

**ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ –  
филиал федерального государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования  
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*Кафедра микробиологии и иммунологии с курсом биологической химии*

Лужнова С.А., Куличенко Е.О., Ю.К. Василенко, А.М. Темирбулатова, Е.О.  
Сергеева, И.В. Скульте, Е.П. Парфентьева, С.С. Сигарева.

**Рабочая тетрадь  
по дисциплине «Медицинская биохимия.  
«Принципы измерительных технологий в биохимии. Патохимия,  
диагностика. Биохимия злокачественного роста»  
по специальности 30.05.01 «Медицинская биохимия»  
(уровень специалитета)**

Курс - IV

Семестр VIII

Студент \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ курс \_\_\_\_\_ группа  
Преподаватель \_\_\_\_\_

УДК 577.1 ( 076.1)  
ББК 28.072 я 73  
В 19

Рецензент: Золотых Д.С., доцент кафедры токсикологической и аналитической химии, кандидат фармацевтических наук.

Авторский коллектив:

С.А. Лужнова, к.б.н., доц.; .Е.О. Куличенко; Ю.К. Василенко, д-р мед.наук, проф.; А.М. Темирбулатова, канд.фарм.наук; Е.О. Сергеева, канд.фарм.наук; И.В. Скульте, канд.фарм наук; Е.П. Парфентьева, канд.фарм.наук, доцент; С.С. Сигарева.

**Рабочая тетрадь по дисциплине «Медицинская биохимия. Принципы измерительных технологий в биохимии. Патохимия, диагностика. Биохимия злокачественного роста» по специальности 30.05.01 «Медицинская биохимия» / С.А. Лужнова [ и др.]. – Пятигорск: ПМФИ, 2020. – 32 с.**

Рабочая тетрадь для студентов составлена в соответствии с рабочей программой по дисциплине «Медицинская биохимия. Принципы измерительных технологий в биохимии. Патохимия, диагностика. Биохимия злокачественного роста», разработанной на основе ФГОС по специальности 30.05.01 «Медицинская биохимия» для студентов 4-го курса очной формы обучения. В тетрадь включены вопросы для обсуждения на занятии, указана выполняемая на занятии самостоятельная работа. Рабочая тетрадь предназначена для самостоятельной аудиторной работы студентов под руководством преподавателя с целью лучшего закрепления и усвоения материала.

УДК 577.1 (076.1)  
ББК 28.072 я 73

*Печатается по решению Центральной методической комиссии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГОУ ВО ВолгГМУ Минздрава РФ*

©ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ  
ИНСТИТУТ – филиал ФГОУ ВО ВолгГМУ, 2020

### Тематический план лабораторных занятий:

№ занятия	Темы лабораторных занятий
1.	Введение в аналитическую биохимию. Особенности анализа биологических проб. Биохимический аналитический эксперимент. Реактивы и реагенты.
2.	Растворы и буферные растворы, техника проведения реакций в биохимическом анализе.
3.	Методы разделения, очистки и концентрирования в биохимическом анализе.
4.	Особенности применения аналитических методов в изучении биологических образцов. Классификация аналитических методов. Физические методы анализа. Оценка биологической активности образцов в экспериментальной и лабораторной медицине.
5.	Электрофизический и электрохимический анализ биологических образцов. Использование селективных электродов и электрохимических сенсоров в биохимии и лабораторной медицине. Методы объёмного анализа в биохимическом анализе. Осадительный анализ, гравиметрия, манометрические и волюметрические методы анализа.
6.	Особенности титриметрического анализа в аналитической биохимии. Титрование с визуальным установлением точки окончания титрования в анализе и выделении биологически значимых молекул. Инструментальные методы установления точки окончания титрования.
7.	Спектрометрические и спектроскопические методы в биохимическом анализе, общая характеристика их роли в развитии аналитической биохимии. Масс-спектрометрия. Прикладное значение масс-спектрометрии и гибридных подходов на её основе в экспериментальной и лабораторной медицине.
8.	Применение методов атомной и молекулярной спектроскопии в биохимическом анализе. Абсорбционная (спектро)фотометрия. Инфракрасная спектроскопия.
9.	Эмиссионные спектроскопические методы. Преимущества люминесцентного анализа перед фотометрическим в анализе биологических образцов. Флюориметрия и флюорометрия. Хемилюминесцентный анализ в биохимии и медицине. Специальные виды спектроскопии.
10.	Методы, связанные с явлением светорассеяния. Спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия). Методы, основанные на преломлении света. Поляриметрия, особенности её применения к анализу биологических проб. Дифракционные методы.

11.	Радиометрические методы. Значение радиоизотопных методов в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике. Ядерная спектроскопия. Практическое использование спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в биохимическом анализе и экспериментальной медицине. Перспективные резонансные методы анализа.
12.	Методы преаналитической модификации (дериватизации). Каталитические реакции в биохимии и лабораторной медицине. Использование ферментативных реакций в биохимическом анализе. Способы оценки активности ферментов и их применение в клинической лабораторной диагностике.
13.	Методы концентрирования и разделения в биохимическом анализе. Хроматографические методы идентификации и разделения. Особенности и примеры применения хроматографии в фундаментальных и прикладных исследованиях и в клинической лабораторной диагностике.
14.	Электрофоретические методы идентификации и разделения. Особенности электрофоретического разделения биологических макромолекул. Идентификация веществ после электрофоретического разделения. Иммуноэлектрофоретические методы в практике лабораторной медицины.
15.	Биохимический анализ с использованием методов непосредственного наблюдения. Комплексное использование аналитических подходов в биохимическом анализе: гибридные методы анализа.
16.	Методы решения задачи выбора оптимальных аналитических подходов в биохимических исследованиях и клинической лабораторной диагностике. Получение и подготовка биологических образцов. Хранение биологических проб. Значение современных информационных и телекоммуникационных технологий в деятельности врача-биохимика. Заключительный коллоквиум.

### **Занятие №1.**

**Тема: Введение в аналитическую биохимию. Особенности анализа биологических проб. Биохимический аналитический эксперимент. Реактивы и реагенты.**

**Цель:** изучить задачи аналитической биохимии, виды биологических проб, характеристику качественного и количественного анализа биологического материала и контроль качества биохимического анализа.

#### **Вопросы для обсуждения.**

1. Требования и правила безопасности при проведении биохимических исследований.
2. Характеристика видов биоматериала для анализа.
3. Последовательность этапов биохимического анализа.
4. Воспроизводимость и правильность результатов биохимического анализа – критерии качества анализа.

#### **Самостоятельная работа.**

Построение карты внутрилабораторного контроля качества.

**Подпись преподавателя** \_\_\_\_\_

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Введение в аналитическую биохимию.
2. Особенности забора и анализа биологических проб.
3. Биохимический аналитический эксперимент.
4. Реактивы и реагенты, используемые в аналитической биохимии.

**Занятие №2.**

**Тема: Растворы и буферные растворы, техника проведения реакций в биохимическом анализе.**

**Цель:** изучить приготовление растворов реагентов, их исправление, способы выражения концентрации, технику проведения реакций в биохимическом анализе, способы взятия, хранения, доставки и анализа биоматериала; приготовление растворов реагентов.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Характеристика растворов.
2. Виды дисперсных систем в растворе.
3. Представление о количественном содержании вещества в растворе (концентрации).
4. Приготовление растворов и способы исправления растворов.
5. Взятие биоматериала для биохимического анализа.
6. Хранение и подготовка биоматериала к исследованию.

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1.** Приготовление 5% раствора сернокислой меди из кристаллогидрата этого вещества.

