настойка; глюкоза, раствор (в ампулах); реактивы для

определения содержания сахара в крови; подопытное животное кролик.

Оборудование: весы с разновесом; вата; игла для взятия крови; шприцы (1-2 мл и 10 мл); стерилизатор; приборы для определения содержания глюкозы в крови.

Ход работы. Взвешивают кролика, предварительно голодавшего в течение суток, и рассчитывают количество раствора инсулина(мл), которая необходима для инъекции (1,5 – 2,0 ЕД/кг массы). Ухо кролика протирают ватой, смоченной ксилолом, смывают ксилол теплой водой и вытирают ухо сухой ватой. Делают укол в ушную вену и набирают сухой микропипеткой 0,1 мл крови для определения содержания глюкозы. Затем кролику вводят подкожно необходимое количество инсулина и через 1 ч повторно берут кровь из ушной вены (0,1 мл) для определения сахара. После этого кролику вводят подкожно глюкозу для предотвращения инсулинового шока. Результат опыта заносят в таблицу 5 и делают вывод о влиянии инсулина на уровень глюкозы в крови.

Таблица 5. Показатели влияния инсулина на уровень глюкозы в крови

Время взятия крови для исследования	Содержание глюкозы в крови (мл%)
До инъекции инсулина	
После инъекции инсулина	

Биуретовая реакция на серосодержащие аминокислоты

Инсулин вырабатывается β -клетками островкового аппарата поджелудочной железы и является гормоном белковой природы, в молекуле которого полипептидные цепи соединены дисульфидными мостиками. Поэтому инсулин дает биуретовую реакцию, характерную для всех белков, и реакцию на серосодержащие аминокислоты.

Принцип метода. Биуретовая реакция; реакция на серосодержащие аминокислоты.

Реактивы: инсулин, раствор (патентованный препарат инсулина в ампулах с концентрацией 40 ЕД/мл разбавляют двойным количеством воды); гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфат меди, 1%-ный раствор; свинец уксуснокислый, 0,5%-ный раствор.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки; спиртовка.

Ход работы. 1. Биуретовая реакция. К 1–2 мл раствора инсулина добавляют равный объем раствора гидроксида натрия и 1–2 капли раствора сульфата меди. В пробирке появляется фиолетовое окрашивание.

2. Реакция на серосодержащие аминокислоты. К 1–2 мл раствора инсулина добавляют равный объем раствора гидроксида натрия и нагревают до кипения. Затем добавляют 2–3 капли раствора уксуснокислого свинца. В пробирке появляется коричневое окрашивание.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения инсулина в крови.
2. Ход лабораторного анализа определения инсулина в крови.
3. Реактивы, используемые для определения инсулина в крови.
4. Оборудование для определения инсулина в крови животных.
5. Биуретовая реакция определения серосодержащих аминокислот.

Занятие 13. Методы определения активности гормонов внутренней секреции

13.1. Адреналин. Влияние адреналина на содержание глюкозы в крови.

13.2. Реакция адреналина с хлорным железом.

Клиническое и диагностическое значение определения влияния адреналина на содержание глюкозы в крови. Адреналин оказывает влияние на обмен углеводов, усиливая расщепление гликогена путем активирования фермента фосфорилазы в тканях. Результат такого воздействия – повышение уровня глюкозы в крови животного.

Принцип метода. Содержание глюкозы в крови кролика определяют по методу Хагедорна – Йенсена до и после подкожной инъекции адреналина.

Реактивы: ксилол; вода теплая; хлорид натрия, 0,9%-ный изотонический раствор (в ампулах); адреналин, раствор (содержимое одной ампулы промышленного препарата адреналина с концентрацией 1 : 1000 в стерильных условиях разбавляют равным количеством

0,9% -ным раствором хлорида натрия); спирт; йод, настойка; реактивы для определения содержания глюкозы в крови; подопытное животное - кролик.

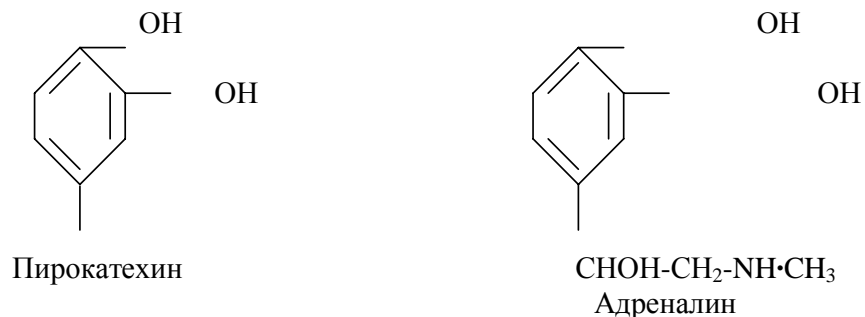
Ход работы. Кролика подготавливают к опыту. Раствор адреналина вводят подкожно из расчета 0,8 мл/кг массы тела кролика. Для анализа на содержание глюкозы (см. с. 219) из ушной вены берут кровь до и через 30 мин после инъекции адреналина. Результаты опыта заносят в таблицу 6 и делают вывод о влиянии адреналина на уровень глюкозы в крови.

