

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Оренбургский государственный университет»

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РЫБЫ И РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ

Практикум

Рекомендовано ученым советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный университет» для обучающихся по образовательной программе высшего образования по направлению подготовки 35.03.08 Водные биоресурсы и аквакультура

Оренбург
2021

УДК 639.3(075.8)

ББК 47.2я73

Л12

Рецензент – доктор биологических наук, профессор А.Н. Русанов

Авторы: С.В. Лебедев, В.В. Гречкина, Е.П. Мирошникова, Ю.В.

Килякова, А.Е. Аринжанов

Л12 **Лабораторные методы исследования рыбы и рыбных продуктов :**
практикум / С.В. Лебедев, В.В. Гречкина, Е.П. Мирошникова, Ю.В.
Килякова, А.Е. Аринжанов ; Оренбургский гос. ун-т – Оренбург :
ОГУ, 2021. – 125 с.
ISBN 978-5-7410-2556-7

В практикуме рассмотрены современные научные и лабораторные достижения в области исследования рыбы и рыбных продуктах.

Учебное издание предназначено для обучающихся по направлению подготовки 35.03.08 Водные биоресурсы и аквакультура.

УДК 639.3(075.8)

ББК 47.2я73

ISBN 978-5-7410-2556-7

© Лебедев С.В.,
Гречкина В.В.,
Мирошникова Е.П.,
Килякова Ю.В.,
Аринжанов А.Е., 2021
© ОГУ, 2021

Содержание

| | |
|--|-----|
| Введение..... | 4 |
| 1 Тяжёлые металлы в рыбе и рыбных продуктах..... | 5 |
| 2 Витамины как фактор развития рыбы..... | 11 |
| 3 Генетические исследования рыбы..... | 27 |
| Лабораторная работа №1 Лабораторное оборудование для измерения гематологических показателей крови у рыб..... | 38 |
| Лабораторная работа №2 Клиническое значение измерения газов и электролитов в крови..... | 48 |
| Лабораторная работа №3 Биохимия крови рыб..... | 55 |
| Лабораторная работа №4 Определение микроэлементов в сыворотке крови рыбы атомно-абсорбционным методом..... | 68 |
| Лабораторная работа №5 Методика определения хрома в жабрах рыб атомно-абсорбционным методом анализа..... | 72 |
| Лабораторная работа №6 Экспресс-методы определения тяжёлых металлов в рыбе..... | 77 |
| Лабораторная работа №7 Определение витаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии..... | 79 |
| Лабораторная работа №8 Методика определения витамина А в рыбе и рыбных продуктах..... | 98 |
| Лабораторная работа №9 Оценка метода масс-спектрометрического скрининга в образцах рыбы..... | 105 |
| Лабораторная работа №10 Генетический анализ образца рыбы..... | 113 |
| Список использованной литературы..... | 122 |

Введение

Всемирная Организация Здравоохранения рекомендует регулярное потребление рыбы в качестве меры профилактики многих болезней. Рыба считается важным компонентом рациона человека, так как она является богатым источником необходимых питательных веществ. Мясо рыбы - хороший источник легкоусвояемого белка, содержащего незаменимые аминокислоты с очень полезным составом, которые способствуют оптимальному использованию белка. Мясо рыбы также содержит незаменимые ненасыщенные жирные кислоты, включая длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты из семейства омега-3, такие как ЭПК и ДГК. Эти кислоты оказывают большое положительное влияние на здоровье человека, в том числе на профилактику сердечно-сосудистых заболеваний и гипертонии. Они также снижают смертность пациентов при ишемической болезни сердца и оказывают антиатеросклеротическое действие [2].

Рыба является источником минеральных элементов, таких как кальций, фосфор и магний [3]. Микроэлементы Zn, Cu и Se также можно найти в тканях рыб. Zn, Cu и Se - это микроэлементы, необходимые для функционирования организма. Поэтому рыбы должна быть включена в рацион питания человека. Рыба признана неотъемлемым компонентом сбалансированной диеты, обеспечивая здоровый источник энергии, высококачественных белков, витаминов и широкого спектра других важных питательных веществ.

В отличие от потенциальной пользы для здоровья, химические загрязнители, содержащиеся в рыбных продуктах, стали предметом озабоченности, особенно для частых потребителей рыбы.

1 Тяжёлые металлы в рыбе и рыбных продуктах

Загрязнение тяжелыми металлами является всемирно признанной опасностью для здоровья населения, поскольку эти загрязнители широко распространены в окружающей среде, включая морские экосистемы, как из природных, так и из антропогенных источников. Как следствие, они могут накапливаться морскими организмами в результате воздействия металлов, присутствующих в воде и донных отложениях или в пищевой цепи. Таким образом, биота является основным путем воздействия этих элементов на общую популяцию. Некоторые из этих элементов, такие как ртуть, мышьяк, кадмий, свинец и олово, не играют никакой известной роли в биологических системах. Они являются естественными микроэлементами водной среды, но их уровень возрос из-за промышленной, сельскохозяйственной и горнодобывающей деятельности. Даже низкие концентрации металлов могут угрожать здоровью водных и наземных организмов, включая человека.