Точный способ	Условный способ
<p>Расчет навески кристаллогидрата меди (<math>\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}</math>)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Молекулярная масса = 245г(155г чистая соль + 90г(18*5) вода</li> <li>2. Определение навески путем решения пропорции:  <math>245\text{г CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \text{ ——— } 155\text{г CuSO}_4</math>  <math>x \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \text{ ——— } 5\text{г CuSO}_4</math>  <math display="block">x = \frac{5 * 245}{155} = 7,90\text{г}</math> </li> <li>3. В мерную колбу на 100 мл помещают навеску и доливают водой до метки  <u>Этикетка:</u> 5%раствор <math>\text{CuSO}_4</math>  (в 100 мл раствора содержится 5г сернокислой меди) </li> </ol>	<p>Отвешивают 5г кристаллогидрата сернокислой меди (<math>\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}</math>), помещают в колбу на 100 мл и приливают воду до объема 100 мл (до метки).  <u>Этикетка:</u> 5%раствор <math>\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}</math>  Для приготовления неточных растворов используются аптекарские, технохимические весы и неточная мерная посуда (цилиндры, мензурки)</p>

**Подпись преподавателя** \_\_\_\_\_

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Виды и классификация буферных растворов, используемых в биохимическом эксперименте.
2. Техники проведения реакций в биохимическом анализе.

**Занятие №3.**

**Тема: Методы разделения, очистки и концентрирования в биохимическом анализе.**

**Цель:** изучить основные методы разделения, очистки и концентрирования в биохимическом анализе; использование их в медицине; научиться рассчитывать  $R_f$  для каждой аминокислоты

### Вопросы для обсуждения.

1. Виды хроматографического анализа.
2. Теоретические основы хроматографии.
3. Возможности метода хроматографического анализа.
4. Этапы проведения анализа.
5. Специальные виды хроматографии.
6. Электрофорез.
7. Виды электрофореза.
8. Методы выделения и очистки белков.
9. Биохимическая очистка в биофильтрах.

### Самостоятельная работа.


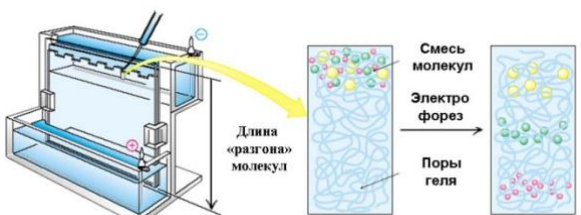
**Работа №1. Заполнить таблицу: Методы разделения в биохимическом анализе.**

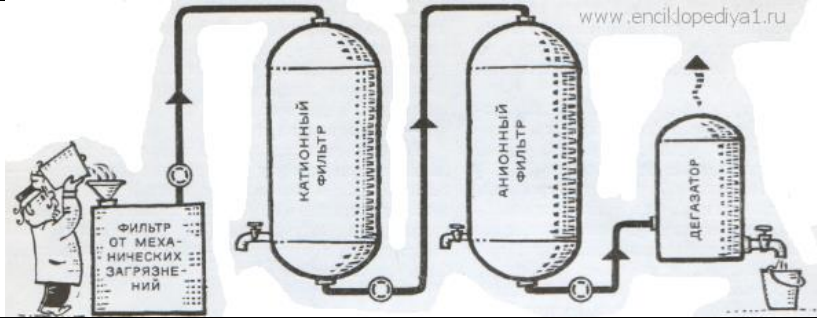

Название метода	Характеристика метода	Используемые приборы

**Работа №2. Заполнить таблицу: Методы очистки белков.**

Название метода	Описание метода
Очистка белков избирательной денатурацией	
Высаливание	
Гель-фильтрация, или метод молекулярных сит	
Ультрацентрифугирование	
Электрофорез белков	
Ионообменная хроматография	
Аффинная хроматография, или хроматография по сродству	
Диализ	

**Работа №3. Заполнить таблицу: Соотнесите прибор и метод, где он используется.**

Метод	Прибор
Электрофорез	
Ультрацентрифугирование	

<p><b>Ионнообменная хроматография</b></p>	
<p><b>Распределительная хроматография</b></p>	

**Работа №4. Хроматографический метод разделения аминокислот.**

1. Зарисовать полученную хроматограмму после обработки раствором нингидрина:

2. Рассчитать значение  $R_f$  для каждой аминокислоты по формуле:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

где  $a$  - расстояние от места нанесения раствора смеси аминокислот (линия старта) до центра пятна конкретной аминокислоты;  $b$  — путь, пройденный растворителем от линии старта до его фронта после окончания хроматографии, мм.

$R_{f1} =$

$R_{f2} =$

$R_{f3} =$

**Вывод:** \_\_\_\_\_

**Подпись преподавателя** \_\_\_\_\_

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Метод маскирования в биохимическом эксперименте.
2. Методы разделения, очистки и концентрирования в биохимическом анализе.



#### Занятие №4.

**Тема: Особенности применения аналитических методов в изучении биологических образцов. Классификация аналитических методов. Физические методы анализа. Оценка биологической активности образцов в экспериментальной и лабораторной медицине.**

**Цель:** изучить особенности применения аналитических методов в изучении биологических образцов, классификацию аналитических методов; научиться проводить выделение дРНК из ткани селезёнки и качественную реакцию на ДНК.

#### Вопросы для обсуждения.

1. Характер биологического материала в биохимическом анализе.
2. Особенности получения и подготовки биоматериала для биохимического анализа.
3. Качественный и количественный анализ, применение в медицине, биохимии.
4. Аналитические методы, используемые в изучении биологических образцов.
5. Классификация аналитических методов.

#### Самостоятельная работа.

**Работа №1. Заполнить таблицу: Методы биохимических исследований, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях**

Метод.	Сущность метода.	Приборы.	Примеры.
Фотоэлектро колориметрический.	Сравнение интенсивности окраски исследуемого раствора с окраской раствора, концентрация которого известна (стандартного раствора).		Определение общего белка, глюкозы, ТАГ в сыворотке и плазме крови.
Спектрофотометрический	Определение количества вещества в растворе или твердой среде по измерению светопоглощения волн строго определенной длины.		Определение количества ионов Na, K и т. д. В сыворотке и плазме крови.
Потенциометрический.	Измерение разности потенциалов между парой подходящих электродов, погруженных в анализируемый раствор.		Определение pH крови.
Электрофорез.	Разделение смеси, состоящей из молекул несущих заряд, на составные компоненты.		Определение количества белковых фракций, изоферментов, в сыворотке и плазме крови.
Хроматография.	Разделение смесей на составные части с помощью адсорбентов (твердых, жидких, газов, гелей)		Определение количества липопротеидов в сыворотке и плазме крови.

**Работа №2. Заполнить таблицу: Методы аналитической химии.**

Название метода	Характеристика метода	Применение методов в медицине
Маскирование		
Разделение и концентрирование		
Осаждение и соосаждение		
Экстракция		
Сорбция		
Методы испарения		
Хроматография		
Гравиметрические методы		
Титриметрические методы		
Кинетические методы		
Биохимические методы		
Электрохимические		
Термические		
Биологические		

**Работа №3. Заполнить таблицу: Методы количественного анализа, используемые в биохимических исследованиях**

Физико-химические свойства веществ, используемые в анализе	Методы определения (измерения)	Физико-химические свойства веществ, используемые в анализе	Методы определения (измерения)
Экстенсивные свойства Масса (вес) Объем			
Механические свойства Плотность (уд. вес) Вязкость Осмотическое давление			
Термические свойства Температура фазовых превращений (плавления, кипения, замерзания) Теплота реакций (сгорания, нейтрализации) Теплопроводность (газа)			
Электрические свойства Электропроводность Диэлектрическая проницаемость Магнитная			

восприимчивость Сила диффузионного тока на электроде при реакции восстановления или окисления Количество электричества для реакции на электроде Электродный потенциал			
---	--	--	--

**Работа №4. Заполнить таблицу: Требования, предъявляемые к методам, используемым в биохимии.**

Параметр	Характеристика
Точность	
Воспроизводимость	
Чувствительность	
Специфичность	

**Работа 5. Выделение дезоксирибонуклеопротеинов из селезенки.**

**Реактивы.** 5% раствор хлорида натрия, содержащий 0,04 цитрата натрия; 0,4% раствор гидроксида натрия; дифениламиноновый реактив.