Таблица 6. Показатели влияния адреналина на уровень глюкозы в крови

Время взятия крови для исследования	Содержание глюкозы в крови (мг%)
До инъекции адреналина	
После инъекции адреналина	

13.2. Реакция адреналина с хлорным железом

Адреналин является низкомолекулярным соединением, содержащим в молекуле структуру двухатомного фенола – пирокатехина:



Принцип метода. При добавлении к раствору адреналина раствора хлорного железа развивается зеленое окрашивание, появление которого обусловлено наличием остатка пирокатехина в молекуле адреналина.

Реактивы: раствор адреналина; хлорное железо, 1% -ный раствор.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Ход работы. В одну пробирку наливают 1-2 мл воды, в другую 1-2 мл раствора адреналина. В обе пробирки добавляют по 2-3 капли раствора хлорного железа. В пробирке с адреналином появляется зеленое окрашивание.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения влияния адреналина на содержание глюкозы в крови.
2. Ход определения адреналина на содержание глюкозы в крови.
3. Оборудование и реактивы при определении адреналина на содержание глюкозы в крови.
4. Ход определения реакции адреналина с хлорным железом.

Занятие 14. Методы определения активности гормонов внутренней секреции

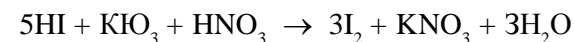
14.1. Тироксин. Обнаружение иода в тиреоидине.

14.2. Фолликулин: а) реакция фолликулина с реактивом Фолина; б) реакция фолликулина с серной кислотой.

14.1. Тироксин. Обнаружение иода в тиреоидине

Клиническое и диагностическое значение определения тироксина в крови. Тироксин и трийодтиронин – гормоны, вырабатываемые клетками щитовидной железы. Эти гормоны многообразно влияют на обменные процессы в организме: стимулируют окислительные процессы, регулируют обмен белков, липидов, углеводов, воды и минеральных веществ, а также процессы роста, развития и дифференцировки тканей. Гормоны щитовидной железы являются низкомолекулярными веществами - йодированными производными аминокислоты тирозина.

Принцип метода. При нагревании тиреоидина (препарат сухой щитовидной железы) с азотной кислотой происходит освобождение органического йода в виде йодистоводородной кислоты, которая окисляется иодноватокислым калием до свободного йода, экстрагируемого хлороформом:



Реактивы: тиреодин в таблетках (промышленный препарат, одна таблетка с массой 0,1 г содержит 0,17-0,23 мг йода); азотная кислота, разбавленная (1:1); калий иодноватокислый, 10%-ный раствор; хлороформ.

Оборудование: ступка с пестиком; штатив с пробирками; пипетки; водяная баня; стакан с водой.

Ход работы. Таблетку тиреоидина растирают в ступке и переносят полученный порошок в пробирку. Добавляют 2 мл раствора азотной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане 3–4 мин. Затем пробирку немного охлаждают, добавляют 2 мл раствора иодноватокислого калия, несколько раз энергично встряхивают и оставляют в стакане с водой для охлаждения. Через несколько минут добавляют 1,0–1,5 мл хлороформа и снова энергично встряхивают несколько раз. Нижний хлороформенный слой окрашивается в розово-фиолетовый цвет.

14.2. Определение гормона фолликулина

- а) Реакция фолликулина с реактивом Фолина.
- б) Реакция фолликулина с серной кислотой.

Клиническое и диагностическое значение определения фолликулина. Фолликулин - женский половой гормон (эстроген). Половые гормоны вырабатываются интерстициальными клетками половых желез и обуславливают формирование вторичных половых признаков, а также реализацию репродуктивной функции женских и мужских особей. Половые гормоны стимулируют окислительные процессы в организме, регулируют биосинтез белков и обмен липидов.

- а) Реакция фолликулина с реактивом Фолина.

По своей химической природе все половые гормоны являются стероидами. К эстрогенам относят фолликулин (эстрон), эстрадиол и эстриол, отличающиеся количеством гидроксильных групп в молекуле.

Принцип метода. С помощью реактива Фолина открывают наличие фенольной группировки в молекуле фолликулина.

Реактивы: реактив Фолина; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; фолликулин, спиртовой раствор (4-5 ампул промышленного препарата фолликулина растворить в 200 мл спирта).

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Ход работы. В пробирку к 1–2 мл раствора фолликулина добавляют равный объем раствора гидроксида натрия и несколько капель реактива Фолина. Появляется синее окрашивание.

- б) Реакция фолликулина с серной кислотой.

Принцип метода. При взаимодействии фолликулина с серной кислотой образуется сложный эфир, окрашенный в желтый цвет.

Реактивы: фолликулин, спиртовой раствор; серная кислота, концентрированная.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки; водяная баня.

Ход работы. В пробирку к 1–2 мл спиртового раствора фолликулина осторожно добавляют 5–6 капель серной кислоты и нагревают на водяной бане до появления желтого окрашивания.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения тироксина в крови.
2. Клиническое и диагностическое значение определения фолликулина в крови.
3. Ход определения обнаружения йода в тироидине.
4. Ход определения реакции фолликулина с реактивом Фолина.
5. Проведение реакции фолликулина с серной кислотой.

