

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Medicinos akademija

Biochemijos katedra

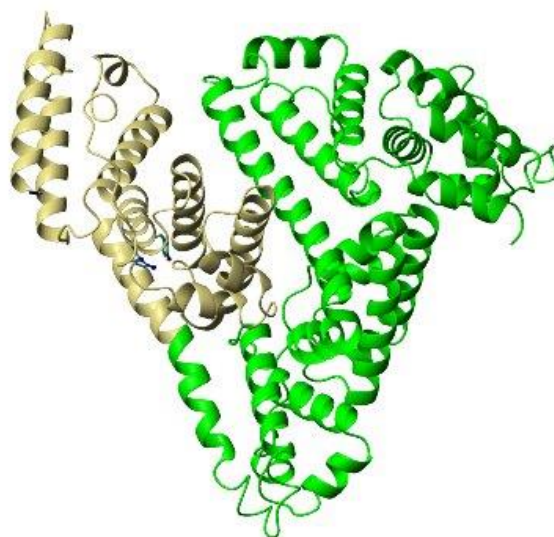
Leonid Ivanov, Artūras Kašauskas, Ramunė Morkūnienė,

Dalė Viežalienė, Laima Ivanovienė

BIOCHEMIJOS LABORATORINIAI DARBAI

Farmacijos fakulteto studentams

Mokymo knyga



Kaunas - 2015

**Aprobavo LSMU Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto taryba ir LSMU
Leidybos komisija 2015-09-09. Protokolas Nr. 9/15
ISBN 978-9955-15-404-4**

Recenzantai:

prof. dr. Liudas Ivanauskas
prof. dr. Ilona Sadauskienė

Autoriai:

© Leonid Ivanov, 2015
© Artūras Kašauskas, 2015
© Ramunė Morkūnienė, 2015
© Dalė Vieželienė, 2015
© Laima Ivanovienė, 2015

ISBN 978-9955-15-404-4

TURINYS

1. Saugaus darbo biochemijos laboratorijoje pagrindinės taisyklės.....	5
2. Vitaminai.....	9
2.1. Kokybinės vandenyje tirpių vitaminų reakcijos.....	10
2.1.1. Reakcija vitaminui B ₁ nustatyti.....	10
2.1.2. Reakcija vitaminui B ₂ nustatyti.....	10
2.1.3. Reakcija vitaminui B ₆ nustatyti.....	11
2.1.4. Reakcija vitaminui PP nustatyti.....	11
2.2. Vitamino C kiekio nustatymas šlapime.....	12
Klausimai saviruošai.....	13
3. Fermentai.....	14
3.1. Fermentų savitumas ir termolabilumas.....	14
3.2. pH įtaka fermentų aktyvumui.....	16
3.3. Seilių α -amilazės aktyvumo nustatymas.....	17
3.4. Kokybinės fermentų reakcijos.....	18
3.4.1. Tirozinazė.....	18
3.4.2. Ureazė.....	19
3.4.3. Peroksidazė.....	20
Klausimai saviruošai.....	21
4. Angliavandeniai ir jų apykaita.....	22
4.1. Glikogeno išskyrimas iš raumenų ir kepenų bei kokybinės reakcijos jam pažinti.....	23
4.2. Gliukozės kiekio nustatymas kraujo serume fermentiniu būdu.....	24
4.3. Gliukozės kiekio nustatymas kraujo serume automatinio analizatoriumi „Cardio Chek“.....	26
4.4. Laktato dehidrogenazės aktyvumo nustatymas kraujo serume fermentiniu būdu.....	26
4.5. Kiekybinis piruvo rūgšties nustatymas šlapime.....	28
Klausimai saviruošai.....	29
5. Lipidai ir jų apykaita.....	31
5.1. Cholesterolio koncentracijos nustatymas kraujo serume fermentiniu būdu.....	32
5.2. Reakcijos acetoninėms medžiagoms šlapime nustatyti.....	34

5.3. Tulžies įtaka lipazės aktyvumui.....	35
Klausimai saviruošai.....	36
6. Baltymų (aminorūgščių) apykaita.....	38
6.1. Kiekybinė skrandžio sulčių analizė.....	38
6.2. Alanino aminotransferazės koncentracijos kraujo serume nustatymas.....	40
6.3. Baltymų kiekio nustatymas kraujo serume biureto metodu.....	41
6.4. Baltymų kiekio nustatymas kraujo serume Bradfordo metodu.....	43
6.5. Baltymų skaidymas pepsinu.....	44
6.6. Kreatinino kiekio nustatymas šlapime.....	45
6.7. Baltymų išskyrimas ir gryninimas.....	46
6.7.1. Gelfiltracija kolonėlėje.....	47
6.7.2. Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje.....	47
6.8. Karbamido koncentracijos nustatymas kraujo serume.....	50
Klausimai saviruošai.....	53
7. Nukleorūgštys ir jų apykaita.....	54
7.1. Mielų nukleoproteinų hidrolizė ir analizė.....	55
7.2. Kokybinis šlapimo rūgšties nustatymas šlapime.....	56
Klausimai saviruošai.....	56
8. Hormonai.....	58
8.1. Kokybinės reakcijos adrenalinui nustatyti.....	58
8.2. Kalcio kiekio nustatymas kraujo serume atvirkštiniu permanganatometrinio metodu.....	59
8.3. Kalcio kiekio nustatymas kraujo serume naudojant specifinius dažus.....	60
Klausimai saviruošai.....	62
9. Šlapimo tyrimas.....	63
9.1. Šlapimo pataloginių sudedamųjų dalių nustatymas.....	63
9.2. Šlapimo tyrimas automatinio analizatoriumi „CLINITEK-100“.....	64
Literatūra.....	66
Priedas. Laboratorinio darbo aprašas.....	67

1. SAUGAUS DARBO BIOCHEMIJOS LABORATORIJOJE PAGRINDINĖS TAISYKLĖS

I. BENDRI REIKALAVIMAI

- 1.1. Studentui, nesilaikančiam šios instrukcijos reikalavimų, taikoma Lietuvos Respublikos įstatymų numatyta drausminė, materialinė, administracinė ir baudžiamoji atsakomybė, priklausomai nuo pažeidimo pobūdžio ir pasekmių.
- 1.2. Laboratorinius darbus studentams leidžiama dirbti tik išklausius darbų saugos instruktažą ir pasirašius instruktažo registracijos žurnale, žinant galimas traumas ir apsinuodijimus ir mokant suteikti pirmąją pagalbą.
- 1.3. Laboratorijoje leidžiama dirbti tik susipažinus su laboratorijos įranga:
 - 1.3.1. žinant vandentiekio ir gamtinių dujų čiaupų išdėstymą ir mokant jais naudotis;
 - 1.3.2. žinant elektros išjungėjų išdėstymo vietas, jų paskirtį ir mokant jais naudotis;
 - 1.3.3. žinant gaisro gesinimo priemonių išdėstymo vietas ir mokant jomis naudotis;
 - 1.3.4. žinant vaistinėlės vietą ir joje esančių pirmos pagalbos priemonių paskirtį.
- 1.4. Laboratorijoje draudžiama:
 - 1.4.1. būti be chalato;
 - 1.4.2. vaikščioti be reikalo po laboratoriją;
 - 1.4.3. valgyti ir gerti;
 - 1.4.4. įeiti pašaliniams asmenims;
 - 1.4.5. dirbti nesant dėstytojo arba laboranto;
 - 1.4.6. dirbti pašalinius darbus;
 - 1.4.7. vykdyti eksperimentus, nenumatytus mokymo planuose;
 - 1.4.8. naudotis sugedusiais prietaisais, įrengimais, suskilusiais indais ir nežinomomis medžiagomis.
- 1.5. Studentai privalo:
 - 1.5.1. vykdyti dėstytojų arba jų įgaliotų asmenų nurodymus;
 - 1.5.2. mokėti saugiai dirbti ir netrukdyti saugiai dirbti kitiems;
 - 1.5.3. esant reikalui naudoti individualias saugos priemones;
 - 1.5.4. informuoti dėstytoją apie susižalojimus laboratorinių darbų metu;
 - 1.5.5. laikytis vidaus tvarkos taisyklių, nevartoti alkoholinių gėrimų bei narkotinių medžiagų. Rūkyti Lietuvos sveikatos mokslų universitete draudžiama;
 - 1.5.6. laikytis asmens higienos taisyklių, prižiūrėti, kad chalatai būtų švarūs.

II. RIZIKOS VEIKSNIAI. SAUGOS PRIEMONĖS NUO JŲ POVEIKIO

2.1. Pavojingi, kenksmingi veiksniai studento darbo vietoje:

- 2.1.1. elektros srovė dėl netvarkingų elektros prietaisų ir aparatų;
- 2.1.2. koncentruotų rūgščių ir šarmų poveikis dėl neatsargaus elgesio su jais;
- 2.1.3. darbas su stikliniais indais – galimi mechaniniai sužalojimai;

2.2. Būtinios saugos priemonės:

- 2.2.2. medvilninis chalatas;
- 2.2.3. esant reikalui – guminės pirštinės, neperšlampama prijuostė, apsauginiai akiniai.

III. VEIKSMAI PRIEŠ DARBO PRADŽIĄ

3.1. Prieš pradėdant darbą būtina:

- 3.1.1. susipažinti su darbo aprašymu ir išsiaiškinti neaiškius klausimus;
- 3.1.2. išsiaiškinti darbe naudojamų reagentų ir reakcijose susidariusių medžiagų savybes ir saugaus darbo su jais taisykles;
- 3.1.3. patikrinti darbo vietą, kad ji būtų švari ir tvarkinga, neapkrauta pašalinėmis medžiagomis ir prietaisais;
- 3.1.4. patikrinti dujų ir vandentiekio čiaupus;
- 3.1.5. patikrinti elektros prietaisų (centrifugos, oro termostato, vandens termostato) įžeminimą ir įjungimo laidų tvarkingumą;
- 3.1.6. gauti dėstytojo leidimą dirbti.

IV. VEIKSMAI DARBO METU

4.1. Darbo metu laboratorijoje reikia laikytis tylos, tvarkos ir švaros. Eksperimentus reikia atlikti ramiai, neskubant, susikaupus ir sąmoningai.

4.2. Darbo metu draudžiama:

- 4.2.1. palikti be priežiūros veikiančius elektrinius prietaisus ir dujų degiklius;
- 4.2.2. išeiti iš laboratorijos be dėstytojo leidimo;
- 4.2.3. dirbti su sugedusiais prietaisais ir suskilusiais indais;
- 4.2.4. dirbti su nežinomomis medžiagomis;
- 4.2.5. dirbti su neįžemintais elektros prietaisais;
- 4.2.6. nešioti reagentus iš jiems skirtų vietų;
- 4.2.7. apkrauti darbo vietą knygomis, nereikalingais reagentais, indais ir prietaisais;
- 4.2.8. laikyti be reikalo įjungtus elektros prietaisus ir dujų degiklius;

4.2.9. pilti chemines medžiagas į kriauklę (panaudotus reagentus pilti į specialius indus, esančius traukos spintoje).

4.3. Dirbant būtina sekti bandymo eigą, laikytis aprašyme nurodyto darbo režimo.

4.4. Dirbant su koncentruotomis rūgštimis, šarmais, degiomis ir nemalonaus kvapo medžiagomis bandymus reikia atlikti tik traukos spintoje, naudojantis individualiomis saugos priemonėmis: akiniais, skydeliais ir pirštinėmis.

4.5. Šildant skysčius mėgintuvėliuose reikia naudotis specialiais laikikliais, o mėgintuvėlį nukreipti į tą pusę, kur nėra žmonių.

4.6. Išpiltus ant grindų ar stalo reagentus, taip pat sudaužytus indus būtina tuoj pat, vadovaujant dėstytojui ar laborantui, pašalinti laikantis reikalingų atsargumo priemonių.

4.7. Dirbant su centrifuga svarbu: įjungti galima tik sudėjus priešpriešai subalansuotus mėgintuvėlius ir uždengus; atidengti tik pilnai sustojus rotorui.

4.8. Naudojantis termostatu sandariai uždaryti termostato duris.

V. STUDENTO VEIKSMAI AVARINIAIS (YPATINGAIS) ATVEJ AIS

5.1. Sugedus įrengimams ar susidarius pavojingai situacijai, reikia nedelsiant nutraukti darbus ir apie tai pranešti dėstytojui.

5.2. Įvykus nelaimingam atsitikimui, reikia suteikti pirmąją medicinos pagalbą nukentėjusiam, prireikus iškviesti gydytoją, išsaugoti nepakeistą įvykio vietą, jei tai negresia aplinkinių gyvybei ir sveikatai; apie įvykį pranešti tiesioginiam darbų vadovui.

5.3. Pirmoji pagalba nukentėjusiam turi būti suteikta nedelsiant.

5.4. Patekus cheminėms medžiagoms į akis, ant veido, rankų arba rūbų tuoj pat tas vietas gausiai plauti vandeniu. Jei nukentėjęs negali to padaryti pats, jam turi padėti kiti asmenys, esantys laboratorijoje.

5.5. Apie kiekvieną nelaimingą atsitikimą būtina informuoti dėstytoją.

5.6. Esant rimtoms traumoms, nudegimams arba apsinuodijimams, nedelsiant iškviesti greitąją medicininę pagalbą.

5.7. Gavus elektros smūgį, nedelsiant išjungti elektros srovę. Jei nukentėjęs neteko sąmonės (arba net atrodo miręs), iki atvykstant greitajai pagalbai daryti dirbtinį kvėpavimą ir širdies masažą.

VI. VEIKSMAI BAIGUS DARBĄ

6.1. Pabaigus darbą būtina:

- 6.1.1. išjungti elektrinius prietaisus, dujas, vandenį;
- 6.1.2. sutvarkyti darbo vietą, sustatant prietaisus, reagentus, indus į jiems skirtas vietas;
- 6.1.3. išplauti indus ir nuvalyti stalą;
- 6.1.4. nusiplauti rankas.

2. VITAMINAI

Vitaminai – nedidelės molekulinės masės biologiškai aktyvūs organiniai junginiai, būtini organizmo medžiagų apykaitai ir gyvybinei veiklai. Žmogaus ląstelėse jie nesintetinami, todėl turi būti gaunami su maistu. Žmogui jų reikia labai nedaug (paros norma – nuo kelių mikrogramų iki keliolikos miligramų, tik vitamino C reikia daugiau – keliasdešimt miligramų per parą). Kai kuriuos vitaminus (B grupės ir vitaminą K) sintetina žarnyno bakterijos, tačiau jų organizmui nepakanka.

Terminą vitaminai pasiūlė lenkų chemikas M. Funkas, kuris vitamino B₁ struktūroje nustatė aminogrupę ir norėjo pažymėti šio junginio svarbą gyvybei: vitaminai – gyvybės aminai (lot. *vita* – gyvybė, gyvenimas + *aminum* – aminai). Vėliau, atradus kitus vitaminus, paaiškėjo, kad vitaminai yra įvairios struktūros organiniai junginiai. Kai kurie jų neturi nei aminogrupės, nei azoto.

Vitaminai, atsižvelgiant į jų tirpumą, skirstomi į dvi grupes:

- 1) riebaluose tirpūs vitaminai: vitaminas A (retinolis, antikseroftalminis), vitaminas D (kalciferolis, antirachitinis), vitaminas E (tokoferolis, antisterilinis), vitaminas K (filochinonas, antihemoraginis);
- 2) vandenyje tirpūs vitaminai: vitaminas B₁ (tiaminas, antineuritinis), vitaminas B₂ (riboflavinas, augimo vitaminas), vitaminas PP arba B₃ (nikotino rūgštis arba nikotinamidas, antipelagrinis), vitaminas B₅ (pantoteno rūgštis, antidermatitinis), vitaminas B₆ (piridoksolis, piridoksalis arba piridoksaminas, antidermatitinis), folio rūgštis (vitaminas B₉, antianeminis), vitaminas B₁₂ (kobalaminas, antianeminis), vitaminas H (biotinas, antiseborėjinis), vitaminas C (askorbo rūgštis, antiskorbutinis).

Visi vandenyje tirpūs vitaminai, išskyrus vitaminą C, vadinami B grupės vitaminais. Kai vandenyje tirpių vitaminų koncentracija kraujo plazmoje didesnė už inkstų slenkstį, jie išskiriami su šlapimu. Iš vandenyje tirpių vitaminų organizme susidaro kofermentai, būtini fermentų veikimui.

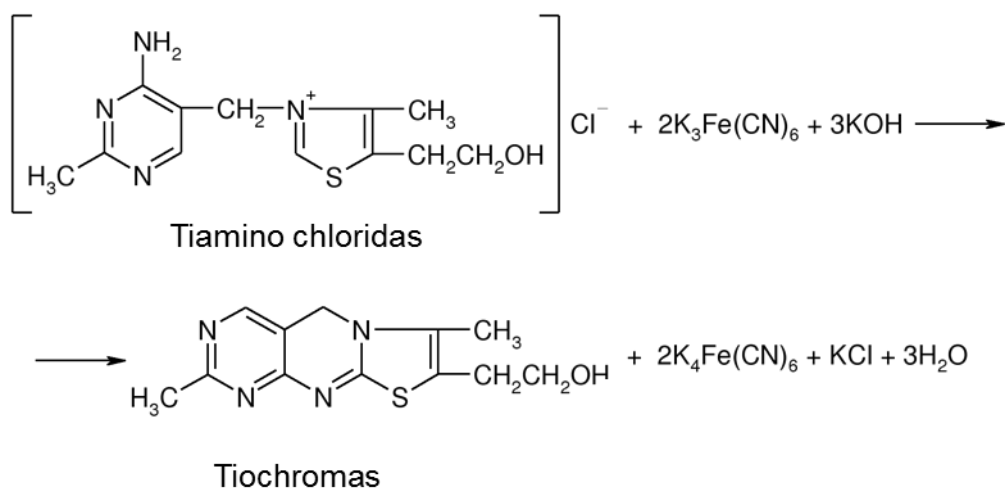
Ligos, kuriomis susergama, kai žmogus negauna vitaminų, vadinamos avitaminozėmis. Jeigu vitaminų gaunama nepakankamai, išsivysto hipovitaminozės. Dažnesnės yra ne vieno, bet kelių vitaminų hipovitaminozės (polihipovitaminozės). Kai organizmas gauna vitaminų per daug, prasideda hipervitaminozės. Dažniausiai perdozuojami riebaluose tirpūs vitaminai A, D ir K. Dideli jų kiekiai organizmui yra

toksiški. Pavyzdžiui, vitamino D hipervitaminozės atveju iš kaulinio audinio išsiskiria daug kalcio, jis patenka į organizmo skysčius, ima kalkėti minkštieji audiniai.

2.1. KOKYBINĖS VANDENYJE TIRPIŲ VITAMINŲ REAKCIJOS

2.1.1. Reakcija vitaminui B₁ nustatyti

Veikiant oksidatoriams tiaminas virsta tiochromu:



Darbo eiga:

1. Į mėgintuvėlį įlašinamas 1 lašas 0,1% tiamino tirpalo, 5 lašai 5% NaOH (natrio hidroksido) tirpalo ir 1 lašas 5% K₃[Fe(CN)₆] (raudonosios kraujo druskos; kalio heksacianoferato III) tirpalo. Sumaišoma.
2. Mėgintuvėlio turinys pašildomas. Tiaminas virsta tiochromu, tirpalas nusidažo geltona spalva.