*Приготовление дифениламинового реактива:* 1г дифениламина растворяют в 100мл ледяной уксусной кислоты и добавляют 2,75 мл концентрированной серной кислоты.

**Оборудование.** Ступка с пестиком; стеклянный порошок; пипетки; штатив с пробирками; мерные цилиндры; кристаллизатор; деревянные палочки с насечками; водяная баня.

**Материал.** Свежая или замороженная селезенка.

**Принцип метода.** Метод основан на способности дезоксирибонуклеопротеинов растворяться в растворах солей средней концентрации, с образованием вязких растворов и снова осаждаться при разведении их в виде нитей нуклеопротеинов.

**Ход определения.**

2-3 г ткани селезенки тщательно растирают в ступке со стеальным порошком, приливая постепенно небольшими порциями 40 мл раствора хлорида натрия. Полученный вязкий раствор фильтруют через 2 слоя марли в малый кристаллизатор. Отмеривают цилиндром шестикратный (по отношению к фильтрату) объем воды очищенной и медленно выливают ее в фильтрат. Образовавшиеся нити дезоксирибонуклеопротеинов осторожно наматывают на деревянную палочку, переносят в пробирку для использования в следующей работе.

**Работа 6. Качественная реакция на ДНК (реакция ДИШЕ).**

**Принцип метода.** Метод основан на способности дезоксирибозы, входящей в ДНК дезоксирибонуклеопротеина, образовывать соединение синего цвета с дифениламином при нагревании в среде, содержащей смесь ледяной уксусной и концентрированной серной кислот. С рибозой РНК аналогичная реакция дает зеленое окрашивание.

**Ход определения.**

Ход определения	Наблюдаемое окрашивание	Принцип реакции
К ¼ части осадка дезоксирибонуклеопротеина приливают 1 мл 0,4% раствора гидроксида натрия (до растворения). Отбирают в пробирку 15-20 капель раствора, добавляют равный объем дифенилового реактива. Содержимое пробирки перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане 15 мин.		

#### Практическое значение работы.

Выделение и очистку дезоксирибонуклеопротеинов из гомогената и ядер клеток с помощью растворов хлорида натрия разной концентрации используют в экспериментальной биохимии. Дифениламиновая проба лежит в основе методов качественного и количественного определения нуклеопротеинов и нуклеиновых кислот в биологическом материале. В клинической цитологии эти реакции применяют при нативной окраске нуклеиновых кислот в мазках клеток крови.

**Вывод:** \_\_\_\_\_

**Подпись преподавателя** \_\_\_\_\_

#### Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:

1. Особенности применения аналитических методов в изучении биологических образцов.
2. Классификация аналитических методов. Физические методы анализа.
3. Оценка биологической активности образцов в экспериментальной и лабораторной медицине.

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_\_

#### Занятие №5.

**Тема: Электрофизический и электрохимический анализ биологических образцов. Использование селективных электродов и электрохимических сенсоров в биохимии и лабораторной медицине. Методы объёмного анализа в биохимическом анализе. Осадительный анализ, гравиметрия, манометрические и волюметрические методы анализа.**

**Цель:** изучить особенности применения электрофизических и электрохимических методов анализа, классификацию электрохимических методов; научиться проводить измерения на рН метре.

#### **Вопросы для обсуждения.**

1. Характер биологических образцов для использования электрохимических методов анализа.
2. Особенности использования селективных электродов для лабораторной медицины.
3. Обратимые электроды первого и второго рода (водородный и хлорсеребряный). Ионоселективные электроды: стеклянный электрод, устройство и механизм возникновения потенциала.
4. Особенности использования электрохимических сенсоров в биохимии.

5. Осадительный анализ, гравиметрия, манометрические и волюметрические методы анализа используемые в количественном анализе и медико-биологических исследованиях.

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1. Заполнить таблицу: Электрофизические и электрохимические методы используемые в лабораторной медицине для определения показателей (физиологически активных ионов и биологически активных веществ).**

Название метода	Принцип метода	Показатели биологических тканей и жидкостей

**Работа №2. Определение pH среды биологических жидкостей.**

**Вывод:** \_\_\_\_\_

**Подпись преподавателя** \_\_\_\_\_

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Электрофизический и электрохимический анализ биологических образцов.
2. Использование селективных электродов и электрохимических сенсоров в биохимии и лабораторной медицине.
3. Методы объёмного анализа в биохимическом анализе.
4. Осадительный анализ, гравиметрия, манометрические и волюметрические методы анализа.

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_

**Занятие №6.**

**Тема: Особенности титриметрического анализа в аналитической биохимии. Титрование с визуальным установлением точки окончания титрования в анализе и выделении биологически значимых молекул. Инструментальные методы установления точки окончания титрования.**

**Цель:** изучить особенности применения титриметрического анализа; титрование с визуальным установлением точки окончания титрования.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Характеристика титриметрического анализа.
2. Особенности использования индикаторов для титрования
3. Классификация индикаторов в зависимости от типа используемой при титровании реакции.
4. Интервалы перехода окраски индикаторов.
5. Требования к реакциям, лежащим в основе титриметрических методов анализа.

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1. Изобразить в виде рисунка кривые титрования.**

РИСУНОК ТИТРОВАНИЯ	КРИВОЙ	ТИТРАНТ	ТИТРУЕМОЕ ВЕЩЕСТВО
Рис 1.		0,1М раствором NaOH	100,0 мл 0,1М HCl
Рис 2.		0,1М раствором NaOH	100,0 мл 0,1М CH <sub>3</sub> COOH
Рис 3.		0,1М раствором NaOH	0,1М HCl и 0,1М CH <sub>3</sub> COOH
Рис 4.		0,1М раствором HCl	100,0 мл 0,1М NH <sub>3</sub>
Рис 5.		0,1М раствором NaOH	100,0мл 0,1М H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Рис 6.		0,1М раствором HCl	100,0мл 0,1М Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

Вывод: \_\_\_\_\_

Подпись преподавателя \_\_\_\_\_

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках  
самостоятельной работы студентов:**

1. Особенности титриметрического анализа в аналитической биохимии.
2. Титрование с визуальным установлением точки окончания титрования в анализе и выделении биологически значимых молекул.
3. Инструментальные методы установления точки окончания титрования.

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_

**Занятие №7.**

**Тема: Спектрометрические и спектроскопические методы в биохимическом анализе, общая характеристика их роли в развитии аналитической биохимии. Масс-спектрометрия. Прикладное значение масс-спектрометрии и гибридных подходов на её основе в экспериментальной и лабораторной медицине.**

**Цель:** изучить принципы и методы масс-спектрометрического анализа; типы ионов; устройство масс-спектрометров; уметь объяснить по рисунку принцип работы масс-анализаторов.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Теоретические основы методов масс-спектропии.
2. Классификация типов ионов:

- 1) ионизация электронным ударом;
- 2) химическая ионизация;
- 3) бомбардировка быстрыми атомами и др.
3. Устройство масс-спектрометров (общие принципы).
4. Масс-анализаторы:
  - 1) квадрупольный;
  - 2) с ионными ловушками;
  - 3) наноспрей и тандемная масс-спектрометрия в непрерывном режиме;
  - 4) с магнитным сектором;
  - 5) лазерная десорбция/ионизация, ассистируемая матрицей; метод MALDI-TOF.
5. Масс-спектрометрия в структурном анализе органических молекул.
6. Хромато-масс-спектрометрия и её аналитические возможности.