ТЕМА 4. АНТИБИОТИКИ

Антибиотиками называют все продукты обмена любых организмов, способные избирательно подавлять рост или убивать микроорганизмы. Являясь естественными продуктами метаболизма, антибиотики действуют по принципу биологической конкуренции, играя роль антагонистов по отношению к патогенным микробам. Большой ростостимулирующий эффект кормовых препаратов объясняется тем, что они кроме антибиотиков в своем составе содержат еще целый ряд биологически активных веществ - продуктов биосинтеза микроорганизмов (витамины, ферменты, гормоноподобные вещества, неидентифицированные факторы роста) и поэтому оказывают комплексное действие на организм животных. Механизм ростостимулирующего эффекта антибиотиков объясняется их влиянием на микрофлору кишечника.

Качество выпускаемых промышленностью кормовых, препаратов, биологически активных веществ антибиотиков, определяется техническими условиями или государственными стандартами. Контроль качества этих препаратов ведется по ряду показателей: внешний вид, влажность, степень размельчения, безвредность, концентраций антибиотика, проверка на подлинность.

Занятие 15. Определение активности антибиотиков в различных субстратах

15.1. Методика определения количества и активности бацитрацина в бацилихине

В животноводстве наиболее часто используют антибиотик бацитрацин, являющийся смесью полипептидов, имеющую антибиотическую активность достигающую до 70 ED.

Промышленное производство бацитрацина ведется с использованием культуры *B. licheniformis*. Процесс получения этого антибиотика складывается из отбора, селекции и поддержания культуры, выращивания споровой и посевной культуры, подготовки посевного материала, биосинтеза бацитрацина в ферментерах, доведения рН куль-

туральной жидкости до 5,4-5,5, осаждения антибиотика в культуральной жидкости, стандартизации, расфасовки и упаковки.

Кормовые препараты бацитрацина выпускаются под названием бацийлихин-10, бацилихин-20, бацилихин-30, соответственно с содержанием 10, 20 и 30 г бацитрацин 1 кг препарата. Требования, предъявляемые к бацитрацину, приведены в таблице 7.

Таблица 7. Органолептические, физико-химические и биологические показатели бацилихина

Показатели	Бацилихин-10	Бацилихин-20	Бацилихин-30
Внешний вид	Однородный порошок от светло-коричневого до коричневого цвета		
Влажность, %, не более	10	10	10
Степень измельчения препарата (остаток на сите № 056), %, не более	5	5	5
Содержание бацитрацина, г/кг*	10±1	20±2	30±3
Безвредность при тест-дозе на одну мышь, мг	100	100	100
Проверка на подлинность: метод хроматографии на бумаге	Наличие фиолетовых Rf=0,5–0,7		
реакция с нингидрином	Окрашивание раствора в темно-пурпуровый цвет		

Примечание: В 1 мг бацитрацина содержится 42 ед.

Клиническое и диагностическое значение определения активности бацитрацина в бацилихине. Основным требованием к качеству бацилихина является содержание в нем бацитрацина. Количество бацитрацина в препарате определяют микробиологическим методом диффузий в агар. Метод основан на способности антибиотика диффундировать в агаровой среде и образовывать зоны задержки роста тест-культуры *Micrococcus flavus* АТОС-10240. Метод является специфическим, точность ±5–10%. Определение содержания бацитрацина методом диффузии в агар включает следующие операции: выращивание тест-культуры, приготовление среды, подготовка рабочего стандарта антибиотика, подготовка испытуемого препарата, ход анализа и расчет активности.

Реактивы: Вода дистиллированная деминерализованная; метанол, хч (ГОСТ 6995-77); раствор гидроокиси натрия 0,1 М (для нейтрализации образцов молока); наборы для количественного определения бацитрацина по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом, включающие следующие компоненты:

1) микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), покрытый антителами к бацитрацину, в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем;

2) комплект стандартных растворов бацитрацина в воде (по 1 см³ каждый, нулевой стандарт - 2 см³) с концентрациями: 0 мкг/кг (нулевой стандарт), 0,000625; 0,00125; 0,0025; 0,005; 0,01 и 0,02 мкг/кг бацитрацина в воде);

3) конъюгат бацитрацина с пероксидазой, концентрат (×100);

4) готовая смесь субстрата с хромогеном;

5) стоп-реагент (1 н серная кислота);

6) буфер для разбавления проб, готовый к употреблению;

7) буфер для разбавления конъюгата, готовый к употреблению;

8) буфер для промывки, концентрат (×30).

Оборудование: Центрифуга настольная (эффективность не менее 2000 g). Ротатор (встряхиватель осевой). Шейкер лабораторный для пробирок типа Вортекс. Гомогенизатор перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (или других видов, или фарфоровые ступки с пестиками). Холодильник бытовой электрический. Конические колбы на 100 см³ ГОСТ 23932-90. Пластиковые центрифужные пробирки (виалы) с закручивающимися крышками объемом 15 см³. Шкаф (стол) лабораторный с вытяжным устройством. Программное обеспечение для обработки результатов ИФА.

Ход работы: Отбор проб проводят с учетом требований нормативно-технической документации на конкретный вид субстрата. Подготовку проб к ИФА осуществляют с применением аппаратуры и материалов, указанных в межгосударственных и национальных стандартах на методы подготовки проб к проведению физико-химических анализов. До начала анализа пробы хранят в холодильнике.