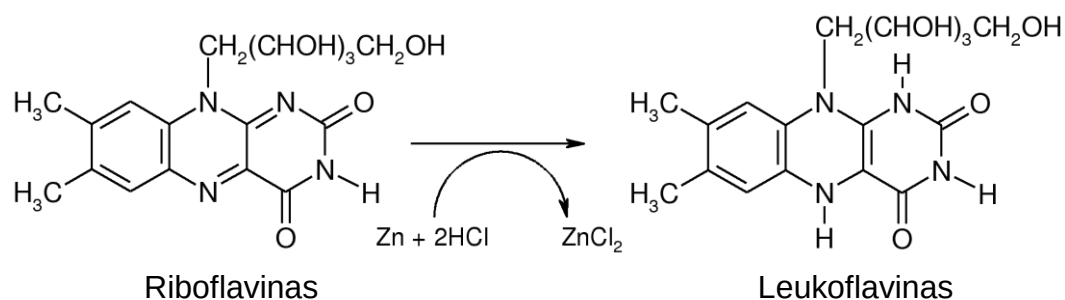
2.1.2. Reakcija vitaminui B₂ nustatyti

Redukuojamas riboflavinas iš pradžių virsta raudonos spalvos rodoflavinu, vėliau – bespalviu leukoflavinu.

Darbo eiga:

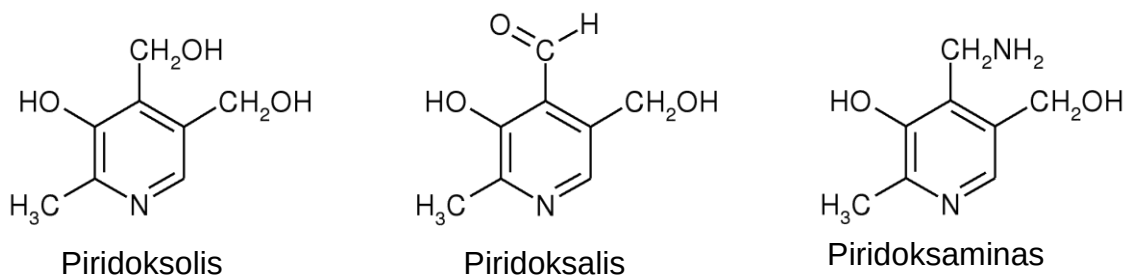
1. Į mėgintuvėlį įlašinama 10 lašų 0,25% riboflavino tirpalo ir 5 lašai koncentruoto HCl (vandenilio chlorido; druskos rūgšties) tirpalo.

- Įmetamas gabalėlis cinko. Tirpalas iš pradžių įgauna raudoną spalvą, o paskui spalva išnyksta.



2.1.3. Reakcija vitaminui B₆ nustatyti

Vitaminas B₆ yra piridino darinys.



Jis su FeCl₃ (geležies (III) chloridu) sudaro raudonos spalvos junginį.

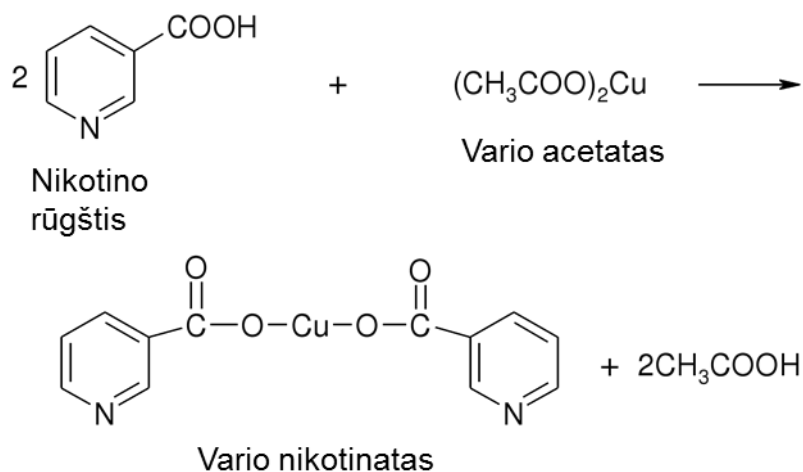
Darbo eiga:

- Į mėgintuvėlį įlašinami keli lašai 5% vitamino B₆ tirpalo ir 1 lašas 5% FeCl₃. Tirpalas nusidažo raudona spalva.

2.1.4. Reakcija vitaminui PP nustatyti

Darbo eiga:

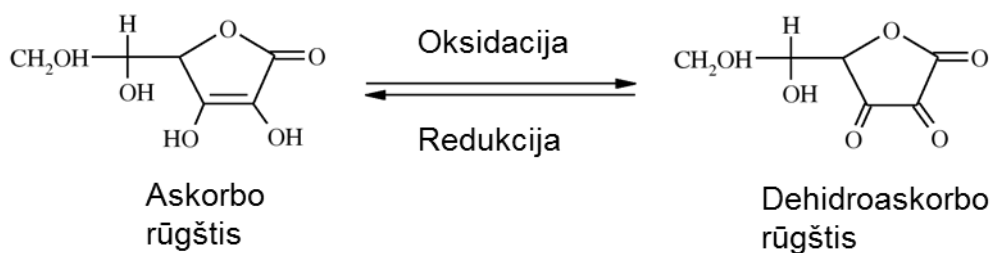
- Apie 10 mg nikotino rūgšties ištirpinama 10-20 lašų 10% CH₃COOH (etano (acto) rūgšties) tirpalo. Tirpinama šildant.
- Į verdantį tirpalą įpilamas toks pats tūris 5% (CH₃COO)₂Cu (vario acetato) tirpalo. Mišinys susidrumsčia, įgauna žydrą spalvą, o pastovėjus išsiskiria mėlynos nuosėdos.



2.2. VITAMINO C KIEKIO NUSTATYMAS ŠLAPIME

Vitamino C (askorbo rūgštis) kiekis žmogaus kraujo plazmoje yra 0,7-1,2 mg/100 ml. Kai maiste nedaug vitamino C, jo šlapime nerandama. Suvartojus didesnius vitamino C kiekius, dalis jo išsiskiria su šlapimu.

Vitaminui C yra būdingos stiprios redukcinės savybės, jis dalyvauja organizme vykstančiose oksidacijos-redukcijos reakcijose, pavirsdamas dehidroaskorbo rūgštimi.



Darbo eiga:

1. Į 200 ml kolbą įpilama 10 ml tiriamo šlapimo, 100 ml vandens ir 1 ml ledinės CH_3COOH tirpalo.
2. Tirpalas titruojamas 0,001 N 2,6-dichlorfenolindofenolio tirpalu, kol jis įgauna silpnai rožinę spalvą.
3. Atsižvelgiant į suvartotą titravimui 0,001 N 2,6-dichlorfenolindofenolio kiekį, apskaičiuojamas vitamino C kiekis paros šlapime. 1 ml 0,001 N 2,6-dichlorfenolindofenolio tirpalo (titranto) atitinka 0,088 mg askorbo rūgšties.

4. Žinant, kad paros šlapimo kiekis yra 1500 ml, vitamino C kiekis paros šlapime randamas pagal tokią išraišką:

$$m \text{ (mg)} = \frac{V_{\text{titranto}} \text{ (ml)} \times 0,088 \text{ (mg)} \times 1500 \text{ (ml)}}{10 \text{ (ml)}}$$

KLAUSIMAI SAVIRUOŠAI

Vitaminai, jų biologinis vaidmuo:

1. Ką vadiname vitaminais?
2. Išvardinkite: a) vandenyje tirpius vitaminus, b) riebaluose tirpius vitaminus.
3. Kuriems (vandenyje ar riebaluose tirpiems) vitaminams būdingi hipervitaminozės reiškiniai? Apibūdinkite šiuos reiškinius.
4. Apibūdinkite riebaluose tirpių vitaminų biologinį vaidmenį organizme.
5. Apibūdinkite biochemines funkcijas bei hipovitaminozių požymius šiems vitaminams: tiaminas (vitaminas B₁); riboflavinai (vitaminai B₂); niacinas, nikotino rūgštis (vitaminas PP, vitaminas B₃); pantoteno rūgštis (vitaminas B₅); piridoksolis (vitaminas B₆); ciankobalaminas (vitaminas B₁₂); folio rūgštis (vitaminas B₉); biotinas (vitaminas H); askorbo rūgštis (vitaminas C).

3. FERMENTAI

Fermentai (*enzimai*) – biologinėse sistemose vykstančių reakcijų katalizatoriai. Dauguma fermentų yra tirpūs globuliniai baltymai (išskyrus nedidelę grupę RNR molekulių – ribozimų, kurioms būdingas katalizinis aktyvumas).

Fermentai, kaip ir visi katalizatoriai, didina tik energiškai palankių reakcijų greitį, mažindami aktyvacijos energiją. Jie vienodai greitina pusiausvyrinės reakcijos tiesiogines ir grįžtamasias reakcijas, t.y. nekeičia reakcijos krypties, bet pagreitina reakcijos pusiausvyros pastovumą. Fermentams būdingos išskirtinės savybės: didelis katalizinis pajėgumas – pagreitina reakciją 10^7 - 10^{10} kartų (pvz., fermentas ureazė - net 10^{14} kartų); savitumas – veikia tik vieną ar keletą panašios struktūros junginių. Fermentai yra labai jautrūs aplinkos sąlygų (pvz., temperatūros ir pH) pokyčiams; denatūruojami praranda aktyvumą. Fermentų aktyvumas gali būti reguliuojamas, jiems sąveikaujant su savitosiomis molekulėmis, fiziologiniais efektoriais (kovalentinė modifikacija, alosterinė sąveika). Dėl šios savybės sudėtingos fermentinės sistemos veikia suderintai ir garantuoja ląstelės cheminių procesų atitikimą besikeičiančiomis aplinkos sąlygomis.

Fermentų yra visuose audiniuose ir kūno skysčiuose. Viduląsteliniai fermentai katalizuoja metabolinių kelių reakcijas; plazminės membranos fermentai, reaguodami į ląstelės išorės signalus, katalizuoja reakcijas ląstelės viduje; kraujo fermentai dalyvauja krešėjimo procese. Beveik visi gyvybiniai procesai priklauso nuo fermentų veikimo.

Atsižvelgiant į sudėtį, fermentai skirstomi į paprastuosius ir sudėtinius. Paprastieji fermentai sudaryti tik iš baltymo, o sudėtiniuose fermentuose yra ir nedidelė organinė molekulė – kofermentas (pvz., NAD^+ , FAD). Labai dažnai sudėtinių fermentų kofermentų pirmtakai yra vandenyje tirpūs vitaminai.

3.1. FERMENTŲ SAVITUMAS IR TERMOLABILUMAS

Svarbiausia fermentų savybė yra jų savitumas substratams. Pavyzdžiui, sacharazė skaido sacharozę į gliukozę ir fruktozę, o seilių amilazė hidrolizuoja glikogeną ir krakmolą iki maltozės.

Kita būdinga fermentų savybė yra jų termolabilumas. Virinant fermentai denatūruojami ir praranda biologinį aktyvumą. Fermentai yra aktyviausi esant temperatūrai, kuri vadinama optimalia fermento veikimo temperatūra. Daugelio fermentų optimali veikimo temperatūra yra apie 40 °C.

Darbo eiga:

1. Imami 6 mėgintuvėliai ir sunumeruojami. Į pirmą, antrą ir trečią mėgintuvėlius įpilama po 3 ml 2% sacharozės tirpalo, o į 4, 5 ir 6 – po 3 ml 1% krakmolo tirpalo.
2. Į pirmą ir ketvirtą mėgintuvėlius įpilama po 0,5 ml sacharazės tirpalo (mielių ekstrakto).
3. Į antrą ir penktą mėgintuvėlius įpilama po 0,5 ml 5 kartus praskiestų seilių.
4. Į trečią mėgintuvėlį įpilama 0,5 ml pavirinto sacharazės tirpalo.
5. Į šeštą mėgintuvėlį įpilama 0,5 ml 5 kartus praskiestų ir pavirintų seilių.
6. Kiekvieno mėgintuvėlio turinys gerai sumaišomas ir visi šeši mėgintuvėliai įdedami į 38 °C temperatūros termostatą ar vandens vonią.
7. Po 10 min. mėgintuvėliai išimami iš termostato ir ataušinami.
8. Norint patikrinti, ar susidarė sacharozės skilimo produktai, pirmame, antrame ir trečiame mėgintuvėliuose atliekama Felingio reakcija: iš jų paimama po 2 ml tirpalo ir perpilama į kitus atskirus mėgintuvėlius. Po to į juos įpilama po 1 ml Felingio I ir Felingio II reagentų (Felingio I – 4% CuSO₄ (vario (II) sulfato) tirpalas; Felingio II – šarminis K, Na tartrato tirpalas). Sumaišoma ir kaitinama, kol susidaro oranžinės spalvos nuosėdos.
9. Norint patikrinti, ar suskilo krakmolas, į 4, 5 ir 6 mėgintuvėlius įlašinama po 1 lašą jodo tirpalo. Jei krakmolas suskilo, mėgintuvėlio turinys nusidažo ruda spalva, jei nesuskilo – mėlyna.
10. Reakcijų rezultatai pažymimi lentelėje nurodant spalvą.

Mėgintuvėlio Nr.	Substratas	Nevirintas fermentas	Virintas fermentas	Felingio reakcija	Reakcija su jodu
1	sacharozė	sacharazė	-		
2	sacharozė	amilazė	-		
3	sacharozė	-	sacharazė		
4	krakmolas	sacharazė	-		
5	krakmolas	amilazė	-		
6	krakmolas	-	amilazė		

3.2. pH ĮTAKA FERMENTŲ AKTYVUMUI

Fermentų aktyvumas priklauso nuo terpės rūgštingumo, t.y. nuo pH. Kiekvienas fermentas aktyviausias, esant optimaliai vandenilio jonų koncentracijai. Pavyzdžiui, seilių α -amilazei optimalus pH yra apie 7, o skrandžio pepsinui jis yra nuo 1,5 iki 2,5.

Darbo eiga:

1. Į 8 mėgintuvėlius pilami lentelėje nurodyti 0,2 M Na_2HPO_4 (natrio hidrofosfato) ir 0,1 M citrinos rūgšties tirpalų kiekiai. Gaunami atitinkamo pH (5,0 – 8,0) buferiniai tirpalai.
2. Į kiekvieną mėgintuvėlį pripilama po 5 ml 0,5% krakmolo tirpalo ir po 2,5 ml 250 kartų praskiestų seilių.
3. Kiekvieno mėgintuvėlio turinys gerai sumaišomas ir visi 8 mėgintuvėliai dedami į 38 °C temperatūros termostatą ar vandens vonią.
4. Po 15 min. iš penkto mėgintuvėlio keli lašai tirpalo įlašinami į atskirą mėgintuvėlį, į kurį prieš tai įlašintas 1 lašas jodo tirpalo. Jei tirpalas nusidažo mėlynai, t.y. krakmolas dar nesuskilo, bandymas kartojamas kas minutę, kol krakmolas suskyla ir tirpalas nusidažo ruda spalva.
5. Į visus mėgintuvėlius, pradedant nuo pirmo, įlašinama po 2 lašus jodo tirpalo. Gerai sumaišoma. Stebima, kuriame mėgintuvėlyje krakmolas visiškai suskilo.
6. Rezultatai surašomi į lentelę.

Mėgintuvėlio Nr.	0,2 M Na_2HPO_4 tirpalo (ml)	0,1 M citrinos rūgšties tirpalo (ml)	pH	Reakcija su jodu (spalva)
1	1,29	1,21	5,0	
2	1,51	0,99	5,8	
3	1,65	0,85	6,2	
4	1,82	0,68	6,6	
5	1,93	0,57	6,8	
6	2,06	0,44	7,0	
7	2,27	0,23	7,4	
8	2,43	0,07	8,0	

3.3. SEILIŲ α -AMILAZĖS AKTYVUMO NUSTATYMAS

Seilių α -amilazės aktyvumas nustatomas remiantis pakitusiu substrato (krakmolo) kiekiu per tam tikrą laiko vienetą, esant optimalioms veiklos sąlygoms. Jis išreiškiamas mililitrais 0,1% krakmolo tirpalo, kurį suskaido 1 ml nepraskiestų seilių, esant 38 °C temperatūrai per 30 min.

Seilių α -amilazės aktyvumui turi įtakos aktyvikliai ir slopikliai: NaCl (natrio chloridas) aktyvina, CuSO₄ (vario sulfatas) slopina šį fermentą.

Darbo eiga:

1. Į 10 sunumeruotų mėgintuvėlių pilama po 1 ml distiliuoto vandens.
2. Į atskirą mėgintuvėlį pilama 1 ml seilių, jos praskiedžiamos 9 ml vandens. Mėgintuvėlio turinys gerai sumaišomas. Gaunama 10 kartų praskiestos seilės.
3. Į pirmą mėgintuvėlį pipete įpilama 1ml 10 kartų praskiestų seilių.
4. Mišinys pirmame mėgintuvėlyje sumaišomas, įtraukiant į pipetę tirpalo ir vėl jį išpilant. Po to 1 ml gauto mišinio pipete perpilamas į antrą mėgintuvėlį, mišinys sumaišomas, 1 ml gauto mišinio perpilamas į trečią mėgintuvėlį ir t.t. Iš dešimto mėgintuvėlio 1 ml tirpalo išpilamas lauk. Gaunami įvairiai praskiestų seilių (α -amilazės) tirpalai: kiekviename po jo esančiame mėgintuvėlyje fermento yra dvigubai mažiau negu prieš jį esančiame (1/20, 1/40, 1/80 ir t.t.).
5. Kai tiriamas seilių α -amilazės aktyvumas, į visus mėgintuvėlius įpilama po 1 ml vandens. Kai tiriama aktyviklių įtaka α -amilazės aktyvumui, vietoj 1 ml vandens į visus mėgintuvėlius pilama po 1 ml 1% NaCl tirpalo, jei tiriama slopiklių įtaka – pilama po 1 ml 1% CuSO₄ tirpalo. Tiriant seilių α -amilazės aktyvumą, aktyviklių ir slopiklių įtaką α -amilazės aktyvumui, vartojamos tos pačios seilės.
6. Į visus 10 mėgintuvėlių (pradedant nuo dešimto, po to į devintą ir t.t.) įpilama po 2 ml 0,1% krakmolo tirpalo ir mėgintuvėlių turinys gerai sumaišomas.
7. Visi mėgintuvėliai šildomi, esant 38 °C temperatūrai, termostate arba vandens vonioje 30 min.
8. Po 30 min. mėgintuvėliai išimami iš termostato, ataušinami šalto vandens srove, kiekvieno mėgintuvėlio turinys sumaišomas.
9. Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinama po 2 lašus jodo tirpalo ir stebima, kokia spalva nusidažys mėgintuvėlių turinys (nuo geltonos iki mėlynos spalvos). Geltona spalva rodo, kad krakmolas visiškai suskilo, rausva – yra tarpinių

krakmolo skilimo produktų (dekstrinų), mėlyna – yra krakmolo ar pradinių jo skilimo produktų.

