

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Тема: Склад крові. Розділення клітин та речовин у біологічних рідинах.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Кров є рідкою сполучною тканиною, що складається з плазми і формених елементів. Загальна кількість крові у вищих тварин залежить від виду, статі, інтенсивності метаболізму - чим інтенсивніше протікає обмін, тим вище потреба в кисні і більше крові у тварини. В організмі людини 4,5-6,0 л крові, або 7% від маси тіла. Обсяг крові в організмі - величина досить постійна і ретельно регульована.

Плазма крові складається з води (90-92%) і сухих речовин (10-8%) - білків, мінеральних елементів, вуглеводів, ліпідів, біологічно активних сполук.

Загальний вміст білків становить 6,6-8,2% обсягу плазми (у дорослої людини 200-300 г), основні з них: альбуміни - 4,0-4,5%, глобуліни - 2,8-3,1%, фібриноген - 0,1-0,4%.

Альбуміни завдяки високій концентрації в крові, великій рухливості і невеликим розміром молекули визначають онкотичний тиск плазми і грають істотну роль в транспорті кров'ю різних речовин - білірубину, солей важких металів, жирних кислот, лікарських засобів (сульфаніламідів, антибіотиків і ін.).

Глобуліни плазми поділяють на кілька фракцій: α 1-, α 2-, β - і γ -глобуліни, які також неоднорідні і за допомогою методу імунофореза підрозділяються на субфракції. Наприклад, у фракції α 1-глобулінів є білки, простетичну групу яких складають вуглеводи; в складі глікопротеїнів циркулює до 60% вуглеводів плазми. β -глобуліни беруть участь у транспорті фосфоліпідів, холестеролу, стероїдних гормонів, металевих катіонів. Наприклад, металовмісний білок трансферин здійснює перенесення заліза кров'ю - кожна молекула трансферину несе два атоми заліза.

Альбуміни, α - і β -глобуліни є також пластичними речовинами крові, вони безупинно утворюються в печінці і використовуються тканинами в процесі обміну речовин. γ -глобуліни мають найнижчу електрофоретичну рухливість. Вони виконують захисну функцію, будучи факторами специфічного і неспецифічного імунітету, є різні фракції антитіл, які захищають організм від вторгнення вірусів і бактерій: пропердин, що інактивує віруси і бактерії; інтерферон, що руйнує генетичну структуру вірусу. До γ -глобулінів належать також аглютиніни крові. Глобуліни синтезуються в печінці і в клітинах мононуклеарно фагоцитарної системи (МФС).

Фібриноген займає проміжне положення між фракціями β - і γ -глобулінів. Білок синтезується в клітинах печінки, МФС і необхідний для згортання крові. Під впливом тромбіну розчинний білок фібрин починає приймати волокнисту структуру, переходить у фібрин, що обумовлює згортання крові і її перетворення протягом декількох хвилин у щільний згусток.

Сироватка крові відрізняється від плазми тільки відсутністю фібриногену.

Фібриноген і альбумін синтезуються в печінці.

До складу плазми входять небілкові азотовмісні речовини (аміак, сечовина, сечова кислота, креатин, креатинін, амінокислоти та ін.). Загальна їх зміст складає 30-40 мг%. У плазмі крові містяться і інші органічні речовини, ммоль \cdot л-1: глюкоза - 4,44-6,66, холестерол - 4,7-5,8, молочна кислота - 1,1-1,5; піровиноградна кислота - 0,14; ліпіди - 4,7-6,11. Неорганічні речовини плазми (або сироватки) складають близько 1% і представлені, ммоль \cdot л-1: Na^+ (142), Ca^{2+} (2,5), K^+ (4,4), Mg^{2+} (0,9), Cl^- (103). Плазма містить бікарбонати - 24 ммоль \cdot л-1 при співвідношенні бікарбонат / вугільна кислота 20:1; фосфати - 1 ммоль \cdot л-1 при співвідношенні двузаміщеного і однозаміщеного фосфату натрію 4:1; сульфати - 0,5 ммоль \cdot л-1. Плазма містить компоненти, концентрація яких змінюється: ферменти (наприклад, ліпазу і амілазу), вітаміни, гормони, розчинні продукти гідролізу харчових речовин в шлунково-кишковому тракті, а також продукти, що підлягають екскреції.