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1. Заполнить таблицу:**

Название метода и разделения ионов	Приборы	Принцип метода
1. Ионизация электронным ударом	<p>Нагреватель/испаритель образца</p> <p>Ввод образца</p> <p>Камера ионизации</p> <p>Отражатель ионов, + 4 кВ</p> <p>Проволока</p> <p>Пучок электронов</p> <p>Ионы</p> <p>+ 70 эВ</p> <p>Фокусирование ионов</p> <p>Масс-анализатор и детектор</p>	
2. Ионизация методом электроспрея (ESI)	<p>Нагретый капилляр</p> <p>Игла в стеклянном капилляре ± 5 кВ</p> <p>Испарение растворителя</p> <p>Масс-анализатор</p> <p>Раствор образца</p>	

<p>3. Квадрупольный анализатор</p>	
<p>4. Ионные ловушки</p>	
<p>5.</p>	
<p>6.</p>	

Подпись преподавателя \_\_\_\_\_



**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Спектрометрические и спектроскопические методы в биохимическом анализе, общая характеристика их роли в развитии аналитической биохимии.
2. Масс-спектрометрия. Прикладное значение масс-спектрометрии и гибридных подходов на её основе в экспериментальной и лабораторной медицине.

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_

**Занятие №8.**

**Тема: Применение методов атомной и молекулярной спектроскопии в биохимическом анализе. Атомно-абсорбционная спектрофотометрия. Эмиссионные спектроскопические методы.**

**Цель:** изучить свойства электромагнитного излучения; методы атомной спектроскопии; научиться разбирать по предложенным рисункам (схемам) приборы атомно-абсорбционной и эмиссионной спектроскопии.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Свойства электромагнитного излучения.
2. Взаимодействие электромагнитного излучения с материей.
3. Методы атомной спектроскопии:
  - 1) атомная абсорбция;
  - 2) эмиссионная атомная спектроскопия:
    - источник индуктивно связанной плазмы (I.C.P.) (принцип работы горелки);
    - 3) сочетание I.C.P. и масс-спектрометрии.
4. Критерии выбора метода для аналитических работ:
  - 1) обнаружительный предел в атомной спектроскопии;
  - 2) аналитический рабочий диапазон;
  - 3) пламенная АА спектроскопия;
  - 4) спектрометрия АА с графитовой печью (GFAA).

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1. Заполнить таблицу:**

	Приборы, графики	Принцип метода
<p>Рис. 1.1 Электрическая и магнитная составляющие электромагнитного поля и направление его распространения.</p>	<p>The diagram shows a transverse electromagnetic wave propagating to the right. The vertical axis is labeled 'Электрическая составляющая' (Electric component) and the horizontal axis is labeled 'Направление распространения' (Direction of propagation). A diagonal axis pointing down and to the left is labeled 'Магнитная составляющая' (Magnetic component). The electric field is represented by vertical sine waves, and the magnetic field is represented by horizontal sine waves perpendicular to the electric field.</p>	

Рис. 1.2 Энергетические уровни и переходы электронов в атоме натрия (а) и в флуоресцирующей органической молекуле (б). Здесь для простоты вращательные уровни указаны лишь для колебательного подуровня  $S_2V_1$ .

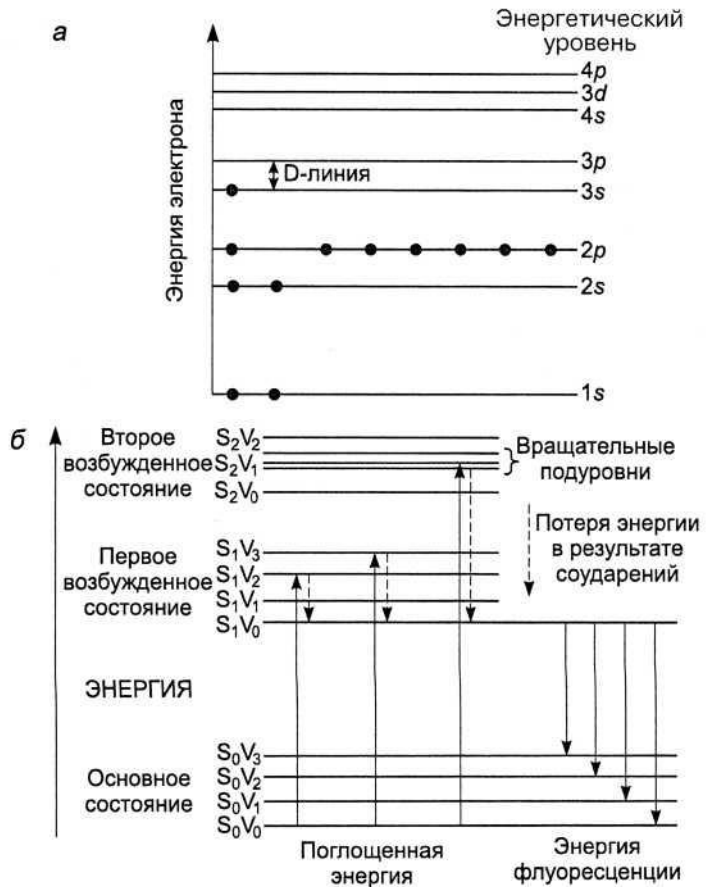


Рис. 1.3 Параметры одной волны (синусоиды). Число циклов, происходящих в единицу времени (секунду), соответствует частоте, измеренной в герцах.

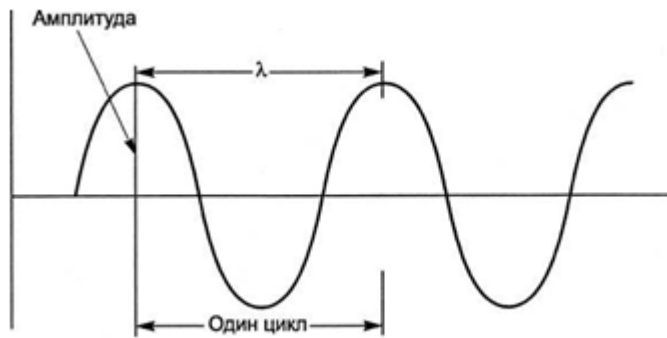
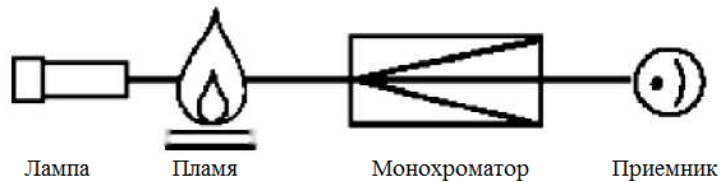
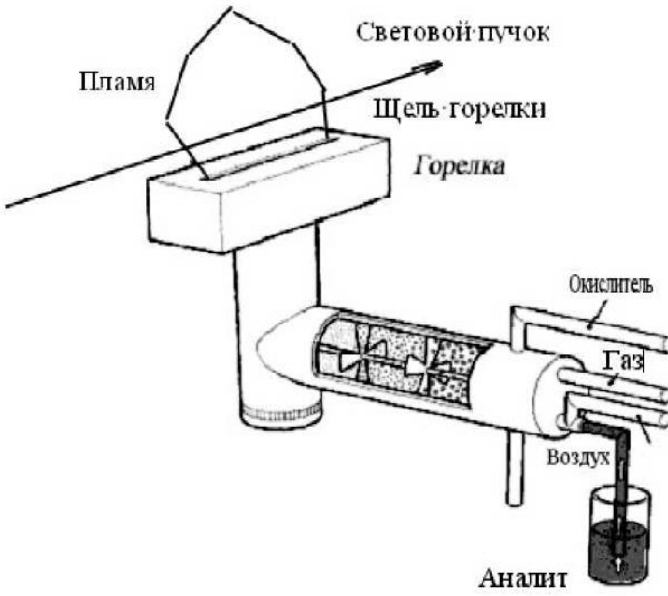
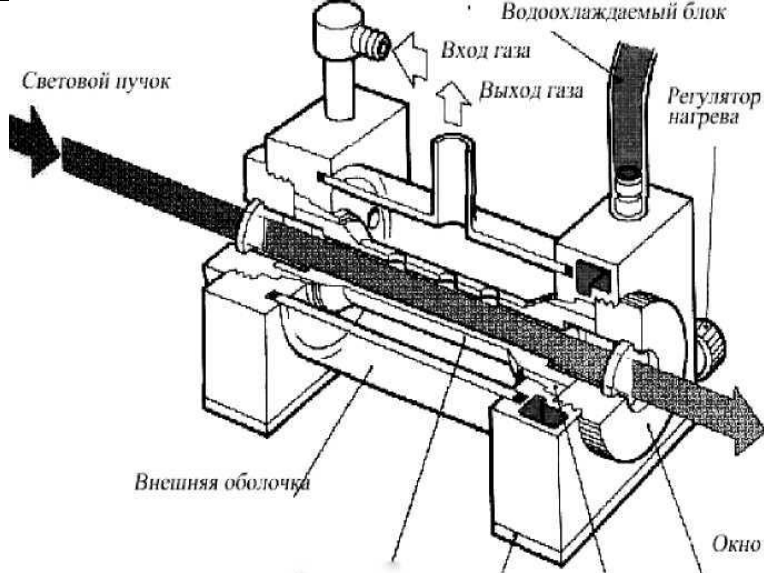
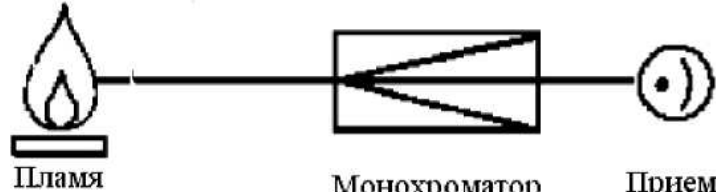