10. Apskaičiuojamas tiriamųjų seilių α -amilazės aktyvumas. Mėgintuvėlyje, kuriame tirpalas yra mėlynos spalvos, krakmolas nesuskaidytas. Mėgintuvėlyje, kuriame tirpalas yra rudos spalvos, krakmolas pakankamai suskaidytas.

Pavyzdžiui, penktasis mėgintuvėlis yra paskutinis, kuriame tirpalas yra rudos spalvos. Šiame mėgintuvėlyje nepraskiestų seilių buvo 1/320 ml, todėl galima parašyti:

1/320 ml seilių suskaidė 2 ml 0,1% krakmolo tirpalo

1ml seilių suskaidė x ml 0,1% krakmolo tirpalo

$$x = \frac{2 \cdot 1}{1/320} = 640 \text{ (ml)}$$

Matome, kad 1 ml nepraskiestų seilių per 30 min, esant 38 °C temperatūrai suskaidė 640 ml 0,1% krakmolo tirpalo.

Analogiškai apskaičiuojamas ir seilių α -amilazės aktyvumas, pridėjus aktyviklių ar slopiklių. Duomenys, gauti nustačius seilių α -amilazės aktyvumą, lyginami su rezultatais, gautais, pridėjus aktyviklio ar slopiklio. Daromos išvados.

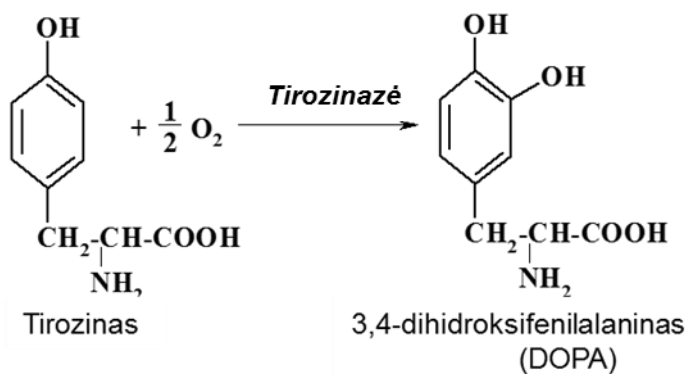
3.4. KOKYBINĖS FERMENTŲ REAKCIJOS

Fermentams nustatyti savitų reagentų nėra. Fermento buvimas tirpale nustatomas pagal pridėto atitinkamo substrato pokytį. Substrato pokytis arba jo skilimo produktai nustatomi savitosiomis spalvinėmis reakcijomis.

3.4.1. Tirozinazė

Tirozinazės – tai fermentai oksidazės, kurie oksiduoja substratus molekuliniu (oro) deguonimi. Tirozinazė katalizuoja dvi reakcijas:

1. Hidroksilina fenolius orto padėtyje:



2. Oksiduoja difenolius.

Tirozinas, veikiamas šio fermento, virsta tamsios spalvos medžiaga, kuri yra panaši į natūralius plaukų, odos ir panašius pigmentus – melaninus.

Tirozinazės yra grybuose, bulvėse, cukriniuose runkeliuose, grūduose ir kt.

Darbo eiga:

1. Žalios, nuluptos bulvės paviršinis sluoksnis plonai supjaustomas ir suberiamas į grūstuvę.
2. Bulvės sutrinamos dalimis, užpilant 10 ml vandens, ir filtruojamos.
3. Į du mėgintuvėlius įpilama po 1 ml filtrato. Vieno mėgintuvėlio turinys virinamas 1 - 2 min. ir atšaldomas.
4. Į abu mėgintuvėlius įlašinama po 5 -10 lašų 0,1% tirozino tirpalo, jie statomi į 35 - 40 °C temperatūros vandens vonią.
5. Kas 5 min. mėgintuvėliai supurtomi. Jei yra tirozinazės, tirpalas iš pradžių įgauna rausvą, vėliau rudą ir net juodą spalvą.

3.4.2. Ureazė

Ureazė yra hidrolazių klasės fermentas. Ji hidrolizuoja $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (karbamidą, urea, šlapalą):



Ureazės yra kai kuriose bakterijose, sojos pupelėse. Jos veikimo pH ribos yra labai plačios, geriausiai veikia neutralioje aplinkoje.

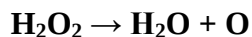
Darbo eiga:

1. Į 2 ml 2% karbamido tirpalo (arba šlapimo) įberiama 0,5 g sojos miltelių ir suplakama. Jaučiamas išsiskiriančio amoniako kvapas.

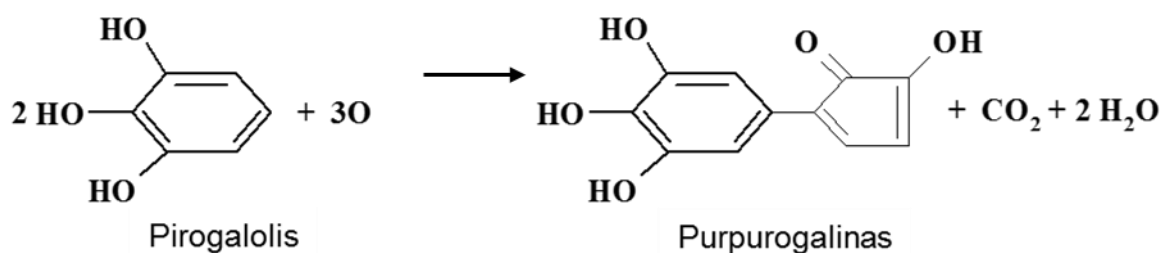
2. Po kelių minučių įlašinami 2 lašai 0,1% fenolftaleino tirpalo. Mišinys parausta.

3.4.3. Peroksidazė

Peroksidazės yra fermentai, katalizuojantys medžiagų oksidaciją atominiu deguonimi. Atominis deguonis gaunamas skaidant H_2O_2 (vandenilio peroksida) ar kitus peroksidus:



Peroksidazės oksiduoja junginius, turinčius fenolinę struktūrą. Susidaro spalvoti junginiai.



Darbo eiga:

1. Į 4 mėgintuvėlius įpilama po 1 ml 1% pirogalolio tirpalo.
2. Į pirmą mėgintuvėlį įlašinami 2 lašai 2% H_2O_2 ir 1 ml H_2O .
3. Į antrą mėgintuvėlį įpilama 1 ml tirpalo, turinčio aktyvios peroksidazės – krienų ekstrakto.
4. Į trečią mėgintuvėlį įpilama 1 ml krienų ekstrakto ir 2 lašai H_2O_2 .
5. Į ketvirtą mėgintuvėlį įpilama 1 ml pavirinto krienų ekstrakto ir 2 lašai H_2O_2 .
6. Stebimas spalvų pokytis. Rezultatai surašomi į lentelę.

Mėgintuvėlio Nr.	Substratas (pirogallolio tirpalas, ml)	Vandenilio akceptorius	Fermentas	Spalva
1	1	H_2O_2	–	
2	1	–	+	
3	1	H_2O_2	+	
4	1	H_2O_2	+	

*pavirintas krienų ekstraktas

KLAUSIMAI SAVIRUOŠAI

Fermentai, jų savybės

1. Kuo skiriasi fermentai nuo kitų katalizatorių? Išvardinkite fermentinės katalizės ypatybes.
2. Kokie yra fermentų klasifikacijos principai? Išvardinkite fermentų klases.
3. Fermentų aktyvumo matavimo vienetai.
4. Koveiksniai ir kofermentai: jų struktūra ir vaidmuo fermentinėse reakcijose.
5. Apibūdinkite fermentų aktyvųjį centrą: kas sudaro aktyvųjį centrą, kokia jo paskirtis?
6. Kokie veiksniai turi įtakos fermentinės reakcijos greičiui?
7. Pavaizduokite grafiškai, kaip priklauso fermentų aktyvumas nuo temperatūros, pH, substrato koncentracijos ir fermento kiekio. Paaiškinkite.
8. Į kokias grupes skirstomi fermentų slopikliai pagal veikimo mechanizmą?
9. Paaiškinkite fermentų aktyvumo reguliavimą (alosteriniu ir kovalentiniu būdais) principus.
10. Izofermentai, jų charakteristika. Kokia izofermentų reikšmė ligų diagnostikoje?
11. Pateikite fermentų, naudojamų ligų diagnostikai ir gydymui, pavyzdžių.

4. ANGLIAVANDENIAI IR JŲ APYKAITA

Angliavandeniai (sacharidai) yra polihidroksialdehidai arba polihidroksiketonai bei jų dariniai. Bendra monosacharidų formulė $(CH_2O)_n$. Tai labai gausi organinių junginių klasė. Angliavandeniai sintetinami augaluose fotosintezės metu panaudojant saulės energiją iš CO_2 (anglies dioksido) ir vandens, o gyvūnai juos turi gauti su maistu. Angliavandeniams būdinga biologinių funkcijų įvairovė: jie yra energijos šaltinis; įeina į kitų junginių sudėtį (nukleorūgščių, kofermentų); yra pagrindinis augalų ir bakterijų sienelių komponentas; jie svarbūs tarpląsteliniams ryšiams, ląstelės atpažinimo, signalo perdavimo procesuose. Organizme yra nedidelės angliavandenių atsargos (krakmolas – augaluose, glikogenas – gyvūnuose).

Monosacharidai reaguoja tarpusavyje, sudarydami glikozidinius ryšius. Dvi monosacharidų molekulės sudaro disacharidus; nuo 2 iki 10-ies monosacharidų – oligosacharidus. Polisacharidais vadinami polimerai, kuriuos sudaro daugiau nei dešimt monomerų. Tiek oligosacharidai, tiek polisacharidai gali būti homologiški (monomerai vienodi) arba mišrūs (sudaryti iš skirtingų monosacharidų). Polisacharidų molekulės gali būti linijinės arba šakotos struktūros, nes bet kuri iš daugelio monosacharidų molekulėje esančių hidroksigrupių gali sudaryti ryšį su kito monosacharido keto- arba aldehydine grupe. Svarbiausias žmogaus monosacharidas – gliukozė. Gyvūninėse ląstelėse kaupiamas glikogenas – šakotas polimeras, kuriame gliukozės monomerai tarpusavyje susijungę α -1,4 ir α -1,6 glikozidiniais ryšiais. Augalinėse ląstelėse kaupiamą polisacharidą krakmolą sudaro amilozė – linijinis polimeras, sudarytas iš gliukozės monomerų, tarpusavyje susijungusių α -1,4 glikozidiniais ryšiais ir amilopektinas, kuriame, kaip ir gyvūnų glikogene, gliukozės monomerai tarpusavyje susijungę α -1,4 ir α -1,6 glikozidiniais ryšiais. Augalų ląstelių sienelėse esančiame linijiniame polisacharide celiuliozėje gliukozės molekulės susijungusios β -1,4 glikozidiniais ryšiais. Šio ryšio gyvūnų fermentai neskaido.

4.1. GLIKOGENO IŠSKYRIMAS IŠ RAUMENŲ IR KEPENŲ IR REAKCIJOS GLIKOGENUI ATPAŽINTI

Glikogeno koncentracija raumenyse yra 0,5 – 1%, o kepenyse – apie 8% drėgno audinio masės. Šis polisacharidas lengvai nusodinamas iš tirpalų etanolio. Sąveikaudamas su jodu jis nusidažo raudona spalva.

Darbo eiga:

1. Imama apie 1 g šviežių raumenų ar kepenų, susmulkinama atšaldytoje grūstuvėje, užpilama 4 ml verdančio vandens.
2. Turinys perpilamas į platų stiklinį mėgintuvėlį ir virinamas 2-3 min. Nusėda baltymų nuosėdos.
3. Iš plataus mėgintuvėlio turinys perpilamas į grūstuvę ir trinamas, kol pasidaro vienalytė masė – košelė.
4. Košelė skiedžiama 5 ml vandens, perpilama į platų stiklinį mėgintuvėlį, parūgštinama 5 lašais 1% CH_3COOH tirpalo ir 20 min. virinama, visą laiką lašinant vandenį, kad neišdžiūtų. Glikogenas pereina į tirpalą.
5. Nuosėdos filtruojamos, o filtratas (glikogeno tirpalas) dalinamas į tris dalis ir atliekamos reakcijos glikogenui atpažinti:

a) Glikogeno nusodinimas etanolio.

Į 5 lašus filtrato įpilami 5 lašai 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (etanolio). Glikogeno dalelės netenka vandens apvalkalėlio ir nusėda kaip amorfinės nuosėdos.

b) Reakcija su jodu.

Imami 2 mėgintuvėliai. Į vieną mėgintuvėlį lašinami 5 lašai filtrato, o į kitą – 5 lašai vandens. Į abu mėgintuvėlius įlašinama po 1-2 lašus 1% jodo tirpalo. Pirmame mėgintuvėlyje tirpalas nusidažo raudona spalva, nes jodas adsorbuojamas ant glikogeno dalelių. Antrame mėgintuvėlyje tirpalas nusidažo geltona spalva.

c) Glikogeno hidrolizė seilių α -amilaze.

Į mėgintuvėlį įlašinami 5 lašai filtrato ir 1 lašas 10 kartų praskiestų seilių. Sumaišoma ir po 5 min. įlašinamas 1 lašas 1% jodo tirpalo. Mėgintuvėlyje esantis turinys nusidažo geltona spalva, nes seilių α -amilazė suskaidė glikogeną.

4.2. GLIUKOZĖS KONCENTRACIJOS NUSTATYMAS KRAUJO SERUME FERMENTINIU BŪDU

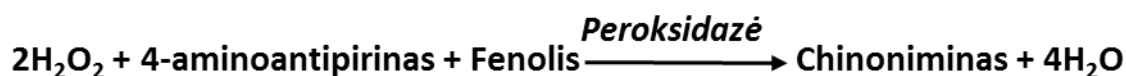
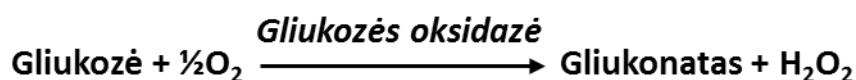
Pagrindinis kraujo angliavandenis – gliukozė. Ji tolygiai pasiskirsto tarp kraujo plazmos ir eritrocitų. Gliukozės koncentracija kraujyje, nustatant savituojų gliukozoksidaziniu metodu, yra 3,33-5,55 mmol/l (60-100 mg/100 ml; perskaičiavimo koeficientas – 0,05555), serume arba plazmoje – 3,61-6,4 mmol/l (65-116 mg/100 ml), likvoro – 2,78-3,89 mmol/l (50-70 mg/100 ml). Gliukozės koncentracijos padidėjimas kraujyje vadinamas hiperglikemija, sumažėjimas – hipoglikemija.

Gliukozės koncentracija kraujyje labai priklauso nuo antinksčių simpatinių nervų sujaudinimo bei insulino, gliukagono, adrenalino, gliukokortikoidų, tiroksino ir somatotropinio hormono (STH) sekrecijos. Insulinas – vienintelis hormonas, kuris mažina gliukozės kiekį kraujyje. Kiti hormonai didina gliukozės kiekį kraujyje. Gliukagono ir adrenalino poveikyje susidaro cAMP. Jis suaktyvina baltymų kinazę A. Pastaroji per fosforilazės kinazę suaktyvina glikogeno fosforilazę (glikogenolizės fermentą) bei slopina glikogeno sintazę (glikogenezės fermentą). Gliukokortikoidai aktyvina gliukoneogenezę reguliuojančių fermentų sintezę; be to, jų poveikyje irsta organizmo baltymai – susidaro aminorūgštys, iš kurių sintetinama gliukozė. Tiroksinas didina gliukozės rezorbciją iš žarnyno. STH veikia netiesiogiai, skatindamas gliukagono sekreciją.

Sumažėjus insulino sekrecijai (ar jai visai nevykstant) gliukozės koncentracija kraujyje padidėja. Kai ji viršija 9-10 mmol/l, inkstų kanalėliuose gliukozė nereabsorbuojama ir ima skirtis su šlapimu (gliukozurija). Esant nedidelei hiperglikemijai, gliukozurijos nebūna.

Nustatymo principas:

Gliukozę oksiduoja oro deguonis, dalyvaujant gliukozės oksidazei. Reakcijos metu susidaro vandenilio peroksidas, kuriam sąveikaujant su fenoliu, 4-aminoantipirinu bei esant peroksidazės, susidaro spalvotas junginys – raudonas chinoniminas, kurio spalvos intensyvumas yra tiesiog proporcingas gliukozės koncentracijai ir yra įvertinamas spektrofotometrinio metodu:



Tirpalai:

Reagentas: 100 mM fosfatinis buferis (pH 7,5), 5 mM fenolis, gliukozės oksidazė (> 10 Vnt./ml), peroksidazė (> 1 Vnt./ml), 0,4 mM 4-aminoantipirinas.

Standartas: Gliukozės tirpalas: 100 mg/100 ml (5,55 mmol/l).

Darbo eiga:

1. Į pirmąjį mėgintuvėlį („kontrolė“) įpilame 1 ml reagento. Jis bus naudojamas spektrofotometro nulinės reikšmės nustatymui.
2. Į antrąjį mėgintuvėlį („standartas“) įpilame 1 ml reagento ir 10 µl standarto (žinomos koncentracijos gliukozės tirpalo).
3. Į trečiąjį mėgintuvėlį („mėginys“) įpilame 1 ml reagento ir 10 µl tiriamo kraujo serumo.

	Kontrolė	Standartas	Mėginys
Reagentas	1 ml	1 ml	1 ml
Standartas	-	10 µl	-
Kraujo serumas	-	-	10 µl

4. Atsargiai sumaišome ir laikome kambario temperatūroje 10 min.
5. „Standarto“ ir „mėginio“ turinį perpylus į atskiras 1 cm kiuvetes, spektrofotometru nustatome šviesos sugerties (A) dydžius, kai bangos ilgis yra 500 nm.

Apskaičiavimas:

$$C_{\text{mėginio}} = \frac{A_{\text{mėginio}}}{A_{\text{standarto}}} \times C_{\text{standarto}} \text{ (mg/100 ml, mmol/l)}$$

A – šviesos sugertis, kai bangos ilgis yra 500 nm;

C_{standarto} – standarto koncentracija (100 mg/100 ml, 5,55 mmol/l);

C_{mėginio} – mėginio koncentracija.

Rekomenduojamos reikšmės

Neišnešiotas naujagimis	25-80 mg/100 ml = 1,39-4,44 mmol/l
Naujagimis	30-90 mg/100 ml = 1,67-5,00 mmol/l
Vaikas, suaugęs	70-105 mg/100 ml = 3,89-5,83 mmol/l

4.3. GLIUKOZĖS KONCENTRACIJOS NUSTATYMAS KRAUJO SERUME AUTOMATINIŲ ANALIZATORIUMI „CARDIO CHEK“

Cardio Chek yra rankinis matuoklis, kuriuo galima greitai ir tiksliai nustatyti įvairius kraujo biocheminius žymenis pilname kraujyje – tam tereikia tik mažo kraujo lašelio ir atitinkamos tyrimo juostelės.