Подготовка проб мяса и мясопродуктов, яиц, кормов

Образцы продуктов в сухом виде предварительно восстанавливают в воде в соответствии с указанием на этикетке (нормативно-технической документации на продукт).

Пробы тщательно гомогенизируют в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке. Добавляют 2 см³ 80 %-го раствора метанола в буфере для проб к 1 г гомогенизированной пробы, встряхивают на ротаторе в течение 15 мин, переворачивая пробирку, центрифугируют при 2000 g в течение 10 минут при комнатной температуре (20–25 °С).

Супернатант проб мяса и яиц разбавляют в 5 раз (соотношение 1:4) буфером для разбавления проб (например, к 0,04 см³ супернатанта добавляют 0,16 см³ буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе.

Супернатант проб кормов разбавляют в 20 раз (соотношение 1:19) буфером для разбавления проб (например, к 0,01 см³ супернатанта добавляют 0,19 см³ буфера для разбавления проб), перемешивают на вор-тексе.

Для дальнейшего анализа используют по 0,05 см³ полученных вышеописанным образом растворов.

Подготовка проб молока и молокопродуктов

Образцы продуктов в сухом виде предварительно восстанавливают в воде в соответствии с указанием на этикетке (нормативно-технической документации на продукт).

Пробы нейтрализуют с помощью 0,1 М раствора NaOH, доводя уровень pH до $7,0 \pm 0,5$, после чего центрифугируют в течение 5 мин при 2000 g и температуре не выше 4 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике в течение 60 мин).

Образовавшийся верхний слой жира удаляют с помощью шпателя или стеклянной палочки, обезжиренный супернатант разбавляют в 10 раз (соотношение 1:9) буфером для разбавления проб (например, к 0,02 см³ обезжиренного супернатанта добавляют 0,18 см³ буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе. Для дальнейшего анализа используют по 0,05 см³ полученного раствора.

Ход работы. Анализ проводят поэтапно.

1. В рамку планшета вставляют необходимое количество микролунок, достаточное для всех растворов стандартов и растворов исследуемых проб при анализе в двух повторностях каждый. Записывают положения лунок со стандартами и исследуемыми растворами на бланке планшета.

2. Добавляют в выбранные пары лунок по 0,05 см³ каждой концентрации раствора стандарта или раствора подготовленной пробы продукта, после чего в каждую лунку добавляют по 0,05 см³ разбавленного конъюгата. Смесь перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20–25 °С) в течение 1 ч в темном месте.

3. По окончании инкубации жидкость выливают из лунок, переворачивая рамку планшета, и тщательно выбивают капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Лунки заполняют буфером для промывки, приготовленным по п. 5.3.2, внося по 0,3 см³ в каждую лунку, используя восьмиканальный дозатор. После контакта выливают буфер для промывки из лунок и тщательно выбивают капельки жидкости. Процедура отмывки повторяется трижды.

Примечание. Необходимо следовать рекомендованной процедуре промывки и не допускать высыхания микролунок в процессе выполнения анализа.

4. После отмывания добавляют по 0,1 см³ смеси субстрата/хромогена в каждую лунку. Смесь перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20–25 °С) в течение 30 мин в темном месте.

5. По окончании инкубации добавляют в каждую лунку по 0,1 см³ стоп-реагента. Смесь перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и сразу после этого измеряют оптическую плотность в каждой лунке. Время от внесения стоп-реагента до изменения не должно превышать 30 мин.

Учет и обработка результатов

Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности на микропланшетном иммуоферментном анализаторе (планшетном фотометре, ридере) при длине волны 450 нм против нулевого стандарта, значение которого принимается за 100 %.

Если величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, ниже 0,6 ($A_{450\text{нм}} < 0,6$), это является признаком порчи реагентов. Результаты анализа в таком случае не учитываются.

Измеренные показатели оптической плотности переносят в таблицу и располагают в соответствии с номерами образцов.

Вычисляют средние значения оптической плотности стандартных

и исследуемых растворов, полученные по 2 параллельным микролунам в результате двух параллельных определений. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

Вычисленные средние значения оптической плотности стандартных (или исследуемых) растворов делят на вычисленное среднее значение оптической плотности нулевого стандарта и умножают на 100 % по формуле:

$$ОП = \frac{ОП_i}{ОП_0} \times 100,$$

где: ОП - значение оптической плотности, выраженное в процентах от оптической плотности нулевого стандарта, % поглощения; ОП_i - среднее значение оптической плотности стандартных растворов бацитрацина (или исследуемых растворов продуктов), ед.; ОП₀ - среднее значение оптической плотности нулевого стандарта, ед.

По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим им значениям концентрации бацитрацина в мкг/кг строят калибровочную кривую в полулогарифмической системе координат.

Для компьютерной обработки результатов измерений рекомендуется использовать специализированное программное обеспечение.

При компьютерной обработке результатов следует руководствоваться инструкцией по использованию программного обеспечения и

Концентрацию бацитрацина в мкг/кг считывают по калибровочной кривой в соответствии со значением оптической плотности, вычисленным по формуле (1).

Для того, чтобы вычислить содержание бацитрацина в исследуемом продукте, величину концентрации в мкг/кг, полученную по калибровочной кривой, умножают на соответствующий фактор разбавления. При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

- молоко - ×10;
- мясо - ×15;
- яйца - ×15;
- корма - ×40.