Основная роль Zn основана на его функции как неотъемлемой части металлоферментов и как адъюванта для контроля активности специфических Zn-зависимых ферментов [7] (рисунок 1). Однако, высокие входы Zn по отношению к Cu может вызвать дефицит Cu [8].



Рисунок 1 – Цинк

Cu является важным микроэлементом, который участвует в некоторых механизмах, необходимых для функционирования человеческого организма (рисунок 2). Cu является кофактором ферментов, участвующих в метаболизме глюкозы и производстве гемоглобина. Cu не токсична для человека в низких концентрациях [9], хотя это может быть вредно для клеточных мембран, ДНК и белков, когда накапливается в избытке [10].

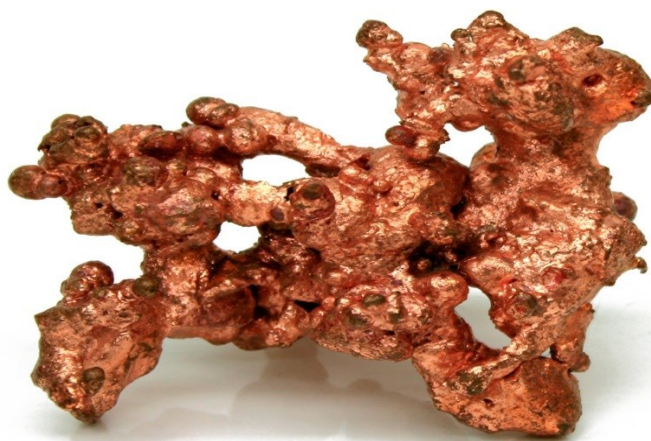


Рисунок 2 – Медь

Se - это элемент с питательной ценностью (рисунок 3). Se может предотвратить заболевания, связанные с повреждением свободными радикалами, включая инфекционные и сердечно-сосудистые заболевания, а также рак. В низких концентрациях Se имеет решающее значение для клеточной функции и синтеза нескольких селенопротеинов с антиоксидантными свойствами. С другой стороны, чрезмерное потребление Se может привести к селенозу. Se поступает в пищевую цепь из окружающей среды через растения и животных, и почти весь Se, необходимый для синтеза селенопротеинов у человека, поступает с пищей. Поскольку существует очень небольшая разница между дозой, необходимой для правильной функции организма, и токсической дозой, необходимо знать содержание Se в пищевых

продуктах. Se также является эффективным средством для детоксикации ртути (Hg) и защиты от токсичности Hg, в то время как селенопротеины отвечают за снижение токсического действия Hg. Se жизненно важен, и было доказано, что дефицит селена поражает многих жителей различных регионов, в том числе и Оренбургскую область [14].



Рисунок 3 – Селен

Исследование Rayman et al. [11] показали, что ежедневное потребление 300 мкг Se в течение пяти лет в стране с умеренно низким селеновым статусом увеличило смертность от всех причин десять лет спустя, пока дозы 100 и 200 мкг Se/сут. приводили к незначительному снижению смертности в течение периода вмешательства, который исчез после прекращения лечения. Анализ почв сельскохозяйственных угодий в этом регионе характеризуется естественным содержанием тяжелых металлов, которое составляет 0 %, в то время как 8 % этих почв имеют незначительно повышенное содержание тяжелых металлов, то есть I. Всего 0,5 % сельскохозяйственных угодий основания представлены уровнями II-VI содержания тяжелых металлов (загрязнение окружающей среды). Кроме того, в регионе есть более низкие, чем средние скорости атмосферного осаждения тяжелых металлов. Регион

специализируется на производстве высококачественных продуктов питания, что связано с традиционно сильными позициями сельского хозяйства в этом районе.

Zn, Cu и Se - источником этих элементов путем оценки их содержания в съедобных тканях и расчета потребления элементов - 150 г - порция сырой, копченой и маринованной рыбы.

Антропогенная деятельность вносит в морскую среду большое количество загрязняющих веществ, приводя к значительным и постоянным нарушениям этих загрязняющих веществ в морских биологических системах. Это особенно актуально для прибрежных зон, поскольку они считаются основными поглотителями почти всех вносимых загрязняющих веществ, металлы в морской среде являются экотоксикологически значимыми, поскольку они обладают высокой стойкостью и токсичны даже в виде следов. Загрязняющие вещества, такие как тяжелые металлы, естественным образом попадают в окружающую среду. Очень важно уметь отличать антропогенное загрязнение от фонового или естественного уровня, чтобы точно оценить степень загрязнения в той или иной местности.

Сегодня очень распространено использование морских организмов в качестве биоиндикаторов загрязнения тяжелыми металлами в ничтожных количествах. Водоросли, моллюски и рыбы относятся к числу организмов, наиболее часто используемых для этого. Мониторинг качества окружающей среды использует биологические виды для оценки биологически доступных уровней загрязняющих веществ в экосистеме и их воздействия на живые организмы. Таким образом, применение биомониторов исключает необходимость проведения комплексных исследований по химическому видообразованию водных загрязняющих веществ [1-2].

