

### **Лабораторна робота №3**

#### **КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКА В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА ДОПОМОГОЮ БІУРЕТОВОГО РЕАКТИВУ**

**Мета роботи:** навчитися кількісно визначати загальний білок у сироватці крові за допомогою біуретового реактиву.

**Практичне значення роботи:** у клініко-біохімічних лабораторіях для встановлення діагнозу захворювання проводять кількісне визначення концентрації загального білка у біологічних рідинах організму (сироватці крові, сечі, спинномозковій рідині).

У нормі вміст загального білка у сироватці крові дорівнює у дорослих 65-85 г/л (6,5-8,5 мг/мл).

Зниження рівня концентрації білка (*гіпопротеїнемія*) спостерігається при недостатньому надходженні білків з їжею або зниженні процесів біосинтезу білків в органах, втраті білка організмом при гострих і хронічних кровотечах, підвищеній проникності капілярних стінок, при крововиливах і набряках.

Підвищення рівня концентрації білка (*гіперпротеїнемія*) відзначається рідко: при згущенні крові через значні втрати рідини, при інфекційному чи токсичному ураженні ретикулоендотеліальної системи, в клітинах якої синтезуються глобуліни, при хронічному поліартриті, ревматизмі.

Гіпопротеїнемія майже завжди пов'язана з гіпоальбунемією, гіперпротеїнемія – з гіперглобулінемією.

**Матеріали та реактиви:** біохімічні пробірки, піпетки, робочий розчин біуретового реактиву, стандартний розчин альбуміну (1 мл стандартного розчину альбуміну, що містить 10 мг або 0,01 г білка), фотоелектроколориметр (КФК-2 або КФК-3), кювети з товщиною шару 1 см, міліметровий папір.

**Принцип реакції.** Реакція утворення комплексу описана в лабораторній роботі №1, дослід 1.

**Хід роботи.** До 5 мл робочого розчину біуретового реактиву додають 0,1 мл 0,9%-й розчин натрій хлориду (фізіологічний розчин) (*холоста* або *контрольна проба*). Вміст пробірки перемішують.

До 5 мл робочого розчину біуретового реактиву додають, уникаючи утворення піни, 0,1 мл сироватки крові (*дослідна проба*). Вміст пробірки перемішують.

До 5 мл робочого розчину біуретового реактиву додають відповідно у 5 пробірок 0,2 мл; 0,4 мл; 0,6 мл; 0,8 мл; 1,0 мл розчину альбуміну, що містить 10 мг або 0,01 г білка в 1 мл (*калібрувальна проба*). Загальний об'єм у кожній пробірці доводять до 1 мл дистильованою водою. Вміст пробірок перемішують.

Через 30 хв, але не пізніше ніж через 1 год., усі проби (*холосту* або *контрольну*, *дослідну*, *калібрувальну*) колориметрують на фотоелектроколориметрі (КФК-2 або КФК-3) в кюветі з товщиною шару 10 мм при зеленому світлофільтрі (максимум пропускання 540-560 нм, краще 546 нм).

У холостій або контрольній пробі спостерігається розчин *синього кольору*. У дослідній та калібрувальних пробах розчин набуває *синьо-фіолетового забарвлення*.

Визначають експериментально показник екстинкції у всіх пробах при довжині хвилі 540 нм або 546 нм.

Будують калібрувальну криву за значеннями показників екстинкції 5 калібрувальних проб (див. пункт 3 – Побудова калібрувальної кривої для речовини та пункт 4 – Визначення концентрації речовини в розчині (див. рис. 6).

Розрахунки концентрації загального білка в сироватці крові виконують за калібрувальною кривою; розраховують на 1 мл нерозведеної сироватки крові. Графік будують на міліметровому папері за прикладом.



**За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.**

#### ✍ Завдання для домашнього виконання

1. Заповніть таблицю 4.

Таблиця 4

#### Методи очистки, розділення білків

№ з/п	Назва методу	Особливості методу, рисунок
1	Діаліз	
2	Центрифугування	
3	Гель-фільтрація	
4	Електрофорез	
5	Тонкошарова хроматографія	
6	Іонно-обмінна хроматографія	
7	Афінна хроматографія	

2. Опишіть метод Лоурі та метод Бредфорда. Оформіть у вигляді таблиці чи схеми. В цьому різниця цих методів?

#### ? Питання для самоконтролю

1. Назвіть і охарактеризуйте методи виділення білків.
2. Назвіть і охарактеризуйте методи очистки білків.
3. Назвіть і охарактеризуйте методи розділення амінокислот і білків.