При необходимости расчета содержания бацитрацина в исходном сухом продукте полученную величину необходимо разделить на крат-

ность разведения при восстановлении пробы в воде; при переводе значений, выраженных в мкг/кг продукта, в значения, выраженные в мг/кг, - разделить полученное значение на 1000.

Метрологические характеристики

Метрологические характеристики метода определения остаточных количеств бацитрацина в продуктах питания животного происхождения, проводимого в полном соответствии с приведенной процедурой твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа, представлены в таблице 8.

Таблица 8. Показатели иммуноферментного анализа остаточных количеств бацитрацина в различных субстратах

Статистический параметр	Вид продукта			
	мясо	яйцо	молоко	корма
Нижний предел определения, мг/кг	0,009	0,011	0,011	0,092
Интервал надежного определения, мг/кг	0,009–0,3	0,011–0,3	0,011–0,2	0,092–0,8
Среднее значение открываемости (степень извлечения), %	122	0,11	5,99	97
Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений, полученными в одной лаборатории в одной серии измерений (сходимость), при $P = 0,95$ не должно превышать, %	15,0			
Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений, выполненных в двух разных лабораториях (воспроизводимость), при $P = 0,95$ не должно превышать по отношению к среднему, %	35,0			

В случае получения результатов ниже предела определения следует указывать результат со знаком «<»: например, «содержание бацитрацина в яйцах < 0,011 мг/кг».

Если расхождение результатов двух параллельных определений (сходимость и воспроизводимость) превышает требования таблицы, то повторно проводят два новых параллельных определения.

При количественном определении содержания бацитрацина в исследуемом продукте необходимо подтверждение полученного результата с использованием любого другого метрологически аттестованного или стандартизованного метода определения.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения активности бацитрацина в бацилихине.
2. Остаточные, максимально допустимые количества бацитрацина в различных биологических субстратах.
3. Ход анализа определения бацитрацина в субстратах.
4. Реактивы, необходимые для определения бацитрацина в бацилахине.

Занятие 16. Определение активности антибиотиков в кормовых препаратах

16.1. Определение количества и активности гризина в кормогризине

ГРИЗИН

Для использования в животноводстве выпускаются кормовые препараты гризина – кормогризин - 5, кормогризин - 10, кормогризин - 40, содержащие соответственно 5, 10 и 40 г гризина в 1 кг препарата. Требование к качеству кормогризина приведены в таблице 9. Основное требование к качеству кормогризина – содержание в нем активного антибиотика. Количество гризина в препарате определяют микробиологическим методом диффузии в агар с использованием тест-микроба *B. subtilis* ATCC 6633 (Н. И. Фролова, 1974; К. С. Масловский, 1975).

Качество кормовых препаратов – флавомицина, румензина, тилозина и других зарубежных антибиотиков – определяется в основном по таким же показателям, как бацитрацин и гризин.

Клиническое и диагностическое значение определения количества и активности гризина в кормогризине. Гризин ан-

тибиотик стрептотрициновой группы, получаемый из культуральной жидкости *Actinomyces griseus*, штамм 15. Используется в животноводстве в качестве кормовой добавки для стимуляции роста. Выпускается в двух формах: кормогризин-5 и кормогризин-10 с содержанием 5 и 10 г гризина в 1 кг. Молекулярная масса 1000–1500. Химически чистый препарат - порошок светло-серого цвета. Т. пл. 185 - 217 °С. Хорошо растворяется в воде и метаноле.

Таблица 9. Органолептические, физико-химические и биологические показатели кормогризина

Показатели	Кормогризин-5	Кормогризин-10	Кормогризин-40
Внешний вид	Однородный порошок от темно-бурого до светло-желтого цвета		
Влажность, %, не более	10	10	10
Степень измельчения препарата (остаток на сите № 067), %, не более	10	10	10
Содержание гризина, г/кг	5	5	5
Безвредность в тест-дозе на одну мышь, мг	5±0,5	10±1	40±4
	100	100	100
Проверка на подлинность	а) нингидриновые полоски хроматограммы испытуемого образца совпадают с полосками стандарта гризина; б) зоны подавления роста тест-микроба совпадают с зонами стандарта гризина.		

Принцип метода. Метод основан на бактерицидном действии гризина по отношению к тест-культуре *Bacillus subtilis*, штамм 6633.

Метрологическая характеристика метода. Нижний предел обнаружения 2 мкг/мл анализируемого объема. Предел определения 1 мкг/куб. м, погрешность определения +/- 10%. Диапазон измеряемых концентраций 1 - 100 мкг/куб. м. Определению мешают вещества с выраженным бактериостатическим и бактерицидным действием по отношению к указанной тест-культуре.