Черное море считается одним из самых загрязненных морей в мире, так как это закрытое море и с бескислородными водами (ниже 180 м). Fe, Zn, Cu и Mg являются существенными элементами и играют виртуальную роль в

биологических системах. Такие несущественные металлы, как Cr, Pb, Ni и Cd, токсичны даже в ничтожных количествах. Основные металлы также могут оказывать токсическое воздействие, когда потребление металла чрезмерно повышено [6]. Согласно Европейскому Союзу, только три металла (Pb, Hg и Cd) были включены в правила для опасных элементов [7]. Кроме того, USFDA расширяет этот список еще тремя элементами (As, Ni и Cr) [8].

Хотя потребление рыбы имеет потенциальную пользу для здоровья, наличие металлического загрязнения в морепродуктах вызывает озабоченность общественного здравоохранения.

Высокие концентрации ртути были обнаружены в некоторых хищных видах (голубая акула, кошачья акула, меч-рыба и тунец), хотя они были ниже нормативных максимальных уровней (рисунок 4).



Рисунок 4 – Голубая акула, кошачья акула, меч-рыба, тунец

В случае кадмия двустворчатые моллюски, такие как консервированные моллюски и мидии, имели более высокие концентрации, чем рыба, но почти ни один из анализируемых образцов не превышал максимальных уровней.

Содержание олова в консервированных продуктах было намного ниже максимального нормативного предела, что указывало на отсутствие значительного переноса олова из банки. Концентрация мышьяка была выше в ракообразных, таких как свежие и замороженные креветки. Проведенная оценка риска была показана многими авторами, что рыба и моллюски безопасны для среднего потребителя, хотя потенциальный риск нельзя сбрасывать со счетов для постоянных или чрезмерных потребителей определенных видов рыб, таких как тунец, рыба-меч, голубая акула и кошачья акула (для ртути) и обыкновенная камбала (для свинца).

В результате человеческие популяции с традиционно повышенным потреблением пищи имеют самый высокий потенциальный риск воздействия металлов и подвергаются повышенному риску развития нейротоксических эффектов. Это особенно важный вопрос для детей, беременных женщин и кормящих матерей.

По данным ФАО [1] и ФАО-ФИШСТАТА [2], более 40 % потребляемой рыбы поступает из сельского хозяйства. Многие исследования сосредоточены на важности рыбы как источника белка, но также обсуждают ее важность как ценного источника незаменимых длинноцепочечных жирных кислот, жирорастворимых витаминов и пигментов [3]. Кроме того, преимущества потребления рыбы для уязвимых групп населения также хорошо известны, и в связи с этими фактами растет интерес к новым видам рыб аквакультуры для нашей страны. Кроме того, рыбья кожа является ценным побочным продуктом и в настоящее время используется в качестве компонента в корм для животных и рыб.

2 Витамины как фактор развития рыбы

Рыбоводство практиковалось в различных частях мира, особенно в Восточной Азии, Китае, Европе, Канаде, Африке и развивающихся странах, таких как Нигерия [11]. Это было на практике со времен древней цивилизации Египта и Китая. Рыболовный сектор остается важным источником продовольствия, питания, доходов и средств к существованию для сотен миллионов людей во всем мире [2].

При уделении большего внимания питательной ценности продовольственных товаров рыба признается основным источником богатой питательными веществами животной пищи для значительной части уязвимых в питательном отношении людей, затмевая собой большинство наземных животных продуктов питания (рисунок 5).



Рисунок 5 – Рыба – ценный продукт питания

В последнее десятилетие из 30 стран, в которых рыба обеспечивает более трети общего объема поставок животного белка, 22 страны с низким уровнем дохода и дефицитом продовольствия (LIFDCs). Кроме того, помимо животного белка, рыба содержит уникальные длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (ЛС-ПНЖК) и высоко биодоступные незаменимые микроэлементы, витамины D и B, а также минеральные вещества (кальций, фосфор, йод, цинк, железо и селен). Эти соединения, часто недоступные в других частях рациона, оказывают благотворное влияние на здоровье взрослых и когнитивное развитие детей [4].

Вклад рыбохозяйственной деятельности в национальную экономику многогранен. Помимо поставок продовольствия, рыбный сектор вносит свой вклад в валовой внутренний продукт (ВВП), обеспечивает средства к существованию рыбаков и переработчиков, является источником твердой валюты и увеличивает государственные доходы за счет соглашений в рыболовстве и налогов [15].