Рис. 1.4 Схема атомно-абсорбционной спектроскопии.



<p>Рис. 1.5 Схема горелки со смесителем и устройствами подвода газов.</p>	 <p>Световой пучок Пламя Щель горелки Горелка Окислитель Газ Воздух Аналит</p>	
<p>Рис. 1.6 Чертеж графитовой печи с основными деталями.</p>	 <p>Световой пучок Водоохлаждаемый блок Вход газа Выход газа Регулятор нагрева Внешняя оболочка Окно</p>	
<p>Рис. 1.7 Схема эмиссионной спектроскопии.</p>	 <p>Пламя Монохроматор Приемник</p>	
<p>Рис. 1.8 Горелка для индуктивно связанной плазмы (ICP).</p>	 <p>Плазма Аргон</p>	

Подпись преподавателя

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Применение методов атомной и молекулярной спектроскопии в биохимическом анализе.
2. Инфракрасная спектроскопия.
3. Абсорбционная спектроскопия и ее использование в лабораторной диагностике.

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_

**Занятие №9.**

**Тема: Эмиссионные спектроскопические методы. Преимущества люминесцентного анализа перед фотометрическим в анализе биологических образцов. Флюориметрия и флуорометрия. Хемилюминесцентный анализ в биохимии и медицине. Специальные виды спектроскопии.**

**Цель:** изучить основы спектрометрии; описать методы инфракрасной спектроскопии, флюориметрии, люминесцентного анализа и использование их в медицине и биохимии. Научиться описывать методы инфракрасной спектроскопии, флюориметрии, люминесцентного анализа характеризовать методы инфракрасной спектроскопии, флюориметрии, люминесцентного анализа.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Основы спектроскопии.
2. Инфракрасная спектроскопия. Использование метода в медицине.
3. Принципы флюориметрического анализа. Флюорометрия.
4. Характеристика хемилюминесцентного анализа и использование его в медицине.
5. Специальные виды спектроскопии.

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1. Заполнить таблицу: Инфракрасная спектроскопия.**

Принцип метода	Характеристика метода	Используемые приборы	Применение метода в медицине
Длина волны			

**Работа №2. Заполнить таблицу: Флюориметрический метод анализа.**

Принцип метода	Характеристика метода	Используемые приборы	Применение метода в медицине
Длина волны			

**Подпись преподавателя** \_\_\_\_\_

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Эмиссионные спектроскопические методы.
2. Преимущества люминесцентного анализа перед фотометрическим в анализе биологических образцов.
3. Флюориметрия и флуорометрия.
4. Хемилюминесцентный анализ в биохимии и медицине.
5. Специальные виды спектроскопии.

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_

**Занятие №10.**

**Тема: Методы, связанные с явлением светорассеяния. Спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия). Методы, основанные на**

**преломлении света. Поляриметрия, особенности её применения к анализу биологических проб. Дифракционные методы.**

**Цель:** изучить основы спектроскопии; описать методы, основанные на явлении светорассеяния, поляриметрии, дифракционные методы и использование их в медицине и биохимии. Научиться описывать методы, связанные явлением светорассеяния, поляриметрии, характеризовать дифракционные методы.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Основы спектроскопии.
2. Нефелометрия. Использование метода в медицине.
3. Турбидиметрия.
4. Характеристика спектроскопии комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия).
5. Поляриметрия. Использование метода в анализе биологических проб.
6. Дифракционные методы анализа.

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1. Заполнить таблицу: Методы, связанные с явлением светорассеяния.**

Название метода	Характеристика метода	Используемые приборы	Применение метода в медицине
1. Нефелометрия			
2. Турбидиметрия			
3. Спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия)			

**Работа №2. Заполнить таблицу: Дифракционные методы.**

Виды дифракционных методов	Характеристика метода	Применение методов в медицине
1. Рентгеноструктурный анализ		
2. Электронография		
3. Дифракция электронов		
4. Нейтрография		
5. Дифракция отраженных электронов-кристаллографический метод		
6. Фотокристаллография		

**Подпись преподавателя** \_\_\_\_\_

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Методы, связанные с явлением светорассеяния.
2. Спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия).
3. Методы, основанные на преломлении света.
4. Поляриметрия, особенности её применения к анализу биологических проб.
5. Дифракционные методы.

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_

**Занятие №11.**

**Тема: Радиометрические методы. Значение радиоизотопных методов в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике. Ядерная**

**спектроскопия. Практическое использование спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в биохимическом анализе и экспериментальной медицине. Перспективные резонансные методы анализа.**

**Цель:** сформировать понимание принципов, условий применимости и ограничений в использовании методов качественного, количественного и структурного анализа биологически значимых химических соединений в биологических пробах и умение адекватно выбирать необходимые подходы для решения конкретных задач биохимического анализа.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Дайте определение понятию радиометрия.
2. Дайте определение понятию радиография.
3. Охарактеризуйте метод изотопного разбавления.
4. Охарактеризуйте метод радиоактивационного анализа
5. Что такое радиоактивный элемент?

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1. Заполните таблицу. Опишите вклад радиоизотопной диагностики в следующих направлениях:**

<b>Направления</b>	<b>Функции</b>
Гематология	
Кардиология	
Пульмонология	
Нефропатии	
Онкология	
Гормоны	

**Подпись преподавателя** \_\_\_\_\_

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Радиометрические методы.
2. Значение радиоизотопных методов в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике.
3. Ядерная спектроскопия.
4. Ренография как наиболее физиологический тест при заболеваниях почек.
5. Радиоизотопные методы исследований.