Реактивы и материалы: питательная среда для выращивания - тест-культуры: агар - 2%, бульон Хотингера - 23% аминного азота, 0,5% пептона, 1% глюкозы, 0,5% хлористого натрия, pH 7; культура

Bacillus subtilis, штамм 6633 (шероховатая форма). Выращивают в течение 18–20 ч при 37 °С на косяках. Посев на спорообразование проводят смывом агаровой суточной культуры *Bacillus subtilis*, штамм 6633, в стерильном физиологическом растворе хлористого натрия. Смыв культуры располагают по матрасам с 2 - 2,5-процентным раствором питательной среды с pH 6 - 6,2. Споры выращивают в течение 5 - 10 дней в термостате при 37 °С, после чего проводят микроскопический контроль. Если в мазках, окрашенных по Граму, имеется в поле зрения не менее 80–90% спор, их смывают стерильным физиологическим раствором. Полученную суспензию спор прогревают при 65 °С в течение 30 мин., затем промывают стерильной дистиллированной водой не менее 3 раз, центрифугируя после каждого промывания. Промытую суспензию спор вновь прогревают 30 мин. при 65 °С. Полученные споры помещают в стерильные ампулы, которые запаивают и хранят в холодильнике при температуре 4 °С; питательные среды для определения гризина: нижний слой - 1,5-процентный агар, приготовленный на дистиллированной воде, pH 8,0; верхний слой - мясная вода, разбавленная в 2 раза дистиллированной водой. Затем на 1 л разбавленной мясной воды добавляют 0,5-процентного пептона, 0,25-процентного хлористого натрия, 0,3-процентного двузамещенного фосфорнокислого калия, 1,5-процентного агара, pH 8,0. Среды стерилизуют при 120 °С в течение 20 мин; лимоннокислый буфер (pH 3,2) готовят, смешивая 17,2 части 0,1 М лимонной кислоты и 1,4 части 0,1 М лимоннокислого натрия; хлороводородная кислота 0,01 н раствор; стандартный раствор гризина: для приготовления основного стандартного раствора берут точную навеску 20–30 мг, растворяют в 0,01 н соляной кислоты, хранят в холодильнике в течение месяца. Для приготовления рабочего стандартного раствора основной раствор разводят лимоннокислым буфером.

Оборудование: водяная баня; колбы мерные на 50, 100 мл; капельница; пробирки химические; пипетки разные; сверло для изготовления лунок - 6 мм; стандарт мутности 10; трафарет для вырезания лунок на агаровой пластинке; термостат; чашки Петри; электроаспиратор или пылесос; фильтры АФА-ВП-18.

Отбор проб воздуха. При помощи электроаспиратора исследуемый воздух протягивают через фильтр АФА-ВП-18 со скоростью 100 л/мин. в течение 20 мин.

Ход анализа. Фильтр помещают в стаканчик, заливают 2 мл лимоннокислого буфера, рН 3,2, перемешивают стеклянной палочкой в течение 3–5 мин. Затем фильтр отжимают и удаляют. Смыв используют для анализа.

Стерильные чашки Петри помещают на горизонтальный столик, проверенный по уровню. Разливают нижний слой агара по 15 мл. После того как он остынет, на его поверхность наливают по 8 мл среды верхнего слоя, предварительно засеянной тест-микробом. Для засева верхнего слоя на каждые 100 мл среды (охлажденной до 60 °С) стерильно вносят 1 мл спор *Bacillus subtilis*, штамм 6633, содержащей 1 млрд. спор в 1 мл. После застывания агара стерильным бором при помощи трафарета под углом 60° друг к другу на расстоянии 28 мм от центра чашки делают 6 лунок диаметром 6 мм.

В 3 лунки, отмеченные с оборотной стороны чашки карандашом, вносят по 0,05 мл раствора стандарта гризина в концентрации 4 ед./мл, в другие 3 лунки - по 0,05 мл одного из испытуемых разведений смыва, полученного с фильтра. Концентрация каждого исследуемого раствора должна быть в 2–10 раз (в зависимости от предполагаемого содержания гризина) меньше концентрации предыдущего.

Испытуемые смывы с фильтра следует разводить примерно до концентрации от 1 до 5 ед./мл. Для разведения используют лимоннокислый буфер. Не использованные в работе разведения смыва с фильтра хранят в холодильнике до окончания исследований, так как они могут быть использованы при необходимости повторного анализа.

Чашки помещают в термостат и выдерживают при температуре 37 °С в течение 16–18 ч, после чего измеряют диаметры зон задержки роста тест-микроба, вызванные каждым рабочим раствором и раствором стандарта.

Расчет активности гризина проводят по стандартной кривой. Для ее построения готовят растворы стандарта концентрациями 8, 4, 2, 1 ед./мл. Концентрация 4 ед./мл - контрольная. Для опыта берут 18 чашек с двухслойным агаром. Контрольный раствор вносят в 3 лунки в каждые из 18 чашек, остальные растворы закапывают в 3 лунки трех чашек.

После выдерживания чашек в термостате при 37 °С в течение 16–18 ч замеряют зоны задержки роста рабочих и контрольного растворов стандарта и вычисляют среднее значение величины этих зон. После этого подсчитывают величину зоны контрольного раствора во

всех 18 чашках. Находят разность между контрольными зонами и средней зоной, вычисленной по 18 чашкам. Полученные разности прибавляют к средним величинам зон рабочих растворов. После этого строят кривую на полулогарифмической сетке. Для этого средние величины зон, полученные после поправки, а также среднюю величину зоны контрольного раствора, вычисленную из 18 чашек, наносят в виде точек на ось абсцисс, а соответствующие им концентрации растворов - на ось ординат. Из этих точек восстанавливают перпендикуляры и получают на сетке точки их пересечения, через которые проводят линию. Это стандартная кривая. Стандартной кривой можно пользоваться длительное время. При использовании новой партии среды необходимо проверить угол наклона кривой по 2 концентрациям на 3–5 чашках.