В 2014 году мировое потребление рыбы на душу населения достигло рекордного уровня-20 кг [21]. Это впечатляющее развитие было обусловлено сочетанием роста населения, роста доходов и урбанизации. Этому способствовало активное расширение производства рыбы и более эффективные каналы сбыта. Хотя ежегодное потребление рыбы на душу населения неуклонно растет в развивающихся регионах (с 5,2 кг в 1961 году до 18,8 кг в 2013 году) и в странах с низким уровнем дохода и дефицитом продовольствия (с 3,5 до 7,6 кг), оно все еще значительно ниже, чем в более развитых регионах. Китай лидирует среди развитых стран по производству рыбы, особенно из аквакультуры, с очевидным потреблением рыбы на душу населения около 35,1 кг в год в 2010 году. В то время как ежегодное предложение рыбы на душу населения в остальном мире в 2010 году составляло около 15,4 кг. В развивающихся странах потребление рыбы, как правило, основано на местных и сезонных доступных продуктах, а поставки

являются движущей силой рыбной цепочки. Однако потребители в странах с формирующейся рыночной экономикой, подпитываемые ростом внутреннего дохода и богатства, испытывают на себе диверсификацию имеющихся видов рыбы в связи с увеличением импорта рыбной продукции.

Аквакультура все еще развивается в Африке и в основном сосредоточена в нескольких странах, но уже производит оценочную стоимость почти в 3 миллиарда долларов США в год. Добавленная стоимость сектора в целом за последнее десятилетие оценивалась более чем в 24 миллиарда долларов США, что составляет 1,26 % ВВП всех африканских стран. Несмотря на то, что промышленность находится в зачаточном состоянии, континент прилагает все усилия для того, чтобы использовать этот сектор в борьбе с нищетой. В соответствии с этим исследования показали, что в рыболовном секторе в целом занято 12,3 миллиона человек в качестве рыбаков на полную ставку или переработчиков на полную ставку и неполный рабочий день, что составляет 2,1 % населения Африки в возрасте от 15 до 64 лет. Расширяя то, что показывает эта цифра, на страновом уровне Нигерия занимает первое место с почти 2 миллионами человек, занятых в секторе рыболовства и аквакультуры, за ней следуют Марокко (почти 1,4 миллиона) и Уганда (почти 1 миллион) [15].

Было бы разумно провести различие между этими двумя водными экосистемами промысла, морскими и внутренними экосистемами, поскольку они влияют на виды рыб, на которых ведется охота. По оценкам, внутренний промысел Африки приносит около 2,1 миллиона тонн рыбы в год. На его долю приходится 24 % всего мирового производства рыбы из внутренних водоемов [6]. В Эфиопии рыба поступает исключительно из внутренних водоемов, включая озера, реки, ручьи, водохранилища и значительные водно-болотные угодья, которые имеют большое социально-экономическое, экологическое и научное значение [7-9]. Рыбный промысел был основным источником белкового питания для многих эфиопов, особенно для тех, кто проживает в

непосредственной близости от крупных водных объектов, таких как озеро Тана, Зивей, Авасса, Чамо и река Баро [5]

Общий потенциальный выход рыбы в эфиопских водоемах оценивается в среднем в 94.500 тонн в год [9]. Водные объекты, расположенные в Рифтовой долине, демонстрируют признаки чрезмерной эксплуатации, в то время как те, что расположены в отдаленных районах с плохой инфраструктурой, которые составляют большинство, остаются недоиспользуемыми [8, 22]. Таким образом, существующая роль рыбного хозяйства в общей экономике страны незначительна, поскольку рыбохозяйственный сектор в стране значительно ниже своего потенциала [10]. Текущая добыча все еще значительно ниже расчетного потенциального выхода, что говорит о возможности дальнейшего расширения промысла.

Поскольку наличие достаточного количества пресноводных водоемов может косвенно свидетельствовать о наличии рыбы, Гамбелла обладает несколькими внутренними водными ресурсами, включая реки, озера, водохранилища, пруды и огромные пойменные площади, но вносит гораздо меньший вклад в национальное производство и сбыт рыбы. Из литературы следует, что Гамбелла - это регион с самыми разнообразными видами рыб в его водоемах, но редко сообщается о его производстве и сбыте рыбы. Поэтому данный обзор проводится с целью оценки основных факторов, которые могут способствовать низкому производству рыбы и тому, как ориентирован рыбный рынок в регионе.

Дефицит витамина D является глобальной проблемой и связан с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, аутоиммунных заболеваний, диабета 1 типа, остеопороза и, вероятно, различных видов рака. Несмотря на то, что витамин D синтезируется в коже при воздействии УФ-излучения, поддерживать адекватный статус витамина D в зимний период не представляется возможным. Степень, в которой потребление рыбы может способствовать диетическому статусу или биомаркерам поглощения

питательных веществ, отсутствует. Влияние потребления рыбы на статус витамина D систематически не изучалось (рисунок 6).



Рисунок 6 – Витамин D в продуктах питания

Рыба рекомендуется как часть здорового питания [8] и считается ключевым компонентом кардиозащитной диеты [9]. Кроме того, рыба является важным источником различных питательных веществ, таких как белок, n-3 жирные кислоты, витамин D, йод и селен [10], которые могут способствовать более здоровому метаболическому профилю [23].