Matuoklio tyrimų sistemą sudaro analizatorius, mikroschema ir analitinių tyrimų juostelės. Nustatymas vyksta fotometrinio atspindžio metodu. Matuoklis nuskaityto testų juostelės spalvos pasikeitimą po to, kai ant jos yra užlašinamas kraujo lašas.

Veikimo principas:

Tai fermentinis nustatymo metodas. Gliukozės koncentracija nustatoma pagal susidariusį H_2O_2 :



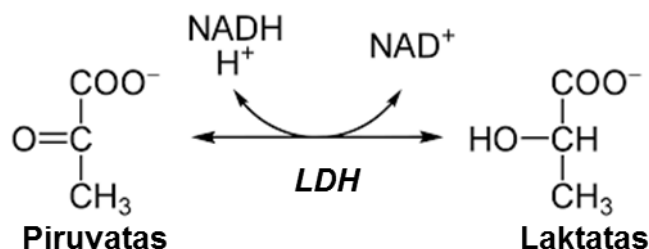
Fermentas – gliukozės oksidazė

H_2O_2 oksiduoja o-toluidiną, susidaro žalios spalvos junginys. Juostelės spalvos intensyvumas proporcingas gliukozės koncentracijai.

Normali gliukozės koncentracija kraujyje yra 3,33-5,55 mmol/l.

4.4. LAKTATO DEHIDROGENAZĖS AKTYVUMO NUSTATYMAS KRAUJO SERUME FERMENTINIŲ BŪDU

Laktato dehidrogenazė (LDH) yra tirpus oksidoreduktazių klasės fermentas, randamas širdies, griaučių raumenų, kepenų, inkstų, smegenų ir kitų organų ląstelių citoplazmoje bei eritrocituose. LDH katalizuoja grįžtamą piruvato vartimo laktatu reakciją:



LDH išėjimas iš ląstelės į kraujo plazmą parodo plazminės membranos trūkumą ir yra susijęs su audinio pažeidimu.

Metodo principas:

LDH katalizuoja laktato oksidavimą NAD^+ , susidarant piruvatui ir NADH.



LDH aktyvumas įvertinamas spektrofotometrinio metodu pagal NADH kiekio pokytį, kai bangos ilgis yra 340 nm. Vykstant reakcijai, NADH kiekis didėja, todėl didėja ir šviesos sugerties reikšmės.

Darbo eiga:

1. Į du mėgintuvėlius (tiriamąjį ir kontrolinį) įpilama po 1 ml LDH aktyvumui nustatyti skirto reagento, kurio sudėtis: 0,406 mM N-metil-D-glukaminas, 62,5 mM laktatas, 50 mM NAD^+ . Tirpalo pH 9,4.
2. Kontrolinio mėgintuvėlio turinys perkeliamas į spektrofotometrinę kiuvetę. Matuojama šviesos sugertis, kai bangos ilgis yra 340 nm.
3. Į tiriamąjį mėgintuvėlį įpilame 0,025 ml kraujo serumo, sumaišome.
4. Tiriamojo mėgintuvėlio turinys perkeliamas į spektrofotometrinę kiuvetę. Palaikius 30 s kambario temperatūroje matuojama šviesos sugertis, kai bangos ilgis yra 340 nm. Matavimas pakartojamas po 1 min.
5. Apskaičiuojamas šviesos sugerties pokytis per 1 min. – ΔA .
6. LDH aktyvumas išreiškiamas tarptautiniais aktyvumo vienetais Vnt./l.
7. LDH aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$LDH \text{ (Vnt./l)} = \Delta A \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times L \times V_s}$$

kur – V_t – tiriamojo mėgintuvėlio turinio tūris (1,025 ml);

ϵ – NADH sugerties koeficientas; jis lygus 6300, kai bangos ilgis yra 340 nm;

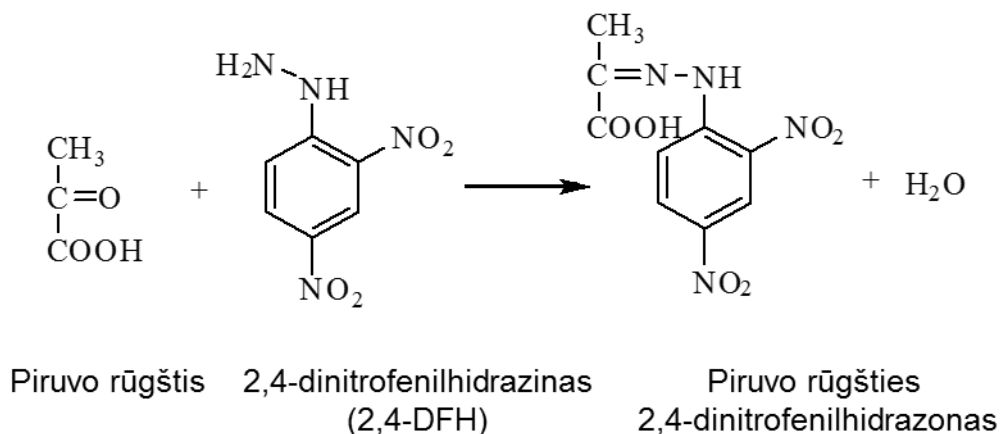
L – kiuvetės skersmuo (1 cm);

V_s - tiriamo kraujo serumo tūris (0,025 ml).

Normoje LDH koncentracija kraujyje yra 230-460 Vnt./l.

4.5. KIEKYBINIS PIRUVO RŪGŠTIES NUSTATYMAS ŠLAPIME

Piruvo rūgštis, reaguodama su 2,4-dinitrofenilhidrazinu (2,4-DFH) šarminėje aplinkoje sudaro geltonai oranžinės spalvos, kurios ryškumas proporcingas piruvo rūgšties koncentracijai, junginius.



A-ketoglutarato, oksaloacto, dehidroaskorbo rūgšties hidrazonai šarminėje aplinkoje neatsparūs ir greitai išnyksta.

Reagentai: 0,1% 2,4-DFH tirpalas, 2,5% spiritinis KOH tirpalas.

Priemonės: spektrofotometras, mėgintuvėliai, 1 ml pipetės.

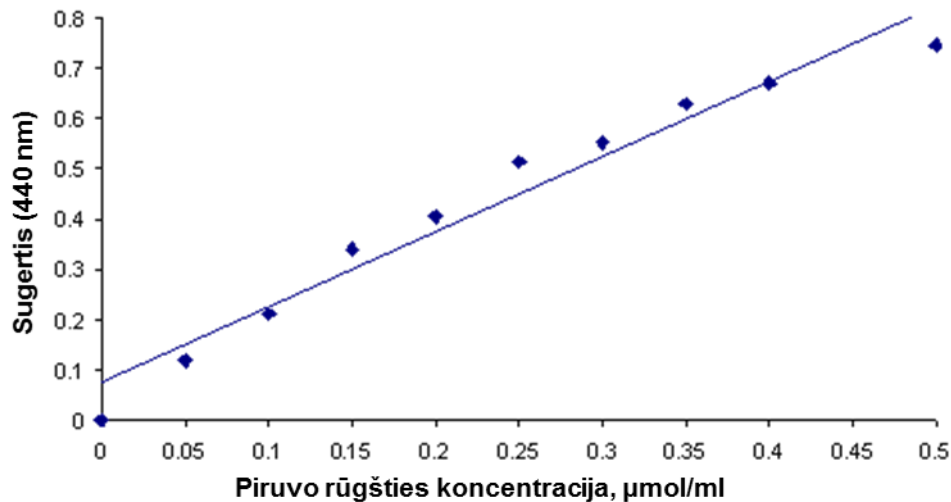
Darbo eiga:

Darbui imame 2 mėgintuvėlius. Į pirmąjį kontrolinį įpilame 1 ml distiliuoto vandens, į antrąjį tiriamąjį – 1 ml šlapimo. Po to į abu mėgintuvėlius pilame po 1 ml 2,5% spiritinio KOH (kalio hidroksido) tirpalo, sumaišome, 1 min. bėgyje įpilame po 0,5 ml 0,1% 2,4-DFH tirpalo. Reakcijos komponentus sumaišome ir paliekame 15 min. kambario temperatūroje.

Reakcijos pavyzdžių šviesos sugertį matuojame spektrofotometru, kai bangos ilgis yra 440 nm. Piruvo rūgšties koncentraciją apskaičiuojame iš kalibracinės kreivės. Gautą dydį perskaičiuojame paros šlapimui. Vidutinis vyrų paros šlapimo kiekis – 1500 ml, moterų – 1200 ml. Perskaičiavimo koeficientas į tarptautinę vienetų sistemą lygus 0,009 (μmol/l).

Normoje piruvo rūgšties kiekis šlapime yra 114-284 $\mu\text{mol}/24 \text{ val.}$

Kalibracinė kreivė



KLAUSIMAI SAVIRUOŠAI

Angliavandeniai, jų biologinis vaidmuo ir apykaita:

1. Pagrindiniai angliavandeniai, gaunami su maistu. Angliavandenių biologinė ir energetinė vertė.
2. Ką vadiname glikolize? Kokia glikolizės fiziologinė reikšmė? Parašykite anaerobinės glikolizės suminę lygtį.
3. Parašykite gliukozės skilimo iki piruvato reakcijas, kurių metu: a) ATP sunaudojamas, b) ATP sintetinamas.
4. Kiek molekulių ATP sintetinama iš gliukozės susidarant: a) piruvatui, b) laktatui?
5. Kokį procesą vadiname gliukoneogeneze? Išvardinkite gliukozės susidarymo iš piruvato negrįžtamas reakcijas.
6. Kaip ATP, ADP ir AMP koncentracijos kitimai veikia glikolizės ir gliukoneogenezės greitį?
7. Gliukozės homeostazės reguliavimas.
8. Gliukozės apykaitos kelias, būtinas ląstelės sintezės procesams.
9. Pavaizduokite gliukozės aerobinį skilimą bendra schema. Kiek molekulių ATP susidaro visiškai oksiduojant gliukozę iki CO_2 ir H_2O ?
10. Išvardinkite Krebso ciklo reakcijas, kuriose išsiskiria CO_2 .

11. Išvardinkite kofermentus, kurie įeina į α -ketoglutaratdehidrogenazinio komplekso sudėtį.
12. Kiek molekulių ATP sintezuojama, oksiduojant vieną molekulę: a) acetil-CoA, b) izocitrato, c) α -ketogliutarato, d) malato, e) sukcinato?
13. Vitaminai, dalyvaujantys angliavandenių apykaitoje.

5. LIPIDAI IR JŲ APYKAITA

Lipidai (gr. *lipos* – riebalai) – tai sunkiai arba visiškai netirpstančios vandenyje organinės medžiagos. Pagrindinę jų molekulių dalį sudaro prisotintos angliavandenilinės grandinės. Lipidų yra visose ląstelėse. Jie būtini gyvybinių organizmo funkcijų palaikymui. Šios molekulės, o ypač triacilgliceroliai, yra koncentruotos cheminės energijos šaltinis; fosfolipidai, steroliai (pvz., cholesterolis eukariotinėse ląstelėse) – svarbūs biologinių membranų struktūriniai komponentai; eikozanoidai valdo fiziologines funkcijas; iš lipidų sintetinami kai kurie vitaminai ir hormonai.

Riebalai (triacilgliceroliai arba trigliceridai) – yra trihidroksilio alkoholio glicerolio ir sočiųjų (turinčių tik viengubuosius ryšius) bei nesočiųjų (turinčių vieną ar daugiau dvigubųjų ryšių) riebalų rūgščių triesteriai.

Skysti riebalai (dažniausiai augalinės kilmės) vadinami aliejais. Riebalų konsistencija priklauso nuo riebalų rūgščių sotumo. Kuo daugiau riebaluose sočiųjų riebalų rūgščių, tuo jie kietesni ir lydosi aukštesnėje temperatūroje. Riebalai yra pagrindinė energijos atsargų forma gyvūnų ląstelėse. Jie sudaro apie 21% žmogaus kūno masės.

To paties organizmo skirtinguose organuose gali būti skirtingos riebalų rūgštys. Pavyzdžiui, žmogaus poodiniame riebaliniame sluoksnyje gausu sočiųjų riebalų rūgščių, o kepenų riebaluose – daugiau nesočiųjų. Kai kurios riebalų rūgštys (linolo, linoleno) žmogaus organizme nesintetinos, todėl jas būtina gauti su maistu – tai nepakeičiamosios riebalų rūgštys.

Kai kurių riebalų rūgščių lentelė

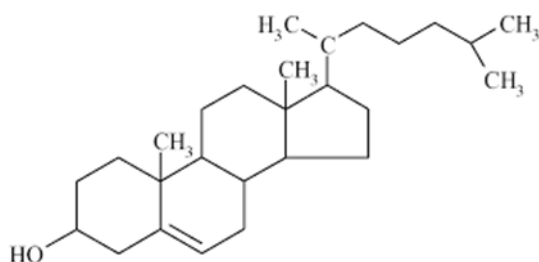
Anglies atomų skaičius	Pavadinimas	Struktūra
Sočiosios riebalų rūgštys		
C ₁₄	Miristo	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH
C ₁₆	Palmitino	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
C ₁₈	Stearino	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
C ₂₀	Eikozano	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH
Nesočiosios riebalų rūgštys		

C _{18:1}	Oleino	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
C _{18:2}	Linolo	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
C _{18:3}	Linoleno	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
C _{20:4}	Arachidono	CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH=CH) ₄ (CH ₂) ₃ COOH

Žmogus vidutiniškai per parą suvartoja apie 60-150 g riebalų. Normaliai maitinantis maisto riebalai organizmui suteikia apie 40 proc. energijos. Ilgą laiką negavus lipidų su maistu ir sutrikus jų apykaitai, pažeidžiama oda, gleivinė, vidaus organai, centrinė nervų sistema, susilpnėja imunitetas, sutrinka organizmo homeostazės mechanizmai.

5.1. CHOLESTEROLIO KONCENTRACIJOS NUSTATYMAS KRAUJO SERUME FERMENTINIU BŪDU

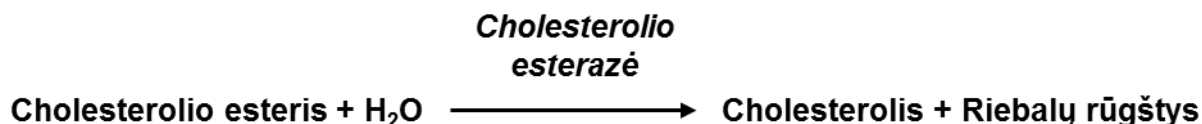
Cholesterolis – 27 C atomus turintis junginys.



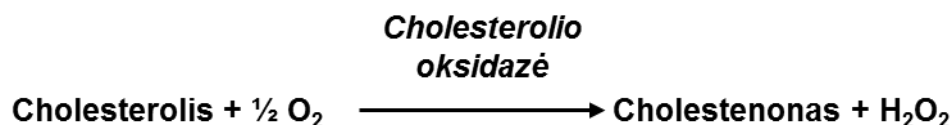
Cholesterolis

Cholesterolis – gyvūnų audinių steroidinis alkoholis, randamas visų ląstelių plazminėje membranoje. Iš jo sintetamos tulžies rūgštys, steroidiniai hormonai, vitaminas D₃. Į žmogaus organizmo ląsteles patenka egzogeninis cholesterolis, t.y. su maistu gaunamas cholesterolis (0,5-1g) ir endogeninis cholesterolis t.y. cholesterolis, kurį sintetina žmogaus organizmo ląstelės. Didžiausias cholesterolio kiekis sintetinas kepenyse (~1 g/per dieną), nedideliais kiekiais sintetinas antinksčių žievėje, kiaušidėse, sėklidėse. Organizme cholesterolis gali būti laisvas arba sudaryti esterius su riebalų rūgštimis. Kraujo plazmoje cholesterolis bei jo esteriai pernešami lipoproteinų sudėtyje. Padidėjęs bendras cholesterolio kiekis siejamas su didėjančia aterosklerozės ir širdies kraujagyslių ligų rizika.

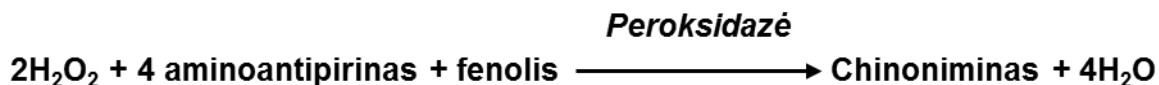
Bendro cholesterolio (laisvo ir esterifikuoto) koncentracija kraujo serume nustatoma fermentiniu metodu. Cholesterolio esterius hidrolizuoja fermentas cholesterolio esterazė.



Reakcijos metu susidariusį laisvą cholesterolį oksiduoja cholesterolio oksidazė:



Reakcijos metu susidaręs H_2O_2 oksiduoja 4-aminoantipiriną, susidaro spalvotas junginys chinonimas, kurio spalvos intensyvumas yra tiesiog proporcingas cholesterolio koncentracijai. Šviesos sugertį matuojame spektrofotometru, kai bangos ilgis yra 500 nm.



Darbo eiga:.

1. Į du mėgintuvėlius (tiriamąjį ir standartinį) įpilama po 1 ml cholesteroliui nustatyti skirtą reagentą, kurio sudėtis: 35 mM PIPES (piperazin-N-N'-bis [2-etansulfoninė rūgštis]), 28 mM fenolis, 0,2 Vnt./ml cholesterolio esterazė, 0,1 Vnt./ml cholesterolio oksidazė, 0,8 Vnt./ml peroksidazė, 0,5 mM 4-aminoantipirinas, pH 7,0.
2. Į standartinį mėgintuvėlį įpilame 0,01 ml cholesterolio standartinio tirpalo (200 mg/100 ml; 5,18 mmol/l), sumaišome.
3. Į tiriamąjį mėgintuvėlį įpilame 0,01 ml tiriamojo kraujo serumo, sumaišome.
4. Mėgintuvėliai inkubuojami kambario temperatūroje 20 min.
5. Šviesos sugertį (A) matuojame spektrofotometru, kai bangos ilgis yra 500 nm.
6. Cholesterolio koncentraciją apskaičiuojame pagal formulę:

$$C_{tiriamoji} = \frac{A_{tiriamoji}}{A_{standartinio}} \times C_{standartinio}$$

Lipidų tyrimo reikšmės aterosklerozės diagnostikai pateikiamos lentelėje (mmol/l).