Техника безопасности

Следует соблюдать меры безопасности при работе с химическими реактивами и бактериями V (непатогенной) группы.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения количества и активности гризина в кормогризине.
2. Ход анализа при определении активности гризина в кормогризине.
3. Реактивы и оборудование, необходимые для определения активности гризина в кормогризине.

ТЕМА 5. АНТИОКСИДАНТЫ

Антиоксиданты – вещества, способные тормозить процессы радикального окисления органических и высокомолекулярных соединений, тем самым снижая выход продуктов этого окисления: гидроперекисей, спиртов, альдегидов, кетонов, жирных кислот и т.д. Это является очень важным, так как свободные радикалы в организме животных становятся источниками токсикозов, заболеваний сердечно-сосудистой системы, различных видов злокачественных опухолей [1]. В зависимости от структуры АО могут захватывать радикалы с различной скоростью и поэтому они проявляют различную активность. Среди АО можно выделить соединения, имеющие в своей структуре ароматические кольца, связанные с одной или несколькими гидроксильными группами (витамины А, D, Е, К, F; убихиноны, триптофан, фенилаланин, флавоноиды, каротины и каротиноиды); вещества, имеющие в своем составе SH-группы (глутатион, эрготеин, серосодержащие аминокислоты: цистеин, цистин, метионин). Кроме того, антиоксидантные свойства проявляют многие химические соединения, в том числе и низкомолекулярные, относящиеся к различным химическим классам, а именно аскорбиновая кислота (витамин С), мочевины, мочевины, церуплазмин, ликопен, большинство пигментов (каротиноиды, флавоноиды, билирубин). Все эти вещества являются либо «ловушками» АФК, либо разрушают перекисные соединения. В последнее время большой интерес уделяется флавоноидам, часто называемым биофлавоноидами, образование которых происходит только в растительных тканях. Установлено, что они являются важными компонентами корма животных и защищают их от оксидативного стресса [2].

Занятие 17. Определение активности антиоксидантов

Классическими методами определения активности антиоксидантов являются: газометрические, спектрофотометрические, хемиллюминисцентные, электрохимические с использованием электрода Кларка и сравнительно недавно разработанные амперометрический, по-

тенциометрический и вольтамперометрический методы. Многие из данных методов взяты из других отраслей промышленности и на основании результатов медицинских и фармакологических исследований.

17.1. Фотометрические методы определения активности антиоксидантов

Клиническое и диагностическое значение определения активности антиоксидантов. Колориметрическое определение общей антиокислительной активности (ТАС) по окислению кроцина впервые было предложено авторами. Кроцин представляет собой красящее вещество желтых стручков, плода китайского растения *Gardenia grandiflora*.

Принцип метода. Метод с окислением кроцина заключается в следующем. В каждую лунку планшеты пипетируют по 100 мл кроцина и 50 мл испытуемого образца, разведенного в фосфатном буфере. Реакция инициируется добавлением 100 мл предварительно подогретого до 37 °С.

Ход работы. Раствора 2,2'-азобис-(2-амидинопропан) гидрохлорида (ААРН, 5 мг/мл) и окисление кроцина проводится инкубацией планшеты во влажном термостате при 37 °С в течение 60-75 минут. Контрольные лунки, содержащие кроцин, образцы и фосфатный буфер (по 100, 50 и 100 мкл соответственно), инкубируются параллельно. После инкубирования измеряется оптическая плотность при 450 нм. Специфическое поглощение определяется по формуле (1):

$$100 \times (D_0 - D_{\text{аоа}}) / D_0, \quad (1)$$

где: D_0 - поглощение в отсутствие антиоксидантов; $D_{\text{аоа}}$ - поглощение в присутствии антиоксидантов.

В результате восстановления DPPH антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 514 нм обычными методами спектрофотометрии.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение определения активности антиоксидантов.

2. Ход определения активности антиоксидантов фотометрическим способом.
3. Реактивы и оборудование для определения активности антиоксидантов фотометрическим способом.

Занятие 18. Определение активности антиоксидантов

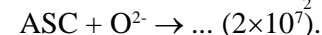
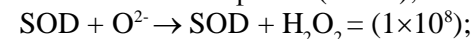
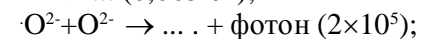
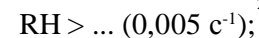
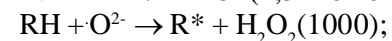
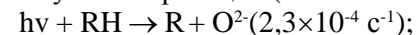
18.1. Хемилюминисцентный метод

Клиническое и диагностическое значение метода хемилюминисцентного определения антиоксидантов. В методе, являющемся одним из множества модификаций методов хемилюминисцентного определения антиокислительной активности, используется способность люминола давать свечение после взаимодействия со свободными радикалами.

Принцип метода. Свободные радикалы в системе генерируются постоянно в результате иницируемого теплом распада 2,2'-азобис-(2-амидинопропан) дигидрохлорида (AAPH).