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_

**Занятие № 12**

**Тема: Методы преданалитической модификации (дериватизации). Каталитические реакции в биохимии и лабораторной медицине. Использование ферментативных реакций в биохимическом анализе. Способы оценки активности ферментов и их применение в клинической лабораторной диагностике.**

**Цель:** знать основные понятия «надлежащей лабораторной практики» (GLP); основные методы аналитической биохимии; характеристику аналитических методов исследования; особенности статистической обработки и анализа количественных данных в аналитической биохимии; особенности применения аналитических методов в изучении биологических образцов; принципы разработки методов аналитической биохимии.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Дайте определение понятию катализ и каталитическая реакция.
2. Перечислите виды катализа.
3. Катализаторы в производстве лекарственных средств.

4. Охарактеризуйте механизм координационного катализа.
5. Объясните понятия "катализ катализа", или **катализ второго уровня**.
6. Энзимодиагностика и энзимотерапия.
7. Перечислите в производстве каких лекарственных веществ применяются катализаторы?

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1. Определение активности альфа амилазы в сыворотке крови и моче по методу Каравая.**

	Контроль (К), мл	Опытная проба (О), мл
Субстратно-буферный раствор	0,5	0,5
Прогреть 5 мин. При 37 °С в водяном термостате; все последующие компоненты вносить в пробы, стоящие в термостате.		
Образец	-	0,1
С момента внесения образца выдержать точно 7,5 мин. При 37 °С.		
Раствор соляной кислоты 0,1н	4,0	4,0
Образец	0,1	-
Раствор йода 0,01 н.	0,5	0,5

Расчет производится по формуле:

$$\text{Активность, мг/л*сек} = \frac{A_k - A_o}{A_k} \times 44,4 K$$

где  $A_k$  – оптическая плотность контрольной пробы;

$A_o$  – оптическая плотность опытной пробы;

$K$  – коэффициент разведения

Нормальные величины:

В сыворотке (плазме) крови 3,3–8,9 мг/л\*сек;

В моче до 44 мг/л\*сек.

**Работа №2. Заполните таблицу. Опишите общие методы определения активностиферментов.**

Методы	Функции
Спектрофотометрические методы	
Колориметрические (фотометрические) методы	
Манометрические методы	

**Работа №3. Заполните таблицу. Опишите виды катализа**

Вид катализа	Функции
Гомогенный катализ	
Гетерогенный катализ	
Катализ второго уровня	
Ферментативный катализ	

**Подпись преподавателя** \_\_\_\_\_

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Методы преаналитической модификации (дериватизации).
2. Каталитические реакции в биохимии и лабораторной медицине.
3. Использование ферментативных реакций в биохимическом анализе.
4. Способы оценки активности ферментов и их применение в клинической лабораторной диагностике.

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_\_

**Занятие №13**

**Тема: Методы концентрирования и разделения в биохимическом анализе. Хроматографические методы идентификации и разделения. Особенности и примеры применения хроматографии в фундаментальных и прикладных исследованиях и в клинической лабораторной диагностике.**

**Цель:** изучить методы разделения и концентрирования; количественные характеристики разделения и концентрирования; хроматографические методы; особенности хроматографических методов, используемых для биохимического анализа. Научиться анализировать результаты биохимических исследований, формулировать выводы.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Методы маскирования, разделения и концентрирования.
  - a. Методы разделения гетерогенных смесей веществ;
  - b. Методы разделения гомогенных смесей веществ :
    - 1) Методы разделения, основанные на образовании новой фазы ;
    - 2) Мембранные методы разделения веществ ;
    - 3) Методы внутрифазного разделения;
    - 4) Методы разделения, основанные на различиях в распределении веществ между двумя фазами.
2. Краткая история развития хроматографии.
3. Теоретические основы хроматографических процессов.
4. Классификация хроматографических методов разделения и анализа.
5. Газовая хроматография:
  - a. Аппаратура для газовой хроматографии;
  - b. Подвижная и неподвижная фазы;
  - c. Качественный и количественный анализ.
6. Жидкостная колоночная хроматография.
  - a. Ионообменная хроматография, ионная хроматография;
  - b. Аппаратура для колоночной жидкостной хроматографии.
7. Плоскостная бумажная и тонкослойная хроматография: качественный и количественный анализ.
8. Сверхкритическая флюидная хроматография.
9. Использование хроматографических методов анализа.
10. Последние достижения в области применения хроматографических методов анализа.
11. Лабораторные работы по хроматографическим методам анализа.

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1. Разделение меди (II) и железа (III) методом ионообменной хроматографии с последующим титриметрическим определением меди и фотометрическим определением железа.**

Медь(II) и железо(III), совместно присутствующие в водном растворе, можно разделить на катионообменнике. Предварительно катионит, которым заполнена



хроматографическая колонка, переводят в Н-форму, пропуская через колонку раствор 1 моль/л HCl. При этом все катионы, которые могли присутствовать в сорбенте, обмениваются на ионы H<sup>+</sup>, переходят в раствор и уносятся с ним из колонки. После этого через колонку пропускают дистиллированную воду.

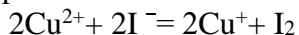
Для разделения меди(II) и железа(III) их переводят в комплексные соединения с противоположными знаками зарядов, прибавляя в анализируемый раствор сульфосалициловую кислоту и аммиак. В этих условиях медь(II) образует положительно заряженный комплекс [Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup>, а железо(III) — отрицательно заряженный сульфосалицилатный комплекс, состав и заряд которого зависят от концентрации прибавленной сульфо-салициловой кислоты и pH среды. Обычно считается, что в условиях проведения анализа образуется трисульфосалицилатный (три аниона сульфосалициловой кислоты связаны с одним атомом железа(III)) анионный комплекс железа (III) желтого цвета с максимумом в спектре поглощения около 416 нм.

При пропускании полученного раствора через колонку с катионитом в Н-форме катионы [Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> сорбируются на катионите, тогда как отрицательно заряженные сульфосалицилатные комплексы железа(III) на катионите не сорбируются и уносятся с ПФ, которую собирают в мерной колбе. После этого через колонку несколько раз пропускают смесь растворов сульфосалициловой кислоты и аммиака, собирают элюат в ту же мерную колбу, которую затем доводят до метки дистиллированной водой, и получают раствор желтого цвета, содержащий все исходное железо(III).

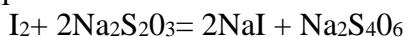
Медь(II) затем элюируют из колонки раствором HCl, собирая элюат в другую мерную колбу. Для этого через колонку с катионитом, содержащим медь(II), пропускают 4 моль/л раствор HCl, после чего колонку несколько раз промывают дистиллированной водой до отрицательной реакции на медь(II). Аммиачный комплекс меди (II) разрушается, и медь(II) элюируется уже в форме хлоридных комплексов.

Элюат и промывные воды, собранные в мерной колбе, доводят дистиллированной водой до метки и получают раствор, содержащий всю отделенную медь(II).

Содержание меди (II) в растворе определяют иодометрическим титрованием. Для этого к аликвотной части раствора, содержащего медь (II), прибавляют избыток 10%-ного раствора KI и оставляют смесь на несколько минут. Протекает реакция



Образовавшийся иод оттитровывают стандартным раствором тиосульфата натрия в присутствии индикатора — крахмала до исчезновения синей окраски титруемого раствора:



Определение железа(III) можно провести фотометрически, например, на фотоэлектроколориметре с использованием светофильтра с максимумом светопоглощения около 400 нм, измеряя оптическую плотность анализируемого раствора относительно раствора сравнения — дистиллированной воды.