Tiriamasis lipidas	Pageidaujama koncentracija	Rizikos ribos	Vidutinė rizika	Didelė rizika
Bendrasis cholesterolis	<5,2	5,2-6,5	>6,5	>7,8
MTL	<3,4	3,4- 4,1	>4,1	>4,9
DTL	>0,9	<0,9		
TAG	<2,3	2,3-4,1	>4,1	>11,3

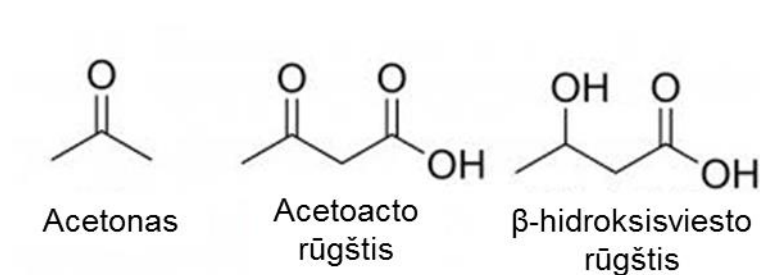
MTL – mažo tankio lipoproteinai;

DTL – didelio tankio lipoproteinai;

TAG – triacilgliceroliai.

5.2. REAKCIJOS ACETONINĖMS MEDŽIAGOMS ŠLAPIME NUSTATYTI

Acetoninės medžiagos – acetonas, acetoacto rūgštis ir β-hidroksisviesto rūgštis, nustatomi nitroprusidiniai mėginiais.



Acetoninės medžiagos, reaguodamos su natrio nitroprusidu $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$, sudaro raudonai rudos spalvos kompleksinius junginius. Analogiška reakcija vyksta ir su tam tikrais aminais (pvz., kreatininu), bet pridėjus etano rūgšties, susidariusi vyšninė spalva išnyksta, o esant acetoninėms medžiagoms, spalva neišnyksta, o dar labiau stiprėja.

Langēs reakcija.

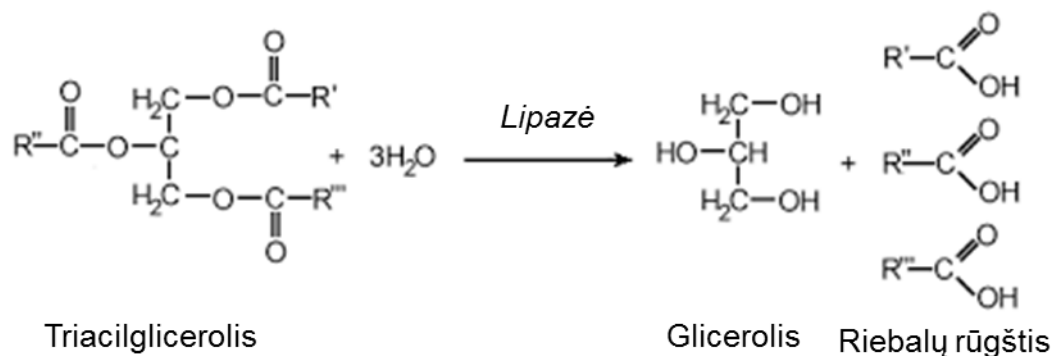
1. Į mėgintuvėlį įlašinama 10 lašų šlapimo, 2 lašai koncentruotos CH_3COOH tirpalo, 2 lašai naujai paruošto 5% natrio nitroprusido tirpalo ir sumaišoma.
2. Palenkus mėgintuvėlį 45° kampu, atsargiai sienele įpilamas toks pats tūris koncentruoto amonio hidroksido tirpalo. Skysčių sąlyčio vietoje susidaro violetinis žiedas, kurio intensyvumas ir susidarymo laikas priklauso nuo acetoninių medžiagų kiekio.

1. Į mėgintuvėlį įlašinama 10 lašų šlapimo, 2 lašai natrio nitroprusido tirpalo ir 2-4 lašai 10% NaOH tirpalo. Mišinys nusidažo raudona spalva.
2. Po to įlašinami 4 lašai koncentruotos CH_3COOH . Jeigu yra acetono ar acetoacto rūgšties, tirpalas įgauna tamsiai raudoną spalvą, o jei šių medžiagų nėra – spalva išnyksta.

Acetonas šarminėje aplinkoje reaguoja su jodu, sudarydamas jodoformo nuosėdas.

I mēģintuvēlī iļāšinama 10 lašų šlapimo, 2 lašai 10% NaOH tirpalo ir keli lašai Liugolio tirpalo (85 ml vandens ištirpinama 10 g KI (kalio jodido) ir 5 g jodo). Jei yra acetono, tirpalas drumstėja ir įgyja būdingą jodoformo kvapą. Jei acetono daug, nusėda gelsvos kristalinės nuosėdos.

Tulžis emulsina riebalus ir aktyvina kasos sulčių lipazę. Veikiant lipazei, triacilgliceroliai skyla:



Darbo eiga:

1. Į dvi konusines kolbutes pipete įpilama po 10 ml pieno ir 10 ml vandens.
2. Į abi kolbutes įberiama po 0,05 g pankreatino (jame yra lipazės). Kolbų turinys sumaišomas, kad ištirtų pankreatinas.
3. Į vieną kolbutę įlašinami 6 lašai tulžies, į kitą – 6 lašai vandens.
4. Į abi kolbutes įlašinama po 1-2 lašus indikatoriaus fenolftaleino ir titruojama 0,1 N NaOH tirpalu.
5. Abi kolbutės laikomos oro termostate 37 °C temperatūroje. Tirpalai titruojami kas 15 min.
6. Titravimo duomenys surašomi į lentelę, braižomas grafikas. Abscisių ašyje pažymimas laikas, o ordinačių – nutitruoto 0,1 N NaOH tirpalo kiekis mililitrais.

Inkubacijos laikas (min.)	Kolbutė su tulžimi. NaOH tirpalo tūris (ml).	Kolbutė su vandeniu. NaOH tirpalo tūris (ml).
0		
15		
30		
45		
60		

KLAUSIMAI SAVIRUOŠAI**Lipidai ir jų apykaita**

1. Išvardinkite pagrindines lipidų grupes.
2. Kokios riebalų rūgštys yra žmogaus lipidų sudėtyje? Išvardinkite jas.
3. Kokie lipidų ypatumai nulemia jų dalyvavimą membranų susidaryme?
4. Išvardinkite pagrindines kraujo lipoproteinų grupes ir apibūdinkite jų sudėtį.
5. Kokie yra pagrindiniai riebalų rūgščių β-oksidacijos etapai?
6. Kiek molekulių ATP susidarys pilnai oksiduojantis iki CO₂ ir H₂O: a) stearino rūgščiai, b) palmitino rūgščiai?
7. Parašykite malonil-CoA sintezės reakciją, nurodykite fermentą ir kofermentą.
8. Cholesterolio apykaitos schema.

9. Kokių junginių pavidale cholesterolis pašalinamas iš organizmo?
10. Pateikite ligų pavyzdžių, kurių priežastis galima paaiškinti cholesterolio apykaitos sutrikimais.
11. Kodėl pacientams turintiems per didelę kūno masę rekomenduojama dieta, turinti mažiau angliavandenių?
12. Kokias medžiagas vadiname acetoninėmis? Išvardinkite jas.
13. Kokie hormonai ir kaip valdo lipidų apykaitą? Pateikite pavyzdžių.
14. Pateikite schemą, iliustruojančią lipidų ir angliavandenių apykaitos ryšį.

6. BALTYMŲ (AMINORŪGŠČIŲ) APYKAITA

Baltymai sudaryti iš 20 genetiškai koduojamų aminorūgščių, kurių 8 yra nepakeičiamosios ir 2 nepakeičiamosios tam tikromis sąlygomis (lentelė). Baltymai sudaro apie 19% žmogaus kūno masės. Per parą žmogus turėtų suvartoti apie 100 g baltymų. Žmogaus organizme baltymai virškinami skrandyje ir žarnyne iki aminorūgščių. Pagrindiniai aminorūgščių apykaitos keliai organizme yra peramininimas, deamininimas ir dekarboksilinimas.

Organizme aminorūgštys atlieka šias pagrindines funkcijas: jos panaudojamos specifinių organizmui baltymų sintezei, 20% organizmui reikalingos energijos gauti (oksiduojant 1 g baltymų susidaro 4 kcal), aminorūgštys panaudojamos įvairių biologiškai aktyvių junginių, tokių kaip hemo, purino, pirimidino bazių, kai kurių kofermentų, hormonų, pigmentų, biogeninių aminų sintezei.

Lentelė. Pakeičiamosios ir nepakeičiamosios aminorūgštys žmogui

Pakeičiamosios	Nepakeičiamosios
Alaninas	Argininas*
Asparaginas	Histidinas*
Asparto rūgštis	Izoleucinas
Cisteinas	Leucinas
Glutamo rūgštis	Lizinas
Gliutaminas	Metioninas
Glicinas	Fenilalaninas
Prolinas	Treoninas
Serinas	Triptofanas
Tirozinas	Valinas

*– būtinos tik jauniems, greitai augantiems organizmams.

6.1. KIEKYBINĖ SKRANDŽIO SULČIŲ ANALIZĖ

Per parą žmogaus organizme išsiskiria apie 1,5-2,5 litrų skrandžio sulčių. Rūgšti skrandžio terpė (pH 1,5-2,5) veikia bakteriocidiškai, be to denatūruoja globulinius baltymus, todėl juos greičiau pasiekia virškinimo fermentai. Nevalgiusio žmogaus skrandžio sultys yra rūgščios dėl sultyse esančios HCl. Žmogaus skrandžio sultyse yra apie 0,07-0,17% HCl.

Skrandžio sulčių rūgštingumu vadinamas titravimui suvartotas 0,1 N NaOH tirpalo kiekis mililitrais, apskaičiuojant jį 100 ml skrandžio sulčių. Nustatant bendrąjį

rūgštingumą, naudojamas indikatorius fenolftaleinas. Nustatant laisvosios HCl kiekį – indikatorius p-dimetilaminoazobenzolas. Normalus bendras rūgštingumas yra 40–60, laisvasis rūgštingumas – 20–40, nelaisvasis rūgštingumas – 10–20.

Bendrojo skrandžio sulčių rūgštingumo nustatymas.

Bendrąjį skrandžio sulčių rūgštingumą sudaro laisvoji HCl, rūgštis sujungta su maisto baltymais ir jų skilimo produktais, kitos skrandžio sultyse esančios rūgštiesios medžiagos (acto, sviesto, pieno rūgštys, rūgštūs fosfatai ir kt.).

Darbo eiga:

1. Į konusinę kolbutę pipete įpilama 10 ml skrandžio sulčių ir įlašinami 1-2 lašai indikatoriaus fenolftaleino.
2. Titruojama 0,1 N NaOH tirpalu, kol atsiranda rausva spalva. Suvartotas 0,1 N NaOH kiekis perskaičiuojamas 100 ml skrandžio sulčių.

Pavyzdžiui, 10 ml skrandžio sulčių nutitruoti sunaudota 5 ml 0,1 N NaOH tirpalo.

Bendrasis rūgštingumas: $5 \times 100 : 10 = 50$.

Laisvosios HCl nustatymas

Darbo eiga:

1. Į konusinę kolbutę įpilama 10 ml skrandžio sulčių ir įlašinami 3 lašai 0,5% p-dimetilaminoazobenzolo tirpalo.
2. Titruojama 0,1 N NaOH, kol kolbutės turinys nusidažo nekintančia geltona spalva. Analogiškai, kaip ir nustatant bendrąjį rūgštingumą, apskaičiuojamas laisvasis rūgštingumas 100 ml skrandžio sulčių.
3. Apskaičiuojama HCl koncentracija skrandžio sultyse procentais, žinant, kad 1 ml 0,1 N NaOH tirpalo reaguoja su 0,0001 moliu HCl, o tai atitinka 0,00365 g HCl:

$$n_{\text{NaOH}} = n_{\text{HCl}} = 0,001 \text{ l} \cdot 0,1 \text{ mol/l} = 0,0001 \text{ mol},$$

$$m_{\text{HCl}} = M_{\text{HCl}} \cdot n_{\text{HCl}} = 36,5 \text{ g/mol} \cdot 0,0001 \text{ mol} = 0,00365 \text{ g}.$$

Tada HCl kiekis 100 ml skrandžio sulčių apskaičiuojamas pagal išraišką:

$$m_{\text{HCl}} = \frac{V_{\text{NaOH, ml}} \times 0,00365 \text{ g} \times 100 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$$

Kadangi 100 ml skrandžio sulčių sveria apie 100 gramų, tai gauta HCl masė ir yra lygi procentinei HCl koncentracijai.

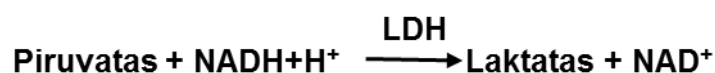
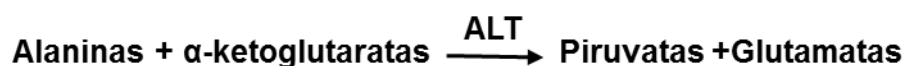
Nelaisvojo rūgštingumo nustatymas

Nelaisvasis rūgštingumas apskaičiuojamas iš bendrojo rūgštingumo atėmus laisvąjį rūgštingumą.

6.2. ALANINO AMINOTRANSFERAZĖS KONCENTRACIJOS KRAUJO SERUME NUSTATYMAS

Metodo principas:

Alanino aminotransferazė (ALT) katalizuoja alanino aminogrupės pernašą α -ketoglutaratui, susidarant piruvatui ir glutamatui. Šio fermento koncentracija nustatoma pagal redukuoto nikotinamidadeninukleotido (NADH), dalyvaujančio laktato dehidrogenazės (LDH) katalizuojamoje reakcijoje, koncentracijos sumažėjimą. Tai atliekama spektrofotometrijos būdu matuojant šviesos sugertį, kai bangos ilgis yra 340 nm.



Sudėtis:

A reagentas: 0,15 M Tris, 0,75 M L-alaninas, >1350 Vnt./l LDH, pH 7,3.

B reagentas: 1,3 mM NADH, 75 mM α -ketoglutaratas, 148 mM NaOH, 9,5 g/l NaN_3 .

Reagento paruošimas:

Darbinis tirpalas: reagentas B supilamas į reagento A butelį. Atsargiai išmaišoma. Galima paruošti tik tam tikrą tūrį tirpalo: 4 ml reagento A + 1 ml reagento B. Tirpalas išlieka stabilus 2-8 °C temperatūroje 2 mėnesius.

Tiriamasis pavyzdys:

Kraujo serumas. ALT kraujo serume išlieka stabili 7 dienas.

Darbo eiga:

1. Į spektrofotometro kiuvetę (1 cm) įpilama:

Reakcijos temperatūra	37 °C	30 °C
Darbinis tirpalas	1,0 ml	1,0 ml
Tiriamasis pavyzdys	50 μ l	100 μ l

2. Gerai sumaišoma. Kiuvetė dedama į spektrofotometro šulinėlį. Šviesos sugertis matuojama spektrofotometru, kai bangos ilgis yra 340 nm. Įjungiamas laikmatis.
3. Po 5 min. užrašoma pradinė šviesos sugertis. Po to ji matuojama kas 1 min.
4. Paskaičiuojamas skirtumas per 1 min. ($\Delta A/\text{min.}$).

Apskaičiavimas:

ALT koncentracija pavyzdyje apskaičiuojama pagal formulę:

$$C_{ALT} = \frac{\Delta A/\text{min.} \times V_b \times 10^6}{\epsilon \times I \times V_p} \text{ (Vnt./l)}$$

ϵ – NADH molinės sugerties koeficientas; jis lygus 6300, kai bangos ilgis yra 340 nm. Šviesos nueitas kelias tirpale I yra 1 cm.

Bendras reakcijos mišinio tūris (V_b) yra 1,05 ml esant 37 °C temperatūrai ir 1,1 ml esant 30 °C temperatūrai.

Tiriamąjį pavyzdžio mišinio tūris (V_p) yra 0,05 ml esant 37 °C temperatūrai ir 0,1 ml esant 30 °C temperatūrai.

1 Vnt./l yra 0,0166 $\mu\text{kat/l}$.

ALT koncentraciją galima apskaičiuojama pagal formulę:

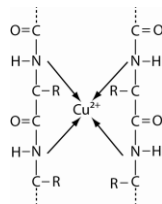
$\Delta A/\text{min.}$	37 °C	30 °C
	$\times 3333 = \text{Vnt./l}$ $\times 55,55 = \mu\text{kat/l}$	$\times 1746 = \text{Vnt/l}$ $\times 29,1 = \mu\text{kat/l}$

Rekomenduojamos reikšmės:

Reakcijos temperatūra	37 °C	30 °C
ALT koncentracija	41 Vnt./l = 0,68 $\mu\text{kat/}$	29 Vnt./l = 0,48 $\mu\text{kat/l}$

6.3. BALTŲMŲ KIEKIO NUSTATYMAS KRAUJO SERUME BIURETO METODU

Biureto reakcija yra būdinga junginiams, turintiems du ar daugiau peptidinių ryšių. Paveikus šarminį baltymų tirpalą vario sulfatu, jis nusidažo mėlynai violetine spalva. Reakcijos metu peptidinės grupės prisijungia vario jonus, susidaro spalvoti kompleksiniai junginiai. Spalvos intensyvumas tiesiog proporcingas baltymų koncentracijai kraujo serume ir nustatomas spektrofotometru, kai bangos ilgis yra 540 nm.

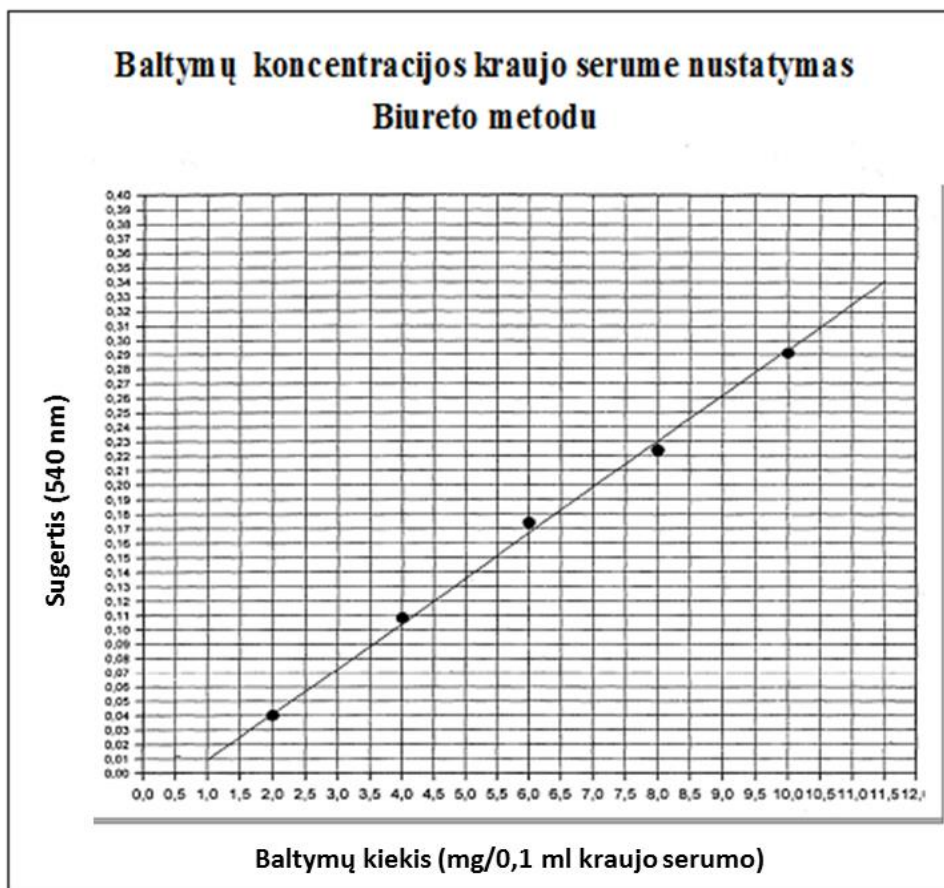


Darbo eiga:

1. Imami 2 mėgintuvėliai. Į pirmąjį (tiriamąjį) mėgintuvėlį įpilama 0,1 ml kraujo serumo, į antrąjį (kontrolinį) – 0,1 ml distiliuoto vandens.
2. Į abu mėgintuvėlius pilama po 5 ml biureto reagento (vario sulfato šarminio tirpalo). Mėgintuvėlių turinys sumaišomas ir laikomas 20 min. kambario temperatūroje (iki +25 °C).
3. Spalvos intensyvumas tiriamajame mėgintuvėlyje nustatomas spektrofotometru (bangos ilgis – 540 nm).
4. Baltymų koncentracija (g/l) kraujo serume nustatoma remiantis kalibracine kreive. Pavyzdžiui, 0,1 ml kraujo serumo yra 8,0 mg baltymų, tai 1 litre jų yra 80 g.