У клінічних і санітарно-гігієнічних лабораторіях центрифугування використовують для відокремлення еритроцитів від плазми крові, згустків крові від сироватки, щільних частинок від рідкої частини сечі, тощо. Для цієї мети застосовують або ручні центрифуги, або центрифуги з електроприводом, швидкість обертання яких можна регулювати.



А



Б

Рис. Електрична (А) та ручна (Б) центрифуги



Рис. Відокремлення еритроцитів від плазми крові

Центрифугування - це поділ механічних сумішей на складові частини дією відцентрової сили. Прилади, що застосовуються для цієї мети, називають центрифугами. Основною частиною центрифуги є ротор з вмонтованими в ньому гніздами для центрифужних пробірок. Ротор обертається з великою швидкістю, внаслідок чого створюються значні за величиною відцентрові сили, під дією яких відбувається поділ механічних сумішей, наприклад осадження зважених в рідині частинок.

Ультрацентрифуги, швидкість обертання роторів яких перевищує 40 000 об / хв, застосовують зазвичай в експериментальній практиці для розділення органел клітин, відділення колоїдних частинок, макромолекул полімерів, тощо.

Принцип дії центрифуги заснований на створенні великої відцентрової сили, під впливом якої швидкість поділу компонентів суміші, вміщеної в центрифугу, збільшується в багато разів у порівнянні зі швидкістю поділу їх під дією сили тяжіння.

Метод центрифугування широко застосовується в біології, медицині та техніці, нерідко замінюючи процеси фільтрування, відстоювання і віджимання.

Центрифуга має корпус, механізм приводу, ротор, робочу (огорожувальну) камеру і панель управління. Деякі центрифуги забезпечені електронним годинником, що забезпечує автоматичне вимикання і гальмування в діапазоні від 5 до 60 хв. Спеціальні центрифуги мають холодильні та вакуумні установки з приладами спостереження і автоматичного управління. Основна частина будь-якої центрифуги - ротор (в лабораторних центрифугах він міститься на вертикально встановленому валу електродвигуна або обертається за допомогою різних передач від вала двигуна, іноді навіть вручну). Ротор центрифуги це диск (хрестовина) з шарнірно закріпленими гніздами для металевих гільз, в яких містяться пробірки, які займають при обертанні горизонтальне положення.

Іноді ротор роблять у вигляді суцільного металевого усіченого конуса з осередками для пробірок (кутовий ротор); пробірки в ньому розташовуються під постійним кутом до осі обертання (зазвичай в 40 °). При похилому положенні пробірок відбувається розшарування

компонентів суміші більш швидко. Поділ суміші ведеться в пробірках найрізноманітнішої форми і об'єму.



При роботі на великих швидкостях використовують пробірки з поліетилену, так як скляні лопаються. Розташовані в роторі одна проти іншої пробірки з оброблюваним матеріалом повинні бути врівноважені. Цим здійснюється рівномірне навантаження на вал ротора і забезпечується рівномірне обертання валу центрифуги. Для врівноваження пробірок застосовують особливі ваги.



ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Дослід № 1 Відмивання еритроцитів від плазми за допомогою центрифугування

Матеріали і реактиви: штатив для пробірок, фізіологічний розчин, 2 скляні центрифужні пробірки, піпетки, ваги, центрифуга