## **Работа №2. Расчет содержания вещества по результатам ГЖХ-анализа с использованием внутреннего стандарта.**

Примеси остаточного растворителя — изопропанола — в лекарственном препарате амиодарон определяют методом ГЖХ с использованием внутреннего стандарта —  $\mu$ -пропанола. Для расчетов используют формулу где  $S_{\text{ст}}$  и  $S_x$  — площади пиков на хроматограмме, относящихся к стандарту (н-пропанолу)

$$\frac{S_{\text{ст}}}{S_x} = k \frac{m_{\text{ст}}}{m_x},$$

и определяемому веществу (изопропанолу):  $m_{\text{ст}}$  и  $m_x$  — масса стандарта и определяемого вещества в анализируемой пробе;  $k$  — поправочный коэффициент.

Для нахождения поправочного коэффициента провели хроматографирование 5

эталонных смесей с точно известным содержанием  $\mu$ -пропанола и изопропанола, измерили площади их пиков и по вышеприведенной формуле рассчитали среднее значение поправочного коэффициента, оказавшееся равным  $k = 2,56$ .

Для определения содержания изопропанола в анализируемом препарате амиодарона навеску 0,3000 г препарата растворили в 3 мл раствора внутреннего стандарта —  $\mu$ -пропанола в ледяной уксусной кислоте с содержанием  $n$ -пропанола 0,0002 г/мл и получили испытуемый раствор. Отобрали микрошприцем 3 мкл испытуемого раствора, ввели в испаритель хроматографа и провели хроматографирование. По хроматограмме измерили площади пиков  $S_{CT} = 24$ ,  $S_x = 21$  (в одинаковых единицах измерения).

Требуется определить содержание примеси изопропанола в амиодароне в процентах. Регламентируемое содержание данной примеси в препарате — не более 0,5%.

**Подпись преподавателя**

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Методы концентрирования и разделения в биохимическом анализе.
2. Хроматографические методы идентификации и разделения.
3. Особенности и примеры применения хроматографии в фундаментальных и прикладных исследованиях и в клинической лабораторной диагностике.

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_

**Занятие №14**

**Тема: Электрофоретические методы идентификации и разделения. Особенности электрофоретического разделения биологических макромолекул. Идентификация веществ после электрофоретического разделения. Иммуноэлектрофоретические методы в практике лабораторной медицины.**

**Цель:** изучить электрофоретические методы разделения и анализа веществ; электрофоретические методы анализа и их значение в биохимическом анализе; особенности методов используемых для биохимического анализа.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Общая теория электрофореза.
2. Особенности электрофоретического разделения биологических макромолекул. Классификация электрофоретических методов разделения и анализа веществ. Электрофорез с подвижной границей.
3. Зональный электрофорез.
4. Электрофорез на бумаге.
5. Электрофорез на ацетате целлюлозы.
6. Электрофоретическое разделение фракций крови и фракций липопротеинов плазму крови в клинической лабораторной диагностике.
7. Электрофорез в полиакриламидном и агарозном гелях.
8. Электрофорез белков и нуклеиновых кислот в гелях.
9. Идентификация патологических белков в биологических жидкостях человека. Идентификация веществ после электрофоретического разделения.
10. Непрерывный электрофорез.
11. Особенности применения электрофореза в биохимическом анализе в препаративных целях.
12. Изоэлектрофокусирование.
13. Изотахофорез.
14. Хроматофокусирование.
15. Иммуноэлектрофоретические методы.

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1. Способы проявления электрофореграмм. Проявление гель-электрофореграмм кумасси ярко-синим.**

## Реактивы

1. Кумасси ярко-синий марок R250 и G-250
2. Этанол (300мл)
3. Ледяная уксусная кислота (150мл)
4. ТХУ, 12%-ный раствор (200 мл)

## Оборудование

1. Водяная баня(электроплитка, емкость для кипячения)
2. Ванночки и стаканы для проявления и отмывки геля.
3. Стеклянные воронки, фильтровальная бумага.
4. Цифровая фотокамера.

## Ход работы

Способ1. Окраска кумасси ярко-синим R250, совмещенная с фиксацией

- 1) Подготавливают кипящую водяную баню, установленную в вытяжном шкафу.
- 2) Готовят раствор красителя следующего состава: этанол – 300 мл, ледяная уксусная кислота – 60 мл, кумасси R250 – 0,7г. При необходимости фильтруют (под тягой).
- 3) Гель помещают в стакан и заливают пятикратным (относительно объема геля) объемом раствора красителя. Стакан с гелем помещают на водяную баню в вытяжной шкаф и кипятят 10 мин. При комнатной температуре окраска также возможна, но займет 4 – 5 ч.
- 4) Сливают краситель из стакана, промывают гель дистиллированной водой и заливают 7%-ной уксусной кислотой. Кипятят на водяной бане 5 мин, затем дважды меняют раствор уксусной кислоты на свежий и повторяют кипячение. Добавление в раствор уксусной кислоты мелких кусочков фильтровальной бумаги, сорбирующей краситель, ускоряет отмывку.

### **Работа №2. Экстракция белков из растительных тканей.**

## Приборы и реактивы

1. Растительный материал
2. Среда для выделения ферментов:  
5 мл 0,45 М КНРО  
0,00792 г аскорбата  
0,92 г поливинилпирролидона (ПВП)  
0,9 мл 0,05 М ЭДТА  
Довести рН до 7,0  
добавить 25 мкл Тритона X-100  
довести объем до 45 мл
3. Ступки с пестиками (предварительно охлажденные)
4. Жидкий азот
5. Центрифуга с охлаждением

## Ход работы

Для определения пероксидазной активности 1 г растительного материала 1 г (корни или побеги) фиксируют жидким азотом и затем гомогенизируют в ступке с 4 мл фосфатного буфера (рН 8,0). Гомогенат центрифугируют при 7000 об/мин 15 мин, используют надосадочную жидкость.

При необходимости выделения хлоропластной фракции ферментов: Навеску листьев (1 г) растирают в охлажденной ступке с 7 мл среды выделения. Гомогенат отжимают в центрифужные пробирки через четырехслойную марлю. Уравновешанные пробирки центрифугируют 7 мин при 1000g. После центрифугирования супернатант сливают, а осадок ресуспензируют в 3,5 мл среды (50 мМ КНРО, 1 мМ ЭДТА, 0,05% тритон-X100, 1 мМ аскорбиновая кислота, рН 7,7) затем снова уравновешивают и повторно центрифугируют 20 мин при 16000g. Для дальнейших исследований используют надосадочную жидкость.

Для выделения общеклеточной ферментной фракции навеску листьев (1 г) растирают в 3.5 мл среды выделения (50 мМ КНРО, 1 мМ ЭДТА, 0,05% тритон-Х100, 1 мМ аскорбиновая кислота, рН7,7). Суспензию центрифугируют 20 мин при 16000g, Надосадочную жидкость вносят в «карманы» на пластине геля.

**Работа №3. Подготовка проб крови и мышечной ткани для электрофоретических исследований.**

Кровь крысы (2-3 мл) собирают в сухую центрифужную пробирку и оставляют на 30 мин при 37 С. По окончании экспозиции стеклянной палочкой осторожно отделяют сгусток от стенок пробирки, кровь центрифугируют (10 мин, 3000 об/мин). Полученную сыворотку сливают в чистую пробирку.

При изучении изоформного состава тайтина могут использоваться как свежие образцы скелетных и сердечных мышц, так и образцы, хранившиеся непродолжительное время при температуре -80 С.

Образцы мышечной ткани инкубируются в солюбилизирующем растворе в течение 30-40 минут при комнатной температуре (20-30 С). Солюбилизирующий раствор должен содержать 10 мМ трис-НСl, 1,5% ДСН, 10% глицерина, 2% β-меркаптоэтанола (или 75 мМ ДТТ), 8-10 мкг/мл ингибитора протеиназ леупептина или Е-64, рН 6,8-7,0. Раствор, полученный в результате солюбилизации спользуется для проведения электрофоретического исследования.