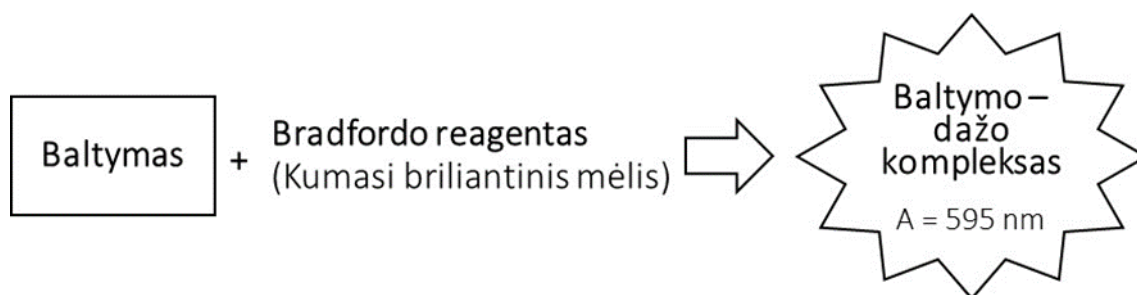
Normalus baltymų kiekis kraujo serume yra 65-85 g/l.

Kalibracinė kreivė



6.4. BALTYMŲ KIEKIO NUSTATYMAS KRAUJO SERUME BRADFORDO METODU

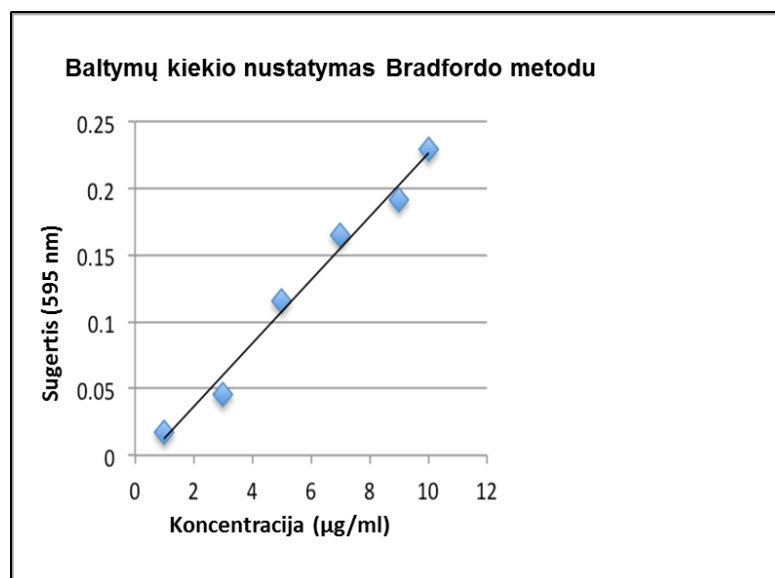
Bradfordo reagentas naudojamas nustatyti bendrą baltymų koncentraciją tirpaluose. Tai dažo Kumasio brilantinio mėlio G-250 fosfato rūgštyje ir metanolyje tirpalas. Metodo principas pagrįstas mėlynos spalvos komplekso tarp baltymų ir dažo susidarymu rūgštinėje aplinkoje. Komplekso susidaryme dalyvauja baltyme esančios bazinės amino rūgštys (argininas, lizinas, histidinas). Spalvos intensyvumas yra proporcingas baltymo molekulėje esančių teigiamų krūvių skaičiui. Laisvos amino rūgštys ir peptidai nesudaro spalvotų kompleksinių junginių su šiuo reagentu.



Darbo eiga:

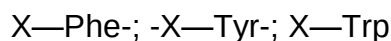
1. Į matavimo kolbutę (100 ml) įpilama 1 ml kraujo serumo ir 99 ml distiliuoto vandens, gaunama 100 ml 100 kartų praskiesto kraujo serumo.
 2. Imami du mėgintuvėliai. Į pirmą (tiriamąjį) mėgintuvėlį įpilama 0,1 ml kraujo serumo (1:100), į antrą (kontrolinį) – 0,1 ml distiliuoto vandens.
 3. Į abu mėgintuvėlius pilama po 3 ml Bradfordo reagento. Mėgintuvėlių turinys sumaišomas ir laikomas 10 min. kambario temperatūroje.
 4. Spalvos intensyvumas tiriamajame mėgintuvėlyje nustatomas spektrofotometru, kai bangos ilgis yra 595 nm. Matavimus atlikti 30 min. laikotarpyje.
 5. Baltymų koncentracija (g/l) kraujo serume nustatoma remiantis kalibracine kreive. Pavyzdžiui, 0,1 ml kraujo serumo (1:100) yra 0,9 mg/ml baltymo, gautą reikšmę reikia padauginti iš 100 – gauname 90 mg/ml arba 90 g/l baltymo.
- Normalus baltymų kiekis kraujo serume yra 65-85 g/l.

Kalibracinė kreivė



6.5. BALTYMŲ SKAIDYMAS PEPSINU

Skrandžio sulčių fermentas pepsinas yra endopeptidazė (optimalus veikimo pH – 1,5-2,5). Jis skaido peptidinius ryšius baltymo molekulės viduje tarp šių amino rūgščių:



Hidrolizuojant pepsinu netirpų baltymą fibriną, į tirpalą pereina atskilę peptidai, kurie nustatomi biureto reakcija.

Darbo eiga:

1. Į 5 sunumeruotus mėgintuvėlius, kaip nurodyta pateiktoje lentelėje, supilami atitinkami 1% pepsino tirpalo, 0,2% HCl ir vandens kiekiai.
2. Pirmame mėgintuvėlyje pepsino tirpalas neutralizuojamas NaHCO_3 (natrio hidrokarbonatu) iki pH 7,0. pH tikrinamas lakmuso indikatoriumi.
3. Ketvirtame mėgintuvėlyje pepsino tirpalas pavirinamas.
4. Į visus mėgintuvėlius dedama po gabalėlį žirnio dydžio fibrino. Mėgintuvėlių turinys maišomas purtant.
5. Visi mėgintuvėliai laikomi termostate 60 min., esant 37°C temperatūrai.
6. Iš kiekvieno mėgintuvėlio imama po 1 ml (20 lašų) filtrato ir daroma biureto reakcija. Į 20 lašų filtrato įlašinami 5 lašai 10% NaOH ir 1 lašas 1% CuSO_4 tirpalų. Sumaišoma. Jei tirpale yra peptidų, tirpalas nusidažo violetine spalva. Rezultatai surašomi į lentelę.

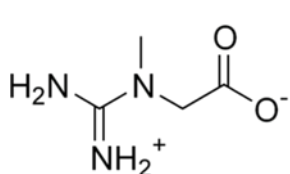
Darbo rezultatai ir išvados:

Mėginys	1% pepsino tirpalas (ml)	0,2% HCl tirpalas (ml)	H ₂ O (ml)	Fibrinas	Rezultatai (biureto reakcija)
1	5,0	–	–	+	
2	–	5,0	–	+	
3	2,5	2,5	–	+	
4	2,5*	2,5	–	+	
5	–	–	5,0	+	

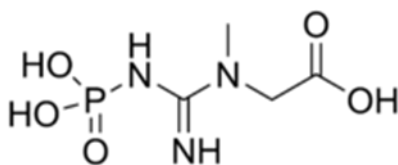
* pavirintas pepsinas

6.6. KREATININO KIEKIO NUSTATYMAS ŠLAPIME

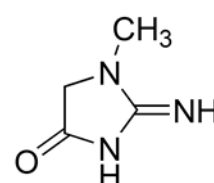
Kreatininas susidaro iš raumenyse kaupiamo didžiaenergio junginio – kreatino fosfato. Kreatininas yra kreatino fosfato spontaninio defosforilinimo bei iš jo raumenyse susidariusio kreatino dehidratacijos produktas.



Kreatinas



Kreatino fosfatas



Kreatininas

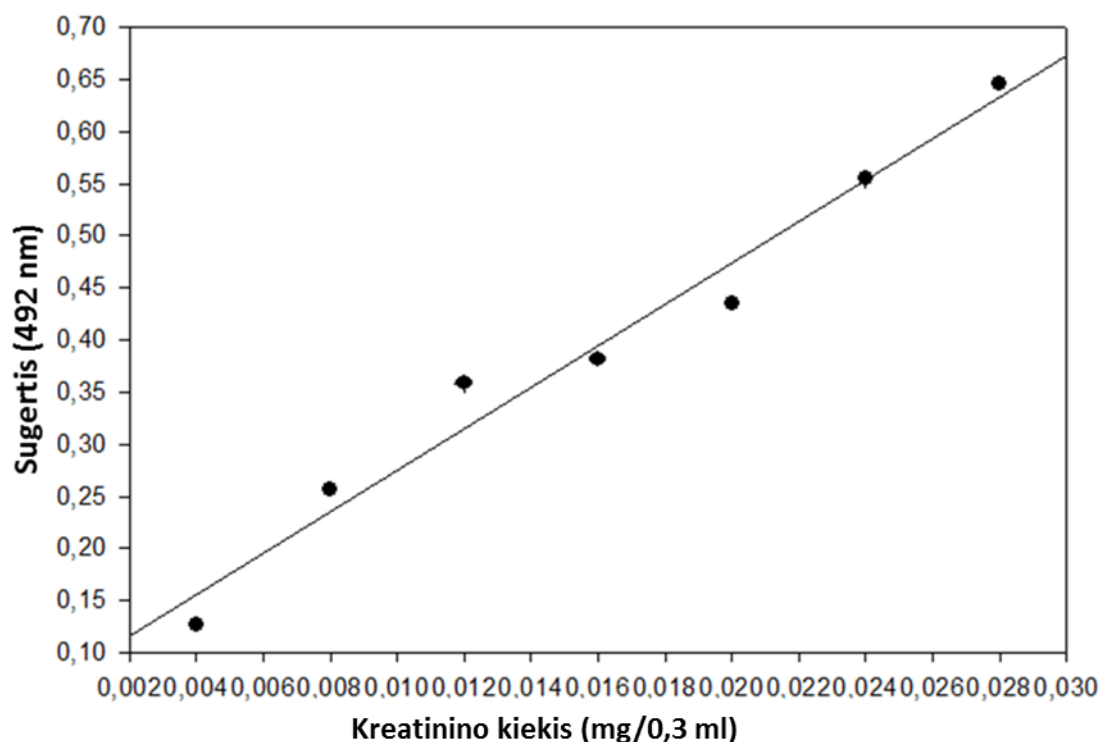
Kreatininas nustatomas pagal spalvinę Jofės reakciją.

Darbo eiga:

1. Į mėgintuvėlį įpilama 2,7 ml 17,5 mM pikrino rūgštis ir 0,29 M NaOH mišinio (1:1).
2. Pridedama 0,3 ml tiriamojo šlapimo, praskiesto 50 kartų. Gerai sumaišoma.
3. Inkubuojama kambario temperatūroje 20 min.
4. Matuojama šviesos sugertis (bangos ilgis 492 nm) 1 cm kiuvetėje.
5. Pagal kalibracinę kreivę įvertinamas kreatinino kiekis (mg) paros šlapime.
6. Perskaičiuojama kreatinino koncentracija šlapime mmol/l ($M_{\text{kreatinino}} = 113,12 \text{ g/mol}$).

Norma: moterims – 5,3-13,3 mmol/24 val., vyrams – 8,8-17,7 mmol/24 val.

Kalibracinė kreivė



6.7. BALTŲMŲ IŠSKYRIMAS IR GRYNINIMAS

Individualių baltymų išskyrimo metodai pagrįsti skirtingomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis. Baltymus galima išskirti tik esant žemai temperatūrai. Tinkamiausia temperatūra yra artima tirpalo užšalimo temperatūrai. Esant žemai temperatūrai, susilpnėja mikroorganizmų dauginimasis, nuslopinamas proteazių poveikis.

Tiriant mažai žinomus baltymus, reikia vengti rūgščių ir šarmų, nes daugelis baltymų nekinta kai pH artimas 7. Esama ir išimčių, pvz., tripsinas, chimotripsinas ir pepsinas yra patvarūs rūgščioje terpėje. Organiniai tirpikliai (etanolis, acetonas) tinka baltymams išskirti tik esant žemai temperatūrai (apie -10°C).

Pagrindiniai baltymų išskyrimo etapai:

1. Baltymų ekstrahavimas iš ląstelių ir audinių.
2. Nebaltyminių medžiagų pašalinimas.
3. Baltymų mišinio frakcionavimas.
4. Druskų pašalinimas iš baltymų.

Druskoms ir kitoms mažos molekulinės masės priemaišoms pašalinti iš baltymų naudojamas dializės metodas, gelfiltracija. Šių metodų pagrindą sudaro tai, kad baltymų molekulės, turėdamos didelę molekulinę masę, negali prasiskverbti pro membranų poras arba įsiskverbti į gelio granules.

Baltymams išskirti plačiai taikomas elektroforezės metodas, kuris pagrįstas tuo, kad skirtingi baltymai nevienodai jonizuojami, įgyja skirtingą krūvį ir todėl nevienodu greičiu juda elektros lauke.

6.7.1. Gelfiltracija kolonėlėje

Gelfiltracijai naudojami molekuliniai tinkleliai – inertinės hidratuotos medžiagos, pvz., polisacharidai kaip poringos granulės. Jos gaunamos iš bakterijų polisacharidų (sefadeksai), agaro arba polimerizuotų akrilamido gelių (akrileksas).

Nedidelės molekulės prasiskverbia į granules per poras, todėl pro geliu pripildytą kolonėlę juda lėčiau negu didelės molekulės, negalinčios patekti į granulių vidų.

Darbo eiga:

1. Kolonėlė pripildoma išbrinkintu izotoniniame (0,9%) NaCl tirpale molselektu G-50.
2. Paruošiamas dviejų komponentų mišinys: sočiojo mėlynojo dekstrano tirpalo, kurio molekulinė masė yra 10^7 Da, ir sočiojo $K_2Cr_2O_7$ (kalio bichromato) tirpalo, kurio molekulinė masė yra 294 Da, santykiu 1:1.
3. Ant gelio paviršiaus užlašinami 2-3 lašai frakcionuoto mišinio ir palaukiama, kol gelis sugers tirpalą.
4. Atsargiai per stiklinę lazdelę, priglaustą prie sienelės, į kolonėlę įpilama apie 2 ml 0,9 % NaCl tirpalo ir prijungiamas lašintuvas su NaCl tirpalu. Šio tirpalo reikia išskiriamų medžiagų eliacijai (išplovimui).
5. Perėjęs per kolonėlę mišinys pasiskirsto skirtingų spalvų frakcijomis. Kiekviena frakcija surenkama į skirtingus mėgintuvėlius.

6.7.2. Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje (PAAG)

Baltymų molekulės elektrinio krūvio dydis ir ženklas priklauso nuo bazinių ir rūgštinių jonizuotų grupių santykio molekulėje. Leidžiant pastovią elektros srovę baltymų molekulės tirpale juda priešingai įkrauto poliaus link.

Baltymų elektroforezė gali vykti natyvinėmis ir denatūravimo sąlygomis. Vykstant elektroforezei natyvinėmis sąlygomis, baltymų molekulių judėjimo greitis priklauso nuo jų krūvio, molekulinės masės, hidratacijos laipsnio, molekulių dydžio ir formos. Vykstant elektroforezei denatūravimo sąlygomis, pridedama natrio dodecilsulfato (NDS), todėl baltymo molekulės tarsi išsitiesia ir jų judėjimas elektriniame lauke priklauso tik nuo jų molekulinės masės.

Elektroforezė natyvinėmis sąlygomis atliekama, kai norima išvalyti ir išgryninti baltymą, o denatūravimo sąlygomis – kai norima nustatyti baltymo molekulinę masę.

Elektroforezė vyksta specialiose plokštelėse, pripildytose PAAG. PAAG yra akrilo rūgšties amido (akrilamido ir bisakrilamido) polimeras.

Tirpalai:

A. Koncentruotas tirpalas:

1 M Tris-HCl, pH 7,5.

B. Darbiniai tirpalai:

Elektrodinis buferis: 0,025 M Tris-HCl buferis (pH 8,3), 0,192 M glicinas, 0,1% NDS.

Tirpalai skiriamajam geliui:

1. 0,75 M Tris-HCl buferis (pH 8,8), 0,2% NDS.
2. 0,81% bisakrilamido (N,N'-metilenbisakrilamido) ir 30% akrilamido (akrilo rūgšties amido) tirpalas (santykis 1:37).

Buferis koncentruojančiam geliui: 0,25 M Tris-HCl buferis (pH 6,8), 0,2% NDS.

Pavyzdžio buferis: 0,05 M Tris-HCl buferis (pH 7,5), 15% glicerolio, 1% NDS, 3% β-merkaptioetanolio.

Darbo eiga:

Elektroforezė 15% PAAG, denatūruojant fermento molekules (su 0,2% NDS), atliekama Laemli metodu.

1. Elektroforezės plokštelės sandariai pritvirtinamos stovė guminėmis tarpinėmis ir gnybtais.
2. Cheminėje stiklinėje paruošiamas 20 ml mišinys 15% geliui gauti: 6,67 ml buferinio tirpalo skiriamajam geliui (pH 8,8), 10 ml akrilamido+bisakrilamido tirpalo, 11 mg amonio persulfato ((NH₄)₂S₂O₃), ištirpinto 3,33 ml dejonizuoto vandens, ir 10 μl TEMED (N,N,N',N' tetrametiletildiamino).
3. Paruoštas skiriamojų gelio tirpalas supilamas į ertmę tarp elektroforezės plokštelių

taip, kad viršutinis gelio paviršius būtų apie 1,5 cm žemiau už viršutinį jų kraštą. Atsargiai ir lėtai pilant sienele, užpilamas kelių milimetrų storio distiliuoto vandens sluoksnis. Turi būti riba, skirianti vandenį ir gelį. Vanduo apsaugo gelį nuo oro deguonies, kuris yra polimerizacijos slopiklis, be to, sudaro sąlygas gauti lygų, plokščią paviršių. Gelis stingsta apie 20 min.

