

Инструкция по выполнению методик по научному направлению «Биохимические исследования»

**Разработала научный консультант НИЦ, к.х.н. Е.Л.Алексахина,
ответственная за выполнение данного блока методик**

№1

**Метод определения интенсивности перекисного окисления
липидов и антиоксидантной активности проб крови, мочи, слюны и
питьевой, артезианской, водопроводной, талой, минеральной вод (БХЛ
07)**

1. Включить прибор в сеть;
2. Прогреть 20 мин;
3. Войти в программу;
4. Включить режим измерения;
5. В кювету к 0,1 мл пробы добавить фосфатный буфер, 0,05 мМ раствор сульфата железа;
6. Поместить кювету в измерительное гнездо прибора БХЛ-07;
7. Добавить 0,2 мл 2% перекиси водорода;
8. Резко повернуть ручку кюветного блока на 180°;
9. Зарегистрировать кривую хемилюминесценции и 10 параметров измерения хемилюминесценции;

№2

**Метод спектрофотометрического определения
свободного оксипролина в сыворотке.**

1. К 0.25 мл сыворотки крови добавляют абсолютный спирт, перемешать.
2. Центрифугировать 10 мин. при 3000 тыс. об/мин.
3. Надосадочную жидкость перенести в калибровочную пробирку.
4. Тщательно перемешивая, добавить растворы Хлорамина Т, ацетат-цитратный буфер и изопропиловый спирт.
5. Через 4мин. добавляют раствор Эрлиха.
6. Довести раствор изопропиловым спиртом до метки 2.5 мл. закрыть пробирки пробкой и инкубировать на водяной бане на 30 мин. при 60°C.
7. Охлаждать до комнатной температуры;
8. Определить оптическую плотность опытной пробы против контрольной при длине волны 558 нм;
9. Определить концентрацию свободного оксипролина (мкг/мл).

№3

Метод спектрофотометрического определения цитруллина в любой прозрачной биологической жидкости.

1. Приготовить 0,008 % раствор диацетилмоноксима, растворив его в 5% уксусной кислоте (реагент 1);
2. Приготовить 0,9 % раствор антипирина в воде(реагент 2);
3. Приготовить 48,75 % сернокислый раствор хлорного железа(реагент 3);
4. Перед опытом реагенты 1,2,3 смешать в соотношении 75:15:10 (по объему).
5. Приготовить 0,02 N раствор соляной кислоты;
6. Приготовить стандартный солянокислый раствор цитруллина;
7. Смешать 0,02 мл биологической жидкости и 3 мл полученной смеси реагентов;
8. Объем полученного раствора довести водой до 4 мл;
9. Образец плотно закрыть, перемешать и инкубировать в кипящей водяной бане 25 минут;
10. Охлаждать в ледяной воде 5 мин;
11. Выдержать при комнатной температуре 10 мин;
12. Смотреть при длине волны 464 нм против H_2O ;
13. Рассчитать концентрацию цитруллина (ммоль/л).

№4

Метод спектрофотометрического определения суммарного содержания нитрит- и нитрат-ионов в биологической жидкости.

1. Смешать в центрифужной пробирке 0,5 мл исследуемой пробы и 1 мл абсолютного этанола;
2. Охладить в морозильной камере 30 мин;
3. Исследуемую пробу центрифугировать 30 мин. при 6000 об/мин;
4. Отобрать 1 мл надосадочной жидкости;
5. Добавить 0,8 мл насыщенного солянокислого раствора VCl_3 ;
6. Добавить 0,2 мл раствора Грисса;
7. Инкубировать 30 мин. при $37^{\circ}C$;
8. Определить оптическую плотность исследуемой пробы при 540 нМ. против воды.

№5

Спектрофотометрический метод определения активности ксантиноксидазы в сыворотке.

1. Для получения контрольной пробы смешать 0,3 мл сыворотки 0,5 мл фосфатного буфера ($pH = 7,5$), 0,5 мл раствора оксалата калия и 1,7 мл дистиллированной воды.

2. Для получения опытной пробы смешать 0,3 мл сыворотки, 0,5 мл фосфатного буфера , 0,5 мл раствора оксалата калия, 1 мл раствора ксантина и 0,7 мл дистиллированной воды.
3. Инкубировать 30 мин. при 37°C.
4. После инкубации во все пробирки добавить 1,2 мл 20% раствора ТХУ, перемешать и центрифугировать при 3000 тыс. об/мин. 15 минут.
5. Измерить оптическую плотность надосадочной жидкости при 292 нм.
6. Рассчитать активность ксантиноксидазы (МЕ/мл).