Ход работы. При добавлении образца антиоксиданта наблюдается подавление люминесценции. При этом в случае соединения Тролокс отчетливо заметен период индукции - время, по истечении которого люминесценция возрастает, достигая практически первоначального уровня. Период индукции прямо пропорционален количеству добавленного Тролокса. Несколько иначе ведет себя ВНТ. При его добавлении не наблюдается полного ингибирования люминесценции, сопровождаемого периодом индукции, но заметно частичное подавление люминесценции. Разное влияния на хемилюминесценцию соединений одного класса (фенолы), вызваны различной степенью ионизации молекул Тролокса и ВНТ вследствие различной кислотности их ОН-групп. Эти выводы косвенно подтверждаются зависимостями подавления люминесценции от величины рН среды при одинаковых концентрациях антиоксидантов. Математическое моделирование кинетики фотохемилюминесценции(ФХЛ) с участием рибофлавина в присутствии антиоксидантов-супероксиддисмутазы и аскорбиновой кислоты. Интенсивность фотохемилюминесценции(ФХЛ) принимают пропорциональной концентрации супероксида, поскольку в системе присутствовал люцигенин. Показано, что эксперименталь-

ные кривые ФХЛ описываются достаточно точно для следующей совокупности реакций (в скобках-константы скоростей, $M^{-1} \times c^{-1}$):



Здесь RH - рибофлавин, O^{2-} - супероксидный радикал; R - радикал рибофлавина; SOD - супероксиддисмутаза; ASC - аскорбат.

Хемилюминесцентное определение антиоксидантов с люминолом в присутствии пероксидазы.

Контрольные вопросы

1. Клиническое и диагностическое значение метода хемилюминисцентного определения антиоксидантов.
2. Ход анализа хемилюминисцентного определения антиоксидантов.
3. Реактивы и оборудование при определении антиоксидантов хемилюминисцентным методом.

**РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА,
НЕОБХОДИМАЯ ДЛЯ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ**

Основная литература

1. NSP от А до Я. Справочник по биологически активным добавкам к пище компании «Nature's Sunshine Products, Inc.». - М.: ИООО «Книжный дом», 2013. - 240 с.
2. Максимов, Владимир Ильич. Биологически активные вещества в физиологических и биохимических процессах в организме животного. Учебное пособие. Гриф УМО вузов России / Максимов Владимир Ильич. - М.: Лань, 2012.-527с. 256

Дополнительная литература

1. Конопатов, Ю. В. Биохимия животных: учебное пособие / Ю. В. Конопатов, С. В. Васильева. – Санкт-Петербург: Лань, 2015. – 384 с.
2. Лавров, И. Е. Биологически активные добавки / И.Е. Лавров. - М.: АСТ, Сова, 2009. - 711с.
3. Сушкова, Валентина Ивановна Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества / Сушкова Валентина Ивановна. - М.: ДеЛи принт, 2008. - 156с.

Использованная литература

1. Клопов, М. И. Биологически активные вещества в физиологических и биохимических процессах в организме животного / М.И. Клопов, В.И. Максимов. - М.: Лань, 2012. – 448.
2. Биологически активные вещества растительного происхождения. В 3 томах. Том 1. А - К / Б.Н. Головкин и др. - М.: Наука, 2016. 368 с.
3. Кондрахин И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики / И.П. Кондрахин, А.В. Архипов, В.И. Левченко, Г.А. Таланов, Л.А.Флорова, В.Э.Новиков // М., Изд. «КолосС», 2004, 520 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Тема 1. Витамины	6
Занятие 1. Методы определения витамина А и провитамина А (каротина)	6
Занятие 2. Методы определения витамина тиамина (В-1) и рибофлавина (В-2)	11
Занятие 3. Методы определения витамина токоферола (Е) и аскорбиновой кислоты (С)	17
Занятие 4. Методы определения витамина цианкобаламина (В ₁₂)	22
Тема 2. Ферменты	28
Занятие 5. Методы определения свойств ферментов	29
Занятие 6. Методы определения специфичности ферментов	31
Занятие 7. Методы определения активности ферментов. Оксиредуктазы	34
Занятие 8. Методы определения активности ферментов. Трансферазы	36
Занятие 9. Методы определения активности ферментов. Гидролазы	41
Занятие 10. Методы определения активности ферментов. Гидролазы	45
Занятие 11. Методы определения активности ферментов. Лиазы	48
Тема 3. Гормоны	51
Занятие 12. Методы определения активности гормонов внутренней секреции	51
Занятие 13. Методы определения активности гормонов внутренней секреции. Адреналин	53

Занятие 14. Методы определения активности гормонов внутренней секреции. Тироксин. Фолликулин	55
Тема 4. Антибиотики	58
Занятие 15. Определение активности антибиотиков в различных субстратах. Бацитрацин	58
Занятие 16. Определение активности антибиотиков в кормовых препаратах. Гривин	65
Тема 5. Антиоксиданты	70
Занятие 17. Определение активности антиоксидантов. Фотометрический метод	71
Занятие 18. Определение активности антиоксидантов. Хемилюминисцентный метод	72
Рекомендуемая литература, необходимая для освоения дисциплины	74

Лицензия: ЛР. № 020574 от 6 мая 1998 г.

Электронная версия. 28.06.2022 г.
Бумага формат А4 (210x297 мм), масса 80 г/м².
Усл. печ. л. 4,75. Заказ 48.

362040, Владикавказ, ул. Кирова, 37.
Типография ФГБОУ ВО «Горский госагроуниверситет»