Недавний метаанализ из Ирана выявил обратную связь между потреблением рыбы и риском развития всех причин и общей сердечно-сосудистой смертности [13]. Однако для этой ассоциации были выявлены региональные различия, в то время как более высокое потребление рыбы было связано с более высоким риском смертности от всех причин и сердечно-сосудистых заболеваний в западных странах, но не у азиатов. Эти результаты

могут свидетельствовать о том, что типы потребляемых рыб/видов, методы приготовления рыбы и потенциальные местные загрязнители должны рассматриваться в дополнение к другим возможным путаницам, таким как обычные пищевые продукты, потребляемые вместе с рыбой.

Было высказано предположение, что потребление жирной рыбы снижает риск ССЗ, что в основном связано с ее высоким содержанием n-3 жирных кислот [26]. Благоприятное влияние потребления рыбы (в целом) на ССЗ были выявлены в течение последних десятилетий [14-16], и несколько исследований предлагали обратную связь между потреблением рыбы и сердечной недостаточностью [17], цереброваскулярными заболеваниями [18], атеросклерозом [19], ишемическом инсульте [20], и внезапной коронарной смерти [21]. Другие исследования показывают, что потребление рыбы предотвращает или улучшает метаболическое здоровье и, таким образом, играет важную роль в профилактике Метс [22].

Ориентация на модифицируемые факторы риска Метс имеет большое значение для общественного здравоохранения. Любопытно, что все естественные формы витамина Е, а также синтетические все гас- α -токоферол, обладают относительно сходной антиоксидантной активностью, так почему же организм предпочитает α -токоферол в качестве своей формы витамина Е? Антиоксидантная функция витамина Е как поглотителя пероксильных радикалов, прекращающего цепные реакции, хорошо известна и хорошо описана различными химиками [18].

Существуют важные различия между различными формами витамина Е в отношении их антиоксидантной активности при измерении *in vitro* независимо от того, измеряются ли они в органическом растворе, таком как хлорбензол, или в детергентных липидах (чтобы имитировать биологические мембраны), порядок рангов токолов остается неизменным, и большая эффективность α -токоферола по сравнению с другими витаминами примерно постоянна. Удивительно, но это верно для разных химических систем, а также

для разных исследователей. Эти результаты обусловлены относительной донорской способностью Н-атомов различных токолей, эффективность которой возрастает при большем кольцевом метилзамещении. Однако по сравнению с их эффективностью в тесте фетальной резорбции крыс эти различия в антиоксидантной активности *in vitro* довольно незначительны. Различия в потенциале α -токоферола по сравнению с другими токолами *in vivo* обусловлены различием печени в пользу α -токоферола, а также преимущественным метаболизмом не- α -токоферольных форм.

Что не было установлено, так это то, следуют ли не- α -токоферолы тому же ранговому порядку антиоксидантной эффективности, когда они находятся в биологических мембранах. В реальных мембранах антиоксидантная сила будет включать донорскую способность Н-атома, расположение (проникновение) и движение внутри мембраны, а также эффективность рециркуляции токофероксильных радикалов цитозольными восстановителями, такими как аскорбат. Были предприняты попытки сравнить α -токоферол и α -токотриенол; в микросомальных мембранных системах был сделан вывод, что токотриенолы являются лучшими антиоксидантами [10], но в более химических системах они, как говорят, почти эквивалентны [5]. В самом последнем вкладе в эту литературу Мукай и др. [3] описывают α -токоферол как более эффективный, чем другие витамины, измеренный донорством Н-атома в арилокси-радикалы (ArO) в мицеллах, поддерживаемых Тритоном X-100. Важно отметить, что в этих мицеллах не- α -токоферолы вели себя гораздо хуже, чем их относительная антиоксидантная эффективность в органических растворителях, таких как этанол, эфир или бензол. Следует подчеркнуть, однако, что мицеллы Тритона не содержат окисляемого липида и, следовательно, могут быть плохими имитаторами мембран. Однако из этого исследования следует, что фундаментальное физическое органическое поведение будет способствовать использованию α -токоферола в качестве защитника липидов, даже не рассматривая эффективность переработки *in vivo*.

Кроме того, следует отметить, что полностью метилированное хроманольное кольцо α -токоферола предотвращает образование аддуктов в позициях, которые не метилируются в не- α -токоферолах. Например, образование 5-нитро- γ -токоферола было расценено как маркер пользы γ -токоферола продувая реактивные виды азота [9]. Например, Тафаз и др. [24] сообщили, что порядок аналогов витамина Е в катализе цитотоксичности гепатоцитов, перекисного окисления липидов и окисления GSH составлял δ -токоферол > γ -токоферол >> α -токоферол >>> ПМК. Таким образом, токсическая прооксидантная активность аналогов витамина Е была обратно пропорциональна их антиоксидантной активности. Предпочтение α -токоферола *in vivo* также может основываться на потенциальной "токсической" активности аналогов витамина Е. Действительно, лаборатория Корнуэлла доказала, что не- α -токоферолы генерируют цитотоксические аддукты [6].