№6

Метод спектрофотометрического определения малонового диальдегида в плазме (сыворотке).

1. К 0.3 мл плазмы добавить 2,4 мл раствора серной кислоты и 0,3 мл раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты.
2. Перемешать и инкубировать на 10 минут при комнатной температуре.
3. Центрифугировать при 3000 тыс. об/мин. 15 мин.
4. Надосадочную жидкость декантировать.
5. К осадку добавить 1 мл. дистиллированной воды.
6. Центрифугировать 2 раза по 5 мин. при 3000 тыс. об/мин.
7. К полученному осадку добавить 3 мл воды и 1 мл раствора тиобарбитуровой кислоты.
8. Встряхнуть, перемешать.
9. Инкубировать на водяной бане 95-100°C в течение часа.
10. Охладить, центрифугировать 30 мин. со скоростью 3000 тыс. об/мин.
11. Определить оптическую плотность при длине волны 532 нм.
12. Рассчитать концентрацию малонового диальдегида (нмоль/мл)

№7а

Определение концентрации неорганического фосфора в биологической жидкости спектрофотометрическим методом (набор реагентов Ольвекс диагностикум)

1. Для получения опытной пробы смешать готовый рабочий реагент 2 мл. и исследуемый образец 0,02 мл.
2. Для получения калибровочной пробы смешать рабочий реагент 2 мл и раствор калибратора 0,02 мл.
3. Для получения контрольной пробы смешать 2 мл готового рабочего реагента и 0,02 мл бидистиллята.
4. Инкубировать при комнатной температуре 5 мин.

5. Измерить оптическую плотность калибровочной и опытной проб против контрольной при 340 нм.
6. Рассчитать концентрацию неорганического фосфора (ммоль/л).

№7б

Определение концентрации кальция в биологической жидкости спектрофотометрическим методом (набор реагентов Ольвекс диагностикум)

1. Для получения опытной пробы смешать готовый рабочий реагент №1 1 мл, №2 1 мл. и исследуемый образец биологической жидкости 0,05 мл.
2. Для получения калибровочной пробы смешать рабочий реагент №1 1 мл., рабочий реагент №2 1 мл. и калибратор 0,05 мл.
3. Для получения контрольной пробы смешать реагент №1 1 мл. и №2 1 мл. и бидистиллированная вода 0,05 мл.
4. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при 570 нм.
5. Рассчитать концентрацию кальция (ммоль/л).

№7в

Определение концентрации магния в биологической жидкости спектрофотометрическим методом (набор реагентов Ольвекс диагностикум).

1. Для получения опытной пробы смешать рабочий реагент 1 мл и 0,01 мл биологической жидкости.
2. Для получения калибровочной пробы смешать рабочий реагент 1 мл и 0,01 мл калибратора.
3. Для получения контрольной пробы смешать рабочий реагент 1 мл и 0,01 мл бидистиллированной воды.
4. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при 520 нм.
5. Рассчитать концентрацию магния (ммоль/л).

№7г

Метод спектрофотометрического определения магния по цветной реакции с титановым желтым.

1. Цельную гепаринизированную кровь центрифугировать 30 мин. при 3000 тыс. об/мин.
2. Смешать 0,5 мл. эритроцитарной массы с 2,5 мл дистиллированной воды, 1 мл 0,67 Н раствором серной кислоты, 1 мл 10 % раствором вольфрамово кислого натрия.

3. Через 15 минут центрифугировать при 3000 тыс. об/мин. 15 минут.
4. Центрифугат перенести в градуированную пробирку на 10 мл.
5. Внести 1 каплю метилового красного.
6. Нейтрализовать раствором 0.2 Н NaOH до появления желтой окраски.
7. Добавить 1 мл 2% раствора гидроксиламина, 1 мл титанового желтого, и 2 мл 1.5Н NaOH.
8. Объем содержимого довести водой до 10 мл.
9. Определить оптическую плотность опытной пробы против контрольной при 540 нм.
10. Рассчитать концентрацию магния (ммоль/л).