**Подпись преподавателя**

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Элетрофоретические методы разделения белков в диагностике заболеваний.
2. Свободный (фронтальный) электрофорез.
3. Зональный электрофорез.

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_

**Занятие №15.**

**Тема: Биохимический анализ с использованием методов непосредственного наблюдения. Комплексное использование аналитических подходов в биохимическом анализе: гибридные методы анализа.**

**Цель:** изучить методы непосредственного наблюдения, разделения веществ, аналитические методы, а также гибридные методы в биохимическом анализе. Научиться характеризовать описать методы непосредственного наблюдения; описать методы разделения и аналитические методы в биохимическом анализе.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Биохимический анализ с использованием методов непосредственного наблюдения.
2. Значение методов непосредственного наблюдения для биохимического анализа. Оптическая микроскопия. Электронная микроскопия. Рентгеновская микроскопия.
3. Методы разделения. Разделение с помощью мембран. Центрифугирование. Электрофорез. Хроматография. Виды хроматографии.
4. Принципы комплексного использования различных методов анализа в аналитической биохимии. Спектроскопия. Колориметрия и спектрофотометрия. Спектрофлюориметрия. Пламенная спектрофотометрия. ЭПР-спектрометрия. ЯМР-спектрометрия. Радиоизотопные методы. Потенциометрия.
5. Гибридные методы анализа.

**Самостоятельная работа.**

**Работа №1. Заполнить таблицу: Непосредственное наблюдение.**

Методы непосредственного наблюдения	Краткое описание
-------------------------------------	------------------

1.Электронная микроскопия	
2.Рентгеноструктурный анализ	

**Работа №2. Заполнить таблицу: Методы разделения.**

<b>Метод разделения</b>	<b>Краткая характеристика</b>
1.Разделение с помощью мембран	
2.Центрифугирование	
3.Электрофорез	
4.Хроматография. Виды хроматографии.	

**Работа №3. Заполнить таблицу: Аналитические методы анализа.**

<b>Метод разделения</b>	<b>Краткая характеристика</b>
1.Спектроскопические методы.	
2.Колориметрия и спектрофотометрия	
3.Инфрокрасная спектроскопия	
4.Спектро-флюориметрия	
5.Пламенная спектрофотометрия	
6.ЭПР-спектрометрия	
7.ЯМР- спектрометрия.	
8. Масс-спектрометрия	
9.Радио-изотопные методы	
10.Потенциометрия	

Подпись преподавателя \_\_\_\_\_

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Биохимический анализ с использованием методов непосредственного наблюдения.
2. Комплексное использование аналитических подходов в биохимическом анализе: гибридные методы анализа.

«\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_\_

**Занятие №16**

**Тема: Методы решения задачи выбора оптимальных аналитических подходов в биохимических исследованиях и клинической лабораторной диагностике. Получение и подготовка биологических образцов. Хранение биологических проб. Значение современных информационных и телекоммуникационных технологий в деятельности врача-биохимика. Заключительный коллоквиум.**

**Цель:** изучить способы получения и подготовки биологических образцов; научиться использовать аналитические подходы в биохимическом анализе; уметь объяснять особенности методов используемых для биохимического анализа.

**Вопросы для обсуждения.**

1. Получение и подготовка биологических образцов для исследования.
2. Получение образца для анализа, правила отбора клинических биологических проб.
3. Методы разрушения клеток: механические, ультразвуковые, химические, комбинированные.
4. Разделение субклеточных фракций. Выделение и очистка исследуемых соединений. Последовательное использование различных методов разделения веществ в биохимическом анализе.
5. Особенности хранения биологических образцов в зависимости от аналитической задачи.

6. Методы оценки результатов биохимического анализа.
7. Способы фиксации (записи) экспериментальных данных.
8. Использование компьютерных баз данных для хранения необработанное разнородной экспериментальной и диагностической информации.
9. Методы статистической обработки биохимических и клинико-диагностических данных. Программное обеспечение.
10. Общие принципы планирования, проведения и оценки результатов биохимического эксперимента.
11. Преаналитические процедуры, зависимость выбора методов пробоотбора и пробоподготовки от последующих аналитических процедур.
12. Комплексного использования методов аналитической биохимии в анализе биологических проб.
13. Способы рационального и эффективного информационного поиска и их применение в решении задач аналитической биохимии.

### **Самостоятельная работа.**

#### **Работа №1. Ферментативное определение глюкозы в крови.**

Компоненты реакционной среды внести в пробирки в количествах, указанных в таблице 1:

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Сыворотка крови	0,01	-	-
Калибровочный раствор глюкозы	-	0,01	-
Вода дистиллированная	-	-	0,01
Рабочий раствор	1,00	1,00	1,00

Содержимое пробирок тщательно перемешивают и инкубируют в течение 15 минут при температуре 37°C или в течение 30 минут при комнатной температуре (+18-25°C). Через 5-10 минут после начала инкубации пробирки интенсивно встряхнуть. После окончания инкубации измерить величину оптической плотности калибровочной и опытных проб против контрольной пробы при длине волны 504 (490-550) нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 или 5 мм. Окраска устойчива в течение 1 часа после окончания инкубации.

Концентрацию глюкозы рассчитать по формуле:

$$C = \frac{E_{оп}}{E_{к}} * 10$$

где С – концентрация глюкозы в опытной пробе, ммоль/л;

E<sub>оп</sub> – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

E<sub>к</sub> - оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

10 - концентрация глюкозы в калибровочном растворе ммоль/л.

#### **Работа №2. Получение гомогената печени и определение в ней интенсивности ПОЛ по накоплению малонового диальдегида.**

Для получения гомогената удаленную ткань отмывают от крови охлажденным до +4°C 0,9% раствором NaCl, гомогенизируют при +4°C с 0,9% раствором NaCl (в соотношении 1:10), содержащим 3 мМ ЭДТА.

0,5 мл гомогената добавляют в 1 мл 15% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУК), перемешивают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут. К 1 мл надосадочной жидкости(центрифугат должен быть прозрачен) добавляют 2 мл 0,8% раствора ТБК. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 15 минут. После охлаждения в течение 30 минут пробы колориметрируют при 532 нм на фоне контроля (1 мл ТХУК и 2 мл ТБК). Количество МДА в пробирках рассчитывают, используя молярный коэффициент экстинции  $1,56 * 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

**Подпись преподавателя**

---

**Темы для подготовки рефератов, докладов и презентаций в рамках самостоятельной работы студентов:**

1. Методы решения задачи выбора оптимальных аналитических подходов в биохимических исследованиях и клинической лабораторной диагностике.
2. Получение и подготовка биологических образцов.
3. Хранение биологических проб.
4. Значение современных информационных и телекоммуникационных технологий в деятельности врача-биохимика.

Учебное издание

Авторы:

С.А. Лужнова, к.б.н., доц.; .Е.О. Куличенко; Ю.К. Василенко, д-р мед.наук, проф.; А.М. Темирбулатова, канд.фарм.наук; Е.О. Сергеева, канд.фарм.наук; И.В. Скульте, канд.фарм наук; Е.П. Парфентьева, канд.фарм.наук, доцент; С.С. Сигарева.

**Рабочая тетрадь по дисциплине «Медицинская биохимия. «Принципы измерительных технологий в биохимии. Патохимия, диагностика. Биохимия злокачественного роста» по специальности 30.05.01 «Медицинская биохимия» (уровень специалитета)**

**Семестр VIII**

Подписано в печать «\_\_»\_\_\_\_\_2020г.

Формат 60x84 1/16 Бумага офсетная.

Печать ротапунктная. Усл. печ. \_1,8\_.

Уч.- изд.л. \_1,8\_.

Тираж \_\_\_\_\_ заказ \_\_\_\_\_

**ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ - филиал  
ФГБОУ ВО ВОЛГГМУ г. Пятигорск, пр. Калинина, 11**