Актуальность токолов, отличных от α -токоферола, была рассмотрена лишь недавно и в основном сосредоточена на γ -токофероле. Следовательно, использование не- α -токоферолов в качестве контроля кажущейся равной антиоксидантной силы в экспериментах с клеточной культурой может вводить в заблуждение, поскольку мы не ожидаем, что они должны быть такими же хорошими, как и в *in vitro* эксперименты. Например, если β -токоферол неэффективно перерабатывается в мембранах и поэтому теряется относительно быстро по сравнению с α -токоферолом и, таким образом, никогда не оказывает стойкого антиоксидантного эффекта, то можно ожидать, что β -токоферол не будет так же эффективен, как α -токоферол, в отношении ингибирования перекисного окисления липидов или в какой-либо возможной связанной с этим активности в качестве регулятора клеточной сигнализации. Лучшим тестируемым соединением, чем β -токоферол, Тролок или ПМК (как это было использовано несколькими группами для "доказательства" неокислительного поведения α -токоферола), было бы нечто, что больше

похоже на α -токоферол, но не способно к донорству Н-атома или одного электрона [13]. Лучшим кандидатом является 6-хлорзамещенный хроман, такой как 2,5,7,8-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил) - 6-хлорохроман, описанный Донченко и др. [16]. Таким образом, хлорпроизводное могло бы продемонстрировать, возможна ли неокислительная функция в сигнале.

Чтобы еще больше усложнить исследование *in vitro* неокислительных функций α -токоферола, клеточные концентрации не часто измеряются. Когда различные токолы добавляются к клеткам в культуре, концентрации, обнаруживаемые в клетках, могут быть довольно переменными и не обязательно такими же, как то, что добавляется в культуру [25], и могут варьироваться в зависимости от способности клетки метаболизировать различные токолы [8]. Таким образом, количество различных токолов, присутствующих в клетках *in vitro*, должно быть необходимым измерением для всех сигнальных экспериментов. В идеале, концентрация клеточного токола должна имитировать те, которые найдены в естественных условиях.

Важной постоянной проблемой в области безопасности пищевых продуктов является фальсификация с химическими загрязнителями. Одним из примеров этого является наличие остатков ветеринарных препаратов в продуктах питания животного происхождения. Согласно отчету Всемирного банка [1], к 2030 году во всем мире будет потребляться более 100 миллионов тонн морепродуктов, и более 60 % из них, как ожидается, будут выращиваться на фермах. Разумная практика аквакультуры будет иметь важное значение для поддержания этого продовольственного ресурса. Одним из возможных недостатков рыбоводства является потенциальное использование химиотерапевтических средств, таких как антибиотики, антигельминтики и противогрибковые препараты, для поддержания здоровой популяции животных, обитающих в условиях высокой плотности окружающей среды. Хотя некоторые ветеринарные препараты были одобрены в различных странах для использования в аквакультуре [2], использование неутвержденных

лекарств остается проблемой. Одной из основных проблем, связанных с использованием антибиотиков для пищевых животных, включая аквакультуру, является потенциальная возможность повышения устойчивости к противомикробным препаратам. Другие химические вещества, используемые в рыбоводстве, такие как хлорамфеникол или трифенилметановые красители, используемые в качестве противогрибковых агентов, также имеют потенциальное неблагоприятное воздействие на здоровье человека и запрещены для использования в пищевых животных. Тем не менее, остатки этих соединений и других остатков ветеринарных препаратов постоянно обнаруживаются в рыбе и моллюсках [3]. Мониторинг этих остатков в продуктах аквакультуры имеет решающее значение для минимизации воздействия непреднамеренных ветеринарных препаратов на человека в этом важном продовольственном товаре.

Традиционно аналитические методы, разработанные для мониторинга остатков лекарственных средств в аквакультуре, были специфичны для ограниченного набора целевых соединений. В последнее время эти методы используют жидкостную хроматографию в сочетании с тандемной масс – спектрометрией с использованием тройного квадрупольного масс-анализатора, запрограммированного на получение данных для выбранных ионных переходов, соответствующих интересующим анализатам [6-8]. Хотя этот метод может быть очень чувствительным и избирательным, он требует предварительного отбора анализируемых веществ до получения данных и поэтому может пропустить другие соединения, которые могут присутствовать в рыбе.

Современная тенденция в мониторинге ветеринарных препаратов и других загрязняющих веществ в пищевых продуктах заключается в использовании масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS). С помощью HRMS потенциально неограниченное количество соединений может быть проанализировано одновременно, поскольку собираются данные полного

сканирования, а не заранее выбранные ионные переходы, соответствующие конкретным соединениям. Селективность и чувствительность, необходимые для обнаружения и идентификации низких уровней аналитов в сложных пищевых матрицах, достигаются за счет использования возможностей HRMS для обеспечения очень точных измерений массы. Эта способность создает методы, которые могут обнаруживать широкий спектр остатков и загрязняющих веществ, позволяя регулирующим органам более активно выявлять возможные фальсификации пищевых продуктов, включая аквакультурную рыбу и моллюсков [9-12].

Витамин Е является общим термином для всех природных токоферолов и токотриенола, а также их производных (рисунок 7). Этот жирорастворимый витамин был открыт и назван Эвансом в 1920-х годах. Поскольку его гидроксильная часть на углероде может быть легко окислена, витамин Е обладает сильной восстанавливаемостью, которая защищает важные вещества от окисления *in vivo* и играет важную роль в поддержании нормальных метаболических процессов и физиологических функций в организме.