4. Pagrindiniam geliui sustingus, vandens sluoksnis pašalinamas siaura filtrinio popieriaus juoste.

5. Į ertmę tarp plokštelių užpilamas koncentruojantis gelis, kurio 10 ml ruošama cheminėje stiklinėje iš 2,5 ml 0,25 M Tris-HCl buferio (pH 6,8); 1,5 ml bisakrilamido+akrilamido tirpalo; 5 mg $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, ištirpinto 3,5 ml dejonizuoto vandens, ir 5 μl TEMED. Po to į ertmę tarp plokštelių įstatomos „šukutės“ taip, kad po jų dantukais nesusidarytų oro burbulai. Gelis stingsta apie 15 min.

6. Sustingus koncentruojančiam geliui, „šukutės“ atsargiai ištraukiamos, gelyje susidarę šulinėliai praplaunami vandeniu, o po to elektrodiniu buferiu.

7. Baltymų pavyzdžiai elektroforezei ruošiami juos inkubuojant 3 min. 90 °C temperatūroje 0,05 M Tris-HCl buferyje (pH 7,5). Į PAAG plokštelės griovelius įnešama po 5-20 μg baltymo. Į tiriamąjį baltymų tirpalą pridedama mėlyno dažo – bromfenolio mėlynojo, kad galima būtų stebėti elektroforezės eigą ir matyti jos pabaigą.

8. Apatinė elektrodinė kamera pripildoma elektrodinio buferinio tirpalo ir sujungiama su viršutine elektrodine kamera. Apatinė, o po to ir viršutinė elektrodinė kamera pripildoma elektrodinio buferio ir uždengiama dangteliu.

9. Elektroforezė vyksta tekant pastoviai 40 mA/plokštei elektros srovei.

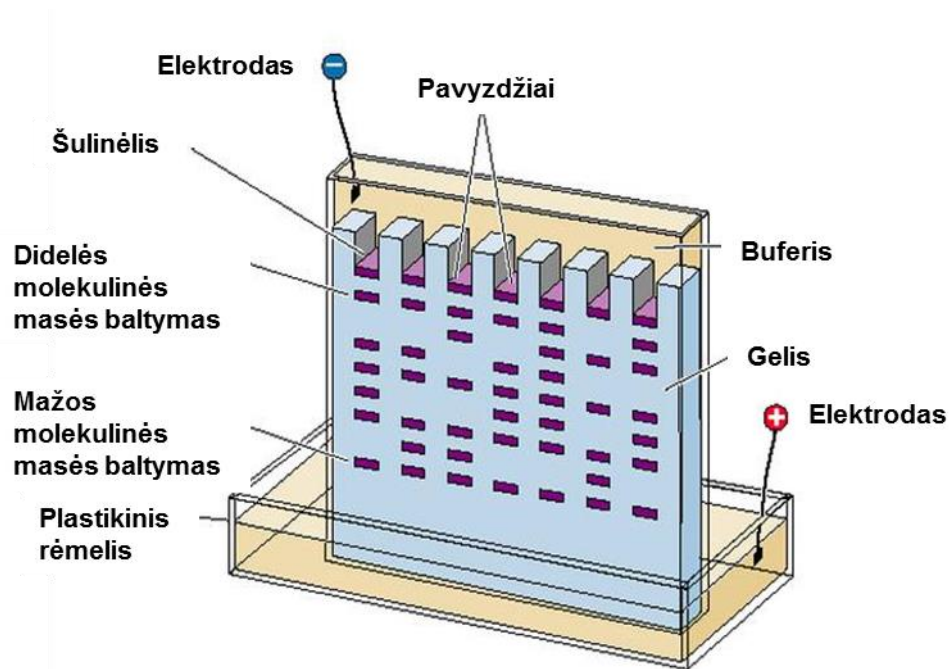
10. Elektroforezė baigiama, kai mėlyna juosta pasiekia plokštelių apačią. Ji trunka apie 1 val. Pasibaigus elektroforezei išjungiamas srovės šaltinis, viršutinė kamera atskiriama nuo apatinės, išpilamas buferinis tirpalas, išimamos plokštelės su geliu.

11. Geliai iš plokštelių atsargiai išimami ir patalpinami į nerūdijančio plieno indą, kur dažomi specialiais mėlynais dažais (Kumasi mėlis R) 1 val.

12. Po to dažai atsargiai supilami į tam skirtą indą. Dažų perteklius nuo gelio nuplaunamas 7% CH_3COOH tirpalu, periodiškai keičiant tirpalą, kol gelio sritys, kur nėra baltymo, tampa visiškai skaidrios.

13. Gelį nudažius ir atplovus dažo perteklių, matuojami baltymų-žymių ir tiriamojo baltymo pagrindiniame gelyje nueiti atstumai (R_f). Nustatoma baltymų-žymių

molekulinės masės logaritmo priklausomybė nuo R_f . Pagal gautą kalibracinę kreivę nustatoma tiriamųjų baltymų molekulinė masė. Naudojami baltymai-žymės: mioglobinas (17,8 kDa), chimotripsinogenas (25 kDa), jaučio serumo albuminas (68 kDa), fosforilazė B (91,5 kDa).



Pav. Baltymų elektroforezės poliakrilamido gelyje schema

6.8. KARBAMIDO KONCENTRACIJOS NUSTATYMAS KRAUJO SERUME

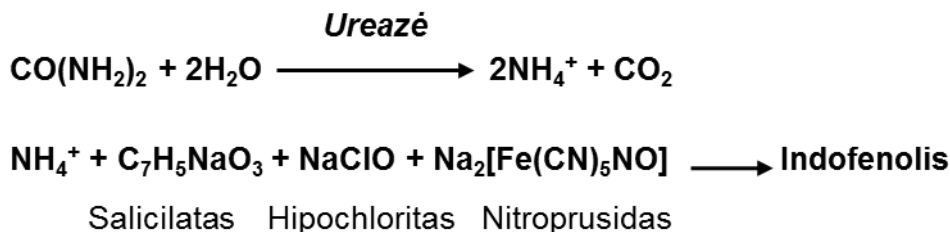
Karbamidas sintezuojamas kepenyse kaip aminorūgščių deaminavimo šalutinis produktas. Jo išskyrimas su šlapimu yra pagrindinis azoto šalinimo kelias.

Padidėjusi karbamido koncentracija plazmoje nustatoma laikantis baltyminės dietos, dėl padidėjusio baltymų katabolizmo, esant virškinimo trakto kraujavimui, dėl lengvos dehidratacijos, šoko, sukulto širdies nepakankamumo, gydymo gliukokortikoidais (prerenalinė uremija). Uremija (padidėjimas kraujyje nebaltyminių azotinių medžiagų) nustatoma tokiais atvejais, kada sutrinka šlapimo pašalinimas: inkstų akmenligė, navikas arba prostatos hipertrofija. Karbamido, kaip inkstų funkcijos žymens, informatyvumą riboja tai, kad jo koncentracija kraujyje kinta dėl nepriklausomų nuo inkstų priežasčių.

Klinikinė diagnozė turėtų remtis ne vieno tyrimo rezultatu, bet būtina įvertinti ir kitus klinikinius bei laboratorinius duomenis.

Metodo principas:

Karbamidas, esantis mėginyje, sudaro spalvotą kompleksą, kuris gali būti nustatomas spektrofotometru:

**Reagentai:**

Reagentas A₁: 62 mM natrio salicilatas, 3,4 mM natrio nitroprusidas, 20 mM fosfatinis buferis, pH 6,9.

Reagentas A₂: > 500 Vnt./ml ureazė.

Reagentas B: 7 mM natrio hipochloritas, 150 mM natrio hidroksidas.

Standartinis tirpalas: 50 mg karbamido /100 ml, 23,3 mg KKA (kraujo karbamido azoto) /100 ml, 8,3 mmol/l karbamidas.

Reagentų paruošimas:

Reagentas B ir standartinis tirpalas yra paruošti naudojimui.

Reagentas A: Supilti vienos reagento A₂ ampulės turinį į reagento A₁ buteliuką, gerai sumaišyti. Ampulę praskalauti trupučiu paruošto mišinio. Kiti tūriai ruošiami pagal proporciją:

1ml reagento A₂ + 24 ml reagento A₁.

Laikyti 2-8 °C temperatūroje iki 2 mėn.

Papildoma įranga:

Termostatinė 37 °C temperatūros vandens vonia.

Spektrofotometras (bangos ilgis 600 nm).

Mėginys:

Serumas. Karbamidas serume, laikant 2-8 °C temperatūroje, stabilus 7 dienas.

Darbo eiga:

1. Reagentai atšildomi iki kambario temperatūros.
2. Į pažymėtus mėgintuvėlius supilama:

	Kontrolinis tirpalas	Standartinis tirpalas	Tiriamas tirpalas
Standartinis tirpalas	–	10 µl	–
Mėginys	–	–	10 µl
Reagentas A	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

3. Gerai sumaišoma ir inkubuojama 10 min. kambario temperatūroje (16-25 °C) arba 5 min 37 °C temperatūroje.
4. Į tuos pačius mėgintuvėlius įpilama:

Reagentas B	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
-------------	--------	--------	--------

5. Gerai sumaišoma ir inkubuojama 10 min. kambario temperatūroje (16-25 °C) arba 5 min 37 °C temperatūroje.
6. Matuojama standartinio tirpalo ir tiriamojo tirpalo šviesos sugertis ($A_{\text{standartinio}}$ ir A_{tiramajo}), kai bangos ilgis yra 600 nm, pagal kontrolinį tirpalą. Spalva patvari mažiausiai dvi valandas.

Skaiciavimas:

Karbamido koncentracija mėginyje apskaičiuojama pagal formulę. Jei kalibravimui naudojamas standartinis karbamido tirpalas, tuomet:

$$C_{\text{mėginio}} = \frac{A_{\text{tiramajo}}}{A_{\text{standartinio}}} \times C_{\text{standartinio}}$$

	Serumui
$\frac{A_{\text{tiramajo}}}{A_{\text{standartinio}}}$	×50 = mg karbamido /100 ml ×23,3 = mg KKA /100 ml ×8,3 = mmol/l karbamido

Orientaciniai duomenys palyginimui:

15-39 mg/100 ml karbamido; 7-18 mg/100 ml KKA; 2,5-6,5 mmol/l karbamido. Naujagimių karbamido koncentracija būna mažesnė, o vyresnių kaip 60 metų – didesnė, negu suaugusiųjų. Vyrų karbamido koncentracija paprastai kiek didesnė, negu moterų.

KLAUSIMAI SAVIRUOŠAI

Baltymų ir aminorūgščių struktūra ir savybės:

1. Kokios aminorūgštys vadinamos nepakeičiamosiomis? Išvardinkite jas.
2. Kokius žinote biologiškai svarbius peptidus? Jų biologinis vaidmuo.
3. Baltymų klasifikavimo principai.
4. Apibūdinkite baltymų struktūras ir jas palaikančius ryšius.
5. Baltymų biologinių funkcijų priklausomybė nuo struktūrų.
6. Globulinių baltymų struktūros ir biologinio vaidmens ypatumai.
7. Kraujo plazmos baltymų (albuminų, globulinų) struktūra ir biologinis vaidmuo.
8. Deguonies ir kitų ligandų prisijungimo priklausomybė nuo baltymo (mioglobino, hemoglobino) struktūros ir kitų veiksnių.
9. Fibrilinių baltymų struktūros ir biologinio vaidmens ypatumai.

Baltymų (aminorūgščių apykaita):

1. Bendroji aminorūgščių apykaitos schema.
2. Aminorūgščių peramininimas, deamininimas (tiesioginis, netiesioginis), dekarboksilinimas.
3. Kokios α -ketorūgštys yra peramininimo reakcijų substratai?
4. Glikogeninės ir ketogeninės aminorūgštys.
5. Koks yra amoniako toksinio veikimo mechanizmas?
6. Išvardinkite pagrindinius amoniako detoksavimo kelius.
7. Parašykite karbamido sintezės suminę lygtį.
8. Uremija ir jos priežastys.
9. Glutaminazės vaidmuo palaikant kraujo rūgščių-šarmų pusiausvyrą.
10. Svarbesnieji biogeniniai aminai; jų biologinis vaidmuo.
11. Schematiškai pavaizduokite tirozino panaudojimo kelius organizme.
12. Nurodykite fermentus, dėl kurių trūkumo išsivysto šios ligos: a) fenilketonurija, b) alkaptonurija, c) albinizmas.
13. Metilinimo reakcijų svarba organizme.

7. NUKLEORŪGŠTYS IR JŲ APYKAITA

Nukleorūgštys – tai ilgi linijiniai polimerai, sudaryti iš monomerų nukleotidų, tarpusavyje sujungtų fosfodiesteriniais ryšiais.

Kiekvienas nukleotidas sudarytas iš pentozės (ribozės arba deoksiribozės), fosfato grupės ir heterociklinės (purino arba pirimidino) bazės. Bazė prisijungia prie angliavandenio pirmo C atomo N-glikozidiniu ryšiu. Nukleorūgštys skirstomos į: deoksiribonukleorūgštis (DNR) ir ribonukleorūgštis (RNR). Į DNR sudėtį įeina 2-deoksi-D-ribozė, į RNR – D-ribozė. DNR sudėtyje yra purino (adeninas, guaninas) ir pirimidino (timinas, citozinas) bazių bei kai kurių modifikuotų (minorinių) bazių, pvz., 5-metilcitozino, hipoksantino ir t.t. RNR sudėtyje yra purino bazių adenino ir guanino bei pirimidino bazių citozino ir uracilo. Tam tikrose RNR rūšyse yra daug modifikuotų bazių, pvz., tRNR molekulėse jų yra apie 25 %.

DNR molekulėms būdinga dvigubosios spiralės struktūra, kur dvi grandinės išsidėsto antilygiagrečiai viena prieš kitą ir sudaro dešiniojo sukimo dvigubąją spiralę. Bazės išsidėsto spiralės viduje viena priešais kitą. Dvigubąją spiralę palaiko vandeniliniai ryšiai, susidarantys tarp vienos grandinės purino bazės ir kitos grandinės pirimidino bazės. Adeninas su timinu sudaro du, o guaninas su citozinu – tris vandenilinius ryšius. Šios bazės vadinamos komplementariosiomis bazėmis. Kiekybinį bazių santykį DNR molekulėse nusako Čargafo taisyklė: kiekvienoje komplementariojoje grandinėje purino bazių skaičius lygus pirimidino bazių skaičiui (adenino bazių skaičius lygus timino bazių skaičiui, o guanino bazių skaičius lygus citozino bazių skaičiui). DNR molekulėms būdingas denatūravimas – grandinių atsiskyrimas. Parinkus tinkamas sąlygas, komplementarios DNR grandinės vėl gali susijungti – šis procesas vadinamas renatūravimas. Visose ląstelėse DNR pagrindinis vaidmuo yra tai paveldimumo informacijos saugojimas ir perdavimas.

RNR molekulės dalyvauja įvairiuose procesuose, susijusiuose su informacijos pernaša ir jos realizavimu. Pagrindinės RNR rūšys yra šios: informacinė RNR (iRNR), ribosominė RNR (rRNR) ir pernašos RNR (tRNR). Žinomos RNR, kurioms būdingos katalizinės savybės – tai ribozimai. RNR molekulės yra trumpesnės už DNR molekules, jas sudaro nuo 70 (tRNR) iki kelių tūkstančių nukleotidų (iRNR). RNR molekulėje bazių poras sudaro tik dalis bazių; šioms nukleorūgštims būdinga vienagrandė struktūra.

7.1. MIELIŲ NUKLEOPROTEINŲ HIDROLIZĖ IR ANALIZĖ

Ląstelėse nukleorūgštys yra susijungusios su baltymais, t.y. sudaro nukleoproteinus. Eukariotų ląstelėse beveik visa DNR yra branduoliuose (tik apie 0,1 – 0,2% ląstelės DNR yra mitochondrijose). Čia ji susijungia su baziniais baltymais histonais, turinčiais daug arginino ir lizino. Nukleorūgščių ir baltymų kompleksas branduolyje vadinamas chromatinu. 35% žmogaus chromatino masės sudaro DNR, 5% – RNR ir 60% – baltymai. Hidrolizuojant rūgštimi, nukleoproteinai skyla pagal šią schemą:

Nukleoproteinai → Baltymai → Peptidai → Aminorūgštys



Nukleorūgštys



Oligonukleotidai



Purino, pirimidino bazės, ribozė arba deoksiribozė, fosfato rūgštis

Mielėse yra daug nukleoproteinų, todėl mieles galima naudoti nukleoproteinų hidrolizei tirti.

Darbo eiga:

1. Į 200 ml kolbą dedama 50 mg šviežių mielių ir užpilama 4 ml 10% H_2SO_4 (sulfato (sieros) rūgšties) tirpalo. Užkemšama kamščiu, kuriame įstatytas 30 cm ilgio vamzdelis.
2. Kolba virinama 1 val. (reikia stebėti, kad skystis neišgaruotų).
3. Skystis ataušinamas ir filtruojamas. Filtrate nustatomi mielių nukleoproteinų hidrolizės produktai.

a) Biureto reakcija polipeptidams nustatyti.

Į mėgintuvėlį įlašinama 5 lašai filtrato, 10 lašų 10% NaOH tirpalo ir 1 lašas 1% $CuSO_4$ tirpalo. Jei yra peptidų, skystis įgauna violetinę spalvą.

b) Felingio reakcija ribozei ir deoksiribozei nustatyti.

Į mėgintuvėlį įlašinama 5 lašai hidrolizato, 5 lašai Felingio I reagento ir 5 lašai Felingio II reagento. Sumaišoma ir kaitinama, kol susidaro raudonos vienvalečio vario oksido nuosėdos.

c) Reakcija fosfato rūgščiai nustatyti.

Į mėgintuvėlį įlašinama 10 lašų molibdeninio reagento (amonio molibdato tirpalas nitrato rūgštyje), 5 lašai hidrolizato ir kelias minutes virinama. Atšaldžius išsiskiria geltonos fosfoamonio molibdato nuosėdos.

7.2. KOKYBINIS ŠLAPIMO RŪGŠTIES NUSTATYMAS ŠLAPIME

Šlapimo rūgštis yra galutinis purino nukleotidų apykaitos produktas žmogaus organizme. Per parą išsiskiria 2,36-5,90 mmol šlapimo rūgšties. Jos kiekis kraujyje yra 0,1-0,4 mmol/l. Kai kurių ligų atveju (pvz., podagros) šlapimo rūgšties koncentracija kraujyje didėja (hiperurikemija).