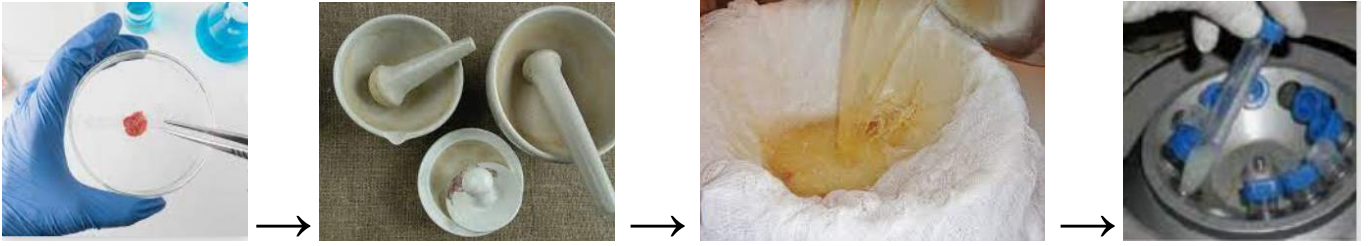
Хід роботи. Після осадження еритроцитів протягом першої доби зберігання у крові збирають плазму. Відмивання еритроцитів від плазми проводять наступним чином: еритроцити розбавляють (1:2) фізіологічним розчином, потім отриману суспензію центрифугують протягом 3 хвилин при 3000 об/хв, насад знімають. Процедуру відмивання повторюють ще раз – доки осад не буде прозорим.



Дослід 2. Приготування м'язового екстракту

Матеріали і реактиви: дистильована вода, м'язова тканина, чашка Петрі, ножиці, фарфорова ступка, марля, фільтрувальний папір, 2 центрифужні полімерні пробірки, піпетки.

Хід роботи. 2-3 г м'язової тканини подрібнюють у чашці Петрі ножицями та поміщують у фарфорову ступку, де розтирають з 5-6 мл дистильованої води. Отриману м'язову кашкицю фільтрують через два шари марлі. Після цього отриманий екстракт переносять у центрифужні пробірки і центрифугують при 3 000 об / хв протягом 10 хв. Насад використовують в якості вихідного матеріалу для визначення різних речовин.



Дослід 3. Виявлення в м'язовому екстракті за допомогою біуретової реакції білка

Принцип методу. У лужному середовищі розчин білка при взаємодії з іонами міді набуває синьо-фіолетового кольору.

Матеріали і реактиви: скляні пробірки, піпетки, дистильована вода, м'язовий екстракт, 10%-ний розчин гідроксиду натрію, 1%-ний розчину сульфату купруму.

Хід роботи. До 5 крапель м'язового екстракту доливають 10 крапель 20 %-го розчину NaOH, потім 2 краплі 1%-го розчину CuSO_4 . З'являється рожеве або рожево-фіолетове забарвлення.

Дослід 4. Отримання безбілкового фільтрату

Матеріали і реактиви: плазма крові, м'язовий екстракт, 5% -ий розчин трихлороцтової кислоти, піпетки, 2 полімерні центрифужні пробірки, центрифуга

Хід роботи. У мікропіпетку набирають 0,5 мл отриманого екстракту або іншого біологічного розчину (наприклад, плазма або сеча), вносять його в центрифужну пробірку і додають 0,5 мл 5% -ого розчину трихлороцтової кислоти. (Обережно! Це їдка речовина.) При наявності білка розчин мутніє.



Вміст пробірки перемішують, переносять у центрифужні пробірки і центрифугують при 3 000 об / хв протягом 5 хв. Білок при цьому осідає. Безбілковий фільтрат (він повинен бути прозорим) зливають і використовують для подальшого аналізу (наприклад, для визначення глюкози).

Питання для підготовки:

1. Склад крові.
2. Поняття про плазму і сироватку.
3. Сполуки, що зустрічаються у крові

Ознайомитися з відеоматеріалом:

1. <https://www.youtube.com/watch?v=eelrmZQGCbs&t=79s>
2. <https://www.youtube.com/watch?v=WNjlb0ZJNww>

Питання для самостійного виконання:

1. Дати відповідь: чому у дітей кількість деяких біохімічних показників крові відрізняється від таких у дорослих. Навести приклади таких відмінностей у порівнянні.
2. Навести приклади інших методів розділення речовин. Пояснити сутність цих методів.