Витамин Е необходим для защиты клеточной мембраны от повреждения перекисью, поддержания иммунитета и повышения сопротивляемости болезням, в то время как он тесно связан с эмбриональным развитием, метаболизмом нуклеиновых кислот, биосинтезом аскорбиновой кислоты, а также поддержанием качества тканей [5]. Витамин Е стал одним из важнейших витаминов в разведении водных животных. Большое количество исследований показало, что дефицит витамина Е ухудшает продуктивность водных животных, в том числе снижает прибавку в весе, коэффициент полезного действия белка, а также кормовой коэффициент [10].



Рисунок 7 – Витамин Е в продуктах питания

Канальный сом хорошо известен своим мясом, которое является вкусным с высоким содержанием аминокислот (рисунок 8). Эта рыба стала одной из самых экономически важных рыб в Китае.

Канальные сомы требуют относительно высокого уровня витамина Е и его дефицит значительно тормозит рост рыб. Кишечник является основным органом для поглощения энергии и питания для поддержания выживания, роста и размножения рыб. Хотя в нескольких исследованиях изучалось влияние витамина Е на увеличение веса, концентрацию аскорбата в тканях, а также стрессовые реакции (18-20 %), в немногих исследованиях изучалось влияние витамина Е на структуру и функцию кишечника.



Рисунок 8 – Канальный сом

Хорошо известно, что кишечник играет важную роль в качестве места переваривания и всасывания питательных веществ, а пищеварительная функция коррелирует с развитием кишечного тракта. Масса и длина кишечника, отражающие развитие кишечника, значительно увеличены в ответ на высокое содержание витамина Е. Кроме того, различия в длине и весе кишечника между видами рыб, по-видимому, связаны с их привычками питания. Витамин Е в определенном диапазоне доз способствует развитию кишечника. Водные животные имеют относительно простую структуру слизистой оболочки. Вместо кишечной ворсинки, как у наземных животных, кишечная складка непосредственно отражает пищеварительную и абсорбционную способность рыб.

Способность пищеварения связана с активностью пищеварительных ферментов, на которые влияет прием пищи. Прием витамина Е в определенном диапазоне доз значительно улучшает функцию кишечника. Кроме того, витамин Е оказывает стимулирующее действие на активность ферментов пищеварения в гепатопанкреасе сома. Как сообщалось ранее,

секреция ферментов тесно связана с развитием гепатопанкреаса. Диетическое добавление витамина Е также способствует развитию гепатопанкреаса.

Благодаря высокому содержанию белка рыба является одним из самых скоропортящихся продуктов питания, который легко портится, если его неправильно сохранить, особенно в тропическом и субтропическом климате [17]. Рыба все еще может подвергаться целому ряду порч, даже если используются традиционные методы консервирования [18]. Рыбу, как и другие коммерческие товары, необходимо перевозить с посадочных площадок в места, где она может быть продана или использована потребителями. Из-за своей скоропортящейся природы рыба нуждается в очень тщательном уходе, чтобы сохранить качество и избежать порчи. В основном переживает традиционный этап в обработке рыбы и методах ее консервирования. Пойманная рыба немедленно вывозится с территории отеля и доставляется на рынок традиционными транспортными средствами без каких-либо консервационных установок для сохранения ее свежей.

Витамины – это органические соединения, которые должны быть получены из рациона, либо потому, что организм не имеет ферментов, необходимых для их синтеза, либо потому, что он не может производить их в достаточном количестве. Человек не может синтезировать витамины А, В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), В₅ (пантотеновая кислота), В₆ (пиридоксин), В₇ (биотин), В₉ (фолиевая кислота), В₁₂ (кобаламин), Е и К, но способен синтезировать некоторые витамины В₃ (ниацин) и D. Последний витамин, необходимый человеку, витамин С (аскорбиновая кислота), является частным случаем в том, что это органическое соединение синтезируется подавляющим большинством позвоночных и беспозвоночных видов [2-5].

Интересно, что орган позвоночных, используемый для синтеза витамина С, дважды менялся от почки к печени в ходе эволюции, один раз у птиц и один раз у млекопитающих. В то время как витамин С вырабатывается почками рыб, амфибий, рептилий и более старых отрядов птиц, он вырабатывается

печенью и млекопитающих [6]. Этот переход на более крупный орган у более активных видов был интерпретирован как результат селективного давления для поддержания биохимического гомеостаза в более стрессовых условиях [7]. Об этом свидетельствует тот факт, что рекомендуемая суточная норма потребления витамина С человеком (60 мг) является самой высокой среди всех витаминов [8, 9].

Витамин С – это водорастворимое соединение с антиоксидантными свойствами, которое защищает живые организмы от окислительного стресса (рисунок 9). Он также необходим для синтеза коллагена, поэтому недостаточное количество этого витамина приводит к цинге [10-11]. Среди других его функций - синтез карнитина, нейромедиаторов и катаболизм тирозина [1, 12, 13].