Reakcija šlapimo rūgščiai pažinti (mureksidinė reakcija):

Šlapimo rūgštis, veikiamą HNO_3 (nitrato (azoto) rūgštimi), virsta purpuro rūgštimi, kurios amonio druska (mureksidas) yra purpuro spalvos junginys.

Darbo eiga:

1. Šlapimo nuosėdos arba akmenys sutrinami porcelianinėje grūstuvėje.
2. Truputis sutrintų nuosėdų įberiama į porcelianinę lėkštelę, įlašinami keli lašai koncentruotos HNO_3 ir išgarinama lėkštelėje ant ugnies.
3. Ataušinama, įpilama apie 0,5 ml 25% NH_4OH (amonio hidroksido) tirpalo. Susidaro purpuro raudonumo tirpalas.

KLAUSIMAI SAVIRUOŠAI

Nukleotidų ir nukleorūgščių apykaita

1. Parašykite ir pavadinkite purino bazių nukleozidus.
2. Parašykite ir pavadinkite pirimidino bazių nukleotidus.
3. Parašykite DNR fragmentą struktūrinėmis formulėmis: a) ACTG; b) GCTA; c) TGAC.
4. Parašykite RNR fragmentą struktūrinėmis formulėmis: a) ACUG; b) GCUA; c) UGAC
5. iRNR, tRNR ir rRNR struktūros ypatumai ir biologinės funkcijos.
6. Pavaizduokite schematiškai DNR biosintezę (replikaciją), nurodant replikacijos fermentus ir svarbiausius baltymus.
7. Pateikite paveldimų ligų pavyzdžių, kurios atsiranda dėl molekulinų mutacijų.
8. Pavaizduokite schematiškai RNR sintezę (transkripciją); nurodykite fermentus ir svarbiausius baltymus.
9. Apibūdinkite baltymų sintezės etapus ir jos pagrindinius komponentus.
10. Pateikite aminorūgšties aktyvinimo schemą.
11. Kokie galutiniai apykaitos produktai susidaro skylant nukleotidams: a) purino; b) pirimidino?

12. Trumpai apibūdinkite podagros, ksantinurijos ir orotoacidurijos priežastis.
Biocheminiai podagros gydymo principai.

8. HORMONAI

Medžiagų apykaitą įvairiuose žinduolių organuose ir audiniuose valdo signalinės molekulės hormonai, veikdami ląstelių receptorius, esančius ląstelės membranoje arba jų viduje. Terminą hormonas (gr. *horman* – sukelti, sužadinti) 1905 m. pirmą kartą pavartojo anglų mokslininkas E. H. Starlingas. Hormonus išskiria endokrininių liaukų ląstelės; iki ląstelių-taikinių juos perneša kraujas. Jie valdo ne tik įvairių medžiagų apykaitą, bet ir ląstelių bei audinių augimą, širdies susitraukimo dažnį, kraujospūdį, inkstų funkciją, virškinamojo kanalo peristaltiką, virškinimo fermentų išsiskyrimą, laktaciją ir reprodukcinės sistemos aktyvumą.

Hormonams būdingi tam tikri biologinio poveikio ypatumai:

- Endokrininės liaukos ir jų išskiriami hormonai sudaro vieningą sistemą, kurią valdo tiesioginis ir grįžtamasis ryšiai.
- Hormonams būdingas didelis biologinis aktyvumas: aktyvumu pasižymi net labai mažos jų koncentracijos (10^{-6} - 10^{-9} mol/l).
- Hormonai valdo medžiagų apykaitą, keisdami fermentų kiekį, jų aktyvumą arba membranų laidumą jonams ir mažoms molekulėms ląstelėse taikiniuose.
- Hormonai biologiškai veikia per receptorius – savituosius baltymus, esančius ląstelės viduje arba membranose.
- Hormonams būdingas absoliutus savitumas, t. y. vienas hormonas negali būti pakeistas kitu.

8.1. KOKYBINĖS REAKCIJOS ADRENALINUI NUSTATYTI

Adrenalino reakcija su FeCl_3 .

Darbo eiga:

1. Į mėgintuvėlį įlašinami 3 lašai adrenalino tirpalo (1:1000) ir 1 lašas 1% geležies chlorido tirpalo. Mišinys nusidažo ryškiai žalia spalva, kuri vėliau pagelsta.
2. Į žalios spalvos tirpalą įlašinus 1 lašą koncentruoto amoniako tirpalo, spalva tampa raudona, o vėliau – ruda.

Adrenalino reakcija su KJO_3 (kalio jodatu).

Darbo eiga:

Į mėgintuvėlį įlašinami 3 lašai adrenalino tirpalo (1:1000), 2 lašai 10% KJO_3 tirpalo ir 2 lašai 10% CH_3COOH tirpalo. Mišinį pašildžius atsiranda raudonai violetinė spalva.

Adrenalino reakcija su diazo reagentu.

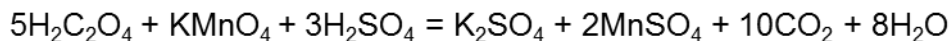
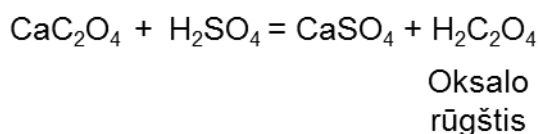
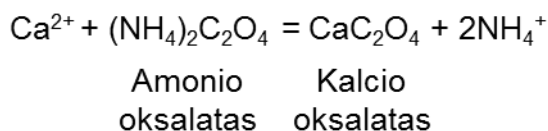
Darbo eiga:

Į mėgintuvėlį įlašinami 3 lašai 1% sulfanilo rūgšties tirpalo, 3 lašai 5% NaNO₂ (natrio nitrito) tirpalo, 5 lašai (1:1000) adrenalino tirpalo ir 3 lašai 10% Na₂CO₃ (natrio karbonato) tirpalo. Mišinys nusidažo raudona spalva.

8.2. KALCIO KONCENTRACIJOS NUSTATYMAS KRAUJO SERUME

ATVIRKŠTINIŲ PERMANGANATINIŲ METODŲ

Kalcis nusodinamas amonio oksalatu. Susidaręs kalcio oksalatas veikiamas sulfato rūgštimi, susidariusi oksalo rūgštis titruojama kalio permanganatu.



Darbo eiga:

1. Imami 2 centrifuginiai mėgintuvėliai. Į pirmą mėgintuvėlį įpilama 2 ml, į antrą (kontrolinį) – 4 ml distiliuoto vandens.
2. Į pirmą mėgintuvėlį įpilama 2 ml kraujo serumo, o į antrą (kontrolinį) serumo nepilama.
3. Į abu mėgintuvėlius įpilama po 1 ml 4% (NH₄)₂C₂O₄. Reagentą reikia pilti tiesiai į tirpalą, bet ne ant sienelių.
4. Mėgintuvėliai supurtomi ir paliekami pastovėti 30 min.
5. Vienodo svorio mėgintuvėliai centrifugoje statomi vienas prieš kitą. Centrifuguojama 10 min. 3000 aps./min. greičiu.
6. Tirpalas iš mėgintuvėlių išpilamas lauk. Mėgintuvėlių kraštai nušluostomi filtriniu popieriumi. Pirmame mėgintuvėlyje CaC₂O₄ nusėda ant dugno baltomis nuosėdomis.

7. Į abu mėgintuvėlius įpilama po 4 ml 2% NH₄OH tirpalo, supurtoma ir vėl tokiu pat būdu centrifuguojama. NH₄OH pilama tam, kad būtų pašalintas oksalato jonų perteklius. Susidaręs (NH₄)₂C₂O₄ yra tirpus ir pilamas lauk, nupilant skystį nuo nuosėdų.
8. Po nuosėdų plovimo nupilamas amoniakas ir į abu mėgintuvėlius įpilama po 2 ml 1 N sulfato rūgšties tirpalo. Nuosėdos išmaišomos stiklinėmis lazdelėmis ir, neišimant lazdelių, mėgintuvėliai 2 min. įstatomi į karšto vandens vonią.
9. Dar karštas tirpalas titruojamas 0,01 N KMnO₄ (kalio permanganatu), kol jis nusidažo rausva, vieną minutę neišnykstančia spalva.

10. Kalcio kiekis apskaičiuojamas naudojantis ekvivalentų dėsniu:

$$[V_1(\text{KMnO}_4) - V_2(\text{KMnO}_4)] \cdot C(1/z\text{KMnO}_4) = V(\text{serumo}) \cdot C(1/z\text{Ca}^{2+}),$$

$$C(1/z\text{Ca}^{2+}) = \frac{[V_1(\text{KMnO}_4) - V_2(\text{KMnO}_4)] \cdot C(1/z\text{KMnO}_4)}{V(\text{serumo})},$$

Norint suskaičiuoti kalcio koncentraciją mmol/l reikia naudoti šį perskaičiavimą:

$$C(\text{Ca}^{2+}) = \frac{C(1/z\text{Ca}^{2+}) \cdot 1000}{2} (\text{mmol/l})$$

V₁(KMnO₄) – 0,01N KMnO₄ ml kiekis, vartojamas tiriamam tirpalui titruoti,

V₂(KMnO₄) – 0,01 N KMnO₄ ml kiekis, vartojamas kontroliniam tirpalui titruoti,

V(serumo) – tyrimui paimtas serumo kiekis (2 ml),

C(1/z KMnO₄) – KMnO₄ ekvivalentų molinė koncentracija (mol/l),

C(1/z Ca²⁺) – Ca²⁺ ekvivalentų molinė koncentracija (mol/l),

C(Ca²⁺, mmol/l) – Ca²⁺ molinė koncentracija.

Normali kalcio koncentracija serume (plazmoje): suaugusiems 2,1-2,6 mmol/l, vaikams 2,5-3,0 mmol/l, naujagimiams 2,0-3,25 mmol/l.

8.3. KALCIO KONCENTRACIJOS NUSTATYMAS KRAUJO SERUME NAUDOJANT SAVITUOSIUS DAŽUS

Metodo principas:

Arsenazo III reagentas neutralioje aplinkoje su kalcio jonais sudaro mėlynos spalvos kompleksinį junginį.

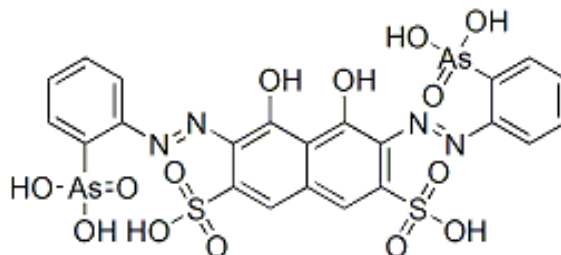


Raudona spalva

Mėlyna spalva

Spalvos intensyvumas yra proporcingas kalcio jonų koncentracijai tirpale, kuris įvertinamas spektrofotometrinio būdu, kai bangos ilgis yra 650 nm.

Cheminis Arseno III pavadinimas yra 2,7(bis(2-arsenofenilazo))-1,8-dihidroksinaftaleno-3,6-disulfoninė rūgštis.



Tyrimo objektas: Kraujo serumas.

Reagentai:

1. Arsenazo III reagentas;
2. Ca^{2+} standartinis tirpalas, koncentracija 2,5 mmol/l.

Prietaisai: Spektrofotometras, bangos ilgis 650 nm

	Tiriamasis tirpalas	Standartinis tirpalas	Kalibravimo tirpalas
Ca standartinis tirpalas	–	15 μl	–
Mėginys	15 μl	–	–
Arsenazo III reagentas	1 ml	1 ml	1 ml

Darbo eiga:

1. Tyrimui reikalingos 3 kiuvetės. Į pirmą (tiriamąją) kiuvetę įpilama 15 μl kraujo serumo, į antrą (kontrolinę) – 15 μl standartinio tirpalo. Trečioji kiuvetė yra palyginamoji.
2. Į visas tris kiuvetes pilama po 1 ml Arsenalo III reagento. Kiuvečių turinys sumaišomas ir laikomas 2 min. kambario temperatūroje.
3. Tirpalų šviesos sugertis (A) matuojama spektrofotometru, kai bangos ilgis yra 650 nm. Matavimus atlikti 1 val. laikotarpyje.
4. Kalcio koncentracija apskaičiuojama pagal formulę:

$$C(\text{Ca}^{2+}) = \frac{A_{\text{pav. v. d. žio}}}{A_{\text{standarto}}} \times 2,5 \text{ (mmol/l)}$$

KLAUSIMAI SAVIRUOŠAI

Medžiagų apykaitos reguliavimas. Hormonai.

1. Paaiškinkite kas yra: a) hormonai, b) hormonoidai. Kaip jie veikia?
2. Hormonų klasifikacija pagal cheminę sandarą.
3. Pavaizduokite baltyminės prigimties hormonų veikimo mechanizmo schemą.
4. Pavaizduokite steroidinių ir skydliaukės hormonų veikimo mechanizmo schemą.
5. Išvardinkite hormonų veikimo antrinius tarpininkus.
6. Schematiškai pavaizduokite neuroendokrininės sistemos hierarchiją.
7. Pavaizduokite prostaglandinų, tromboksanų ir prostaciklinų sintezės schemą ir apibūdinkite jų biologinį vaidmenį.
8. Kokie biocheminiai pokyčiai atsiranda organizme trūkstant šių hormonų:
a) insulino, b) vazopresino, c) tiroksino?
9. Kalcio ir fosforo apykaitą reguliuojantys hormonai; jų biologinis poveikis.

9. ŠLAPIMO TYRIMAS

Šlapimas gaminamas inkstuose. Vidutiniškai per parą išskiriama 1-2 litrai šlapimo, tačiau esant dideliame vandens trūkumui, jo kiekis gali būti mažesnis nei 200 ml. Ištirpusių šlapime medžiagų (tirpinio) kiekis paros šlapime yra nuo 26 g iki 70 g.

Šlapimo kiekio, pH ir sudėties pokyčių ribos yra plačios. Šie dydžiai labiausiai priklauso nuo maisto sudėties, tarp jų nuo vandens bei elektrolitų kiekio. Įvairių galutinių apykaitos produktų sudėtis ir koncentracija gali kisti per parą, todėl šlapimo tyrimas atliekamas surinkus paros šlapimą. Normaliosios sudėtinės šlapimo dalys nurodytos lentelėje.

Lentelė. Šlapimo dalys

Komponentai	Sudėtinės dalys
Vanduo	
Neorganiniai junginiai	Elektrolitai Mikroelementai
Organiniai junginiai	Azotinės medžiagos (karbamidas, šlapimo rūgštis, kreatininas, indolai (triptofano metabolitai), porfirinai, aminorūgštys Organinės rūgštys Hormonai Vitaminai Fermentai

Nustatant ligos diagnozę šlapime ieškoma medžiagų, kurios normaliai būna šlapime arba atsiranda, sergant tam tikromis ligomis.

9.1. ŠLAPIMO PATOLOGINIŲ SUDEDAMŲJŲ DALIŲ NUSTATYMAS

Kiekinei analizei imamas per parą surinktas šlapimas. Vertinamas kiekis, spalva, skaidrumas, pH, lyginamasis svoris. Nustatomos patologiją rodančios šlapimo sudedamosios dalys: baltymai, gliukozė, kraujo ir tulžies pigmentai, acetoninės medžiagos ir kt. Šių medžiagų normaliaame šlapime yra tiek mažai, kad įprastinėmis reakcijomis jų aptikti nepavyksta.

Darbo eiga:

1. Reakcija su nitrato rūgštimi:

Į mėgintuvėlį įpilama 0,5 ml koncentruoto HNO_3 tirpalo ir 0,5 ml šlapimo. Jei šlapime yra baltymo, dviejų skysčių sąlyčio vietoje susidaro balti žiedai.

2. Felingio reakcija:

Į mėgintuvėlį įpilama 1 ml šlapimo ir po 0,5 ml Felingio I ir Felingio II reagentų. Sumaišoma ir kaitinama. Jei šlapime yra gliukozės, susidaro oranžinės spalvos nuosėdos.

3. Langės reakcija:

Į mėgintuvėlį įlašinama 10 lašų šlapimo, 2 lašai koncentruotos CH_3COOH tirpalo, 2 lašai naujai paruošto 5% natrio nitroprusido tirpalo ir sumaišoma. Palenkus mėgintuvėlį 45° kampui, atsargiai sienoje įpilamas toks pats tūris koncentruoto amonio hidroksido tirpalo. Skysčių sąlyčio vietoje susidaro violetinis žiedas, kurio intensyvumas ir susidarymo laikas priklauso nuo acetoninių medžiagų kiekio.

Darbo rezultatai ir išvados surašomi į lentelę:

Tiriamos medžiagos	Reakcija su HNO_3	Felingio reakcija	Langės reakcija
Baltymai		-	-
Gliukozė	-		-
Acetoninės medžiagos	-	-	

9.2. ŠLAPIMO TYRIMAS ANALIZATORIUMI „CLINITEK-100“

Klinikoje kraujo, šlapimo ir kt. biocheminiams tyrimams naudojami įvairūs automatiniai analizatoriai, kuriais greitai nustatoma pakankamai daug biocheminių rodiklių. Pavyzdžiui, analizatoriumi CLINITEK-100 per 1 minutę šlapime nustatoma 10 žymenų.

Darbo rezultatai ir išvados:

1. Santykinis svoris (1,01-1,02).
2. pH (4,6-8,0).
3. Baltymai.
4. Gliukozė.
5. Acetoninės medžiagos.
6. Bilirubinas.
7. Kraujas.
8. Nitratai.

9. Urobilinogenas.

10. Leukocitai.

Literatūra

1. Praškevičius A., Ivanovienė L., Stasiūnienė N ir kt. Biochemija. Bendrasis vadovėlis. KMU leidykla, Kaunas, 2003.
2. Burneckienė J., Rodovičius H., Vieželienė D., Kašauskas A. Biochemijos laboratoriniai darbai. Mokomoji knyga. KMU leidykla, Kaunas, 2005.
3. Praškevičius A., Rodovičius H., Ivanovienė L. ir kt. Baltymų ir kitų azotinių medžiagų apykaitos patologijos biochemija. Universiteto vadovėlis. KMU leidykla, Kaunas, 2008.
4. Praškevičius A., Ivanovienė L., Gailys R. ir kt. Homeostazės reguliacijos ir jos sutrikimų biochemija. Bendrasis vadovėlis. KMU leidykla, Kaunas, 2009.
5. Kadziauskas. Biochemijos pagrindai. Bendrasis vadovėlis. VU leidykla, Vilnius, 2012.
4. Praškevičius A., Ivanovienė L., Gailys R. ir kt. Dažniausiai vartojamų biomedicinos terminų ir sąvokų aiškinamasis žinynas (medikams). Vadovėlis. LSMU Leidybos namai, Kaunas, 2014.
5. Devlin T.M. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. John Wiley and Sons, N.J., 2011.

Priedas.

Laboratorinio darbo aprašas

1. Data

2. Darbo pavadinimas

3. Darbo tikslas

4. Darbo principas

5. Tyrimo objektas, reagentai, pagrindinės darbo priemonės

6. Darbo rezultatai ir skaičiavimai

7. Išvados