Рисунок 9 – Витамин С в продуктах питания

Дрожжи, растения и животные используют различные пути синтеза витамина С. Дрожжи синтезируют D-эритроаскорбат из D-арабинозы, тогда

как растения синтезируют витамин С из GDP-D-маннозы, а животные синтезируют витамин С из UDP-D-глюкуроната [14-17]. Анализ показывает путь биосинтеза витамина С у животных, начиная с D-глюкозы-1-Р.

3 Генетические исследования рыбы

У многих видов морских рыб, особенно мигрирующих, сигнал о дифференциации популяции слаб и трудно обнаруживается из-за высокого уровня потока генов. Традиционно трудно очертить структуру популяции или обнаружить подразделение популяции, не имеющее четких барьеров для потока генов в пределах океанических бассейнов [7]. Особенно у рыб недавнего видообразования эта проблема усложнилась из-за небольшого накопления генетической дифференцировки за такой короткий промежуток времени [20]. Однако прогресс популяционно-генетических исследований значительно улучшил методы в выяснении популяционно-генетической структуры морских рыб высокой подвижности и высокого потенциала рассеивания на стадии яйца и личинки [23]. Рыбохозяйственные исследования, электронные и микрохимические методы мечения дают непосредственную информацию при анализе динамики численности некоторых морских рыб. Тем не менее генетические подходы могут предложить уникальные стратегии управления запасами и сохранения эволюционных единиц [4-5], оказавшись особенно важными для экономически важных морских видов рыб, сталкивающихся с высоким промысловым давлением или уже находящихся под угрозой исчезновения.

В последние годы все большее число исследований выявило низкую, но статистически значимую дифференциацию популяций многих морских рыб с использованием микросателлитов - высоко варибельного и предположительно нейтрального генетического маркера [6-11]. Митохондриальная ДНК (мтДНК), еще одна маркерная система, также использовалась для обнаружения расхождения популяций, вызванного исторической изоляцией некоторых морских рыб, во многих других исследованиях [11-13]. Даже у некоторых морских рыб с низкой или вообще отсутствующей дифференцировкой наблюдалось выраженное генетическое

структурирование с использованием направленно выбранных маркеров. Однако из-за различных способов наследования и эволюции результаты, основанные на различных типах маркеров, могут дать различную информацию для управления рыболовством и его сохранения. Гипервариабельные микросателлиты считаются более мощными в выявлении последних эволюционных процессов, но не пригодными для филогеографического изучения [15]. И наоборот, мтДНК с медленной частотой мутаций более чувствительна к обнаружению филогеографической структуры и исторического эволюционного процесса из-за своего нерекомбинантного и смещенного по полу наследования. Однако дифференциация популяций, выявленная направленными выделенными маркерами, отражает локальную адаптацию к различным средам обитания, хотя эволюционный механизм этого маркера довольно сложен и далек от понимания. Было высказано предположение, что эта дифференциация может быть результатом влияния естественного отбора на эффект случайного дрейфа в сочетании с гомогенизирующим эффектом потока генов [17]. Поэтому изучение адаптивной генетической дивергенции в пространственном и временном масштабе у морских видов имеет решающее значение для улучшения нашего понимания эволюционного процесса [19].

Эти три типа маркеров имеют различные эволюционные механизмы и могут давать различные результаты, поэтому к ним следует относиться с осторожностью при интерпретации результатов популяционного генетического анализа. Между тем, эти подходы в совокупности позволяют получить более точное и всестороннее представление об особенностях, динамике и эволюционных процессах морских видов рыб.

В некоторых исследованиях сообщалось о местном отборе некоторых морских рыб. Например, локус гемоглобина показал дифференцировку вдоль широтного Клайна атлантической трески (*Gadus morhua*) между Северным и Балтийским морями [20-21]. Европейская камбала (*Platichthys flesus*) была

сгруппирована по экологическому сходству с использованием локуса Hsc70 [22]. Pogson & Fevolden [23] предположили, что недавняя диверсификация отбора была отражена значительной дифференциацией между прибрежными и арктическими популяциями атлантической трески в Северной Норвегии в локусе *PanI*. Уайт и др. [4] также сообщили, что дифференциация между популяциями круглоногого гренадера (*Coryphaenoides rupestris*) в локусе *Crup7* была связана с глубиной, предполагая, что направленный отбор предположительно действовал на связанный локус. Несколько недавних исследований предположили, что направленно дифференцированные микроспутники могли образоваться в результате отбора, действующего на их связанные локусы, которые были связаны с такими факторами окружающей среды, как температура, соленость и глубина или давление воды [7]. Как утверждают Хеммер-Хансен и др. [22], адаптивная дивергенция может быть распространена у морских рыб.

Желтый горбыль *Larimichthys polyactis* (Bleeker) (рисунок 10) - важный рыбный вид, эндемичный для северо-западной части Тихого океана, обитающий в прибрежных водах Бохайского моря, Желтого моря и Восточно-Китайского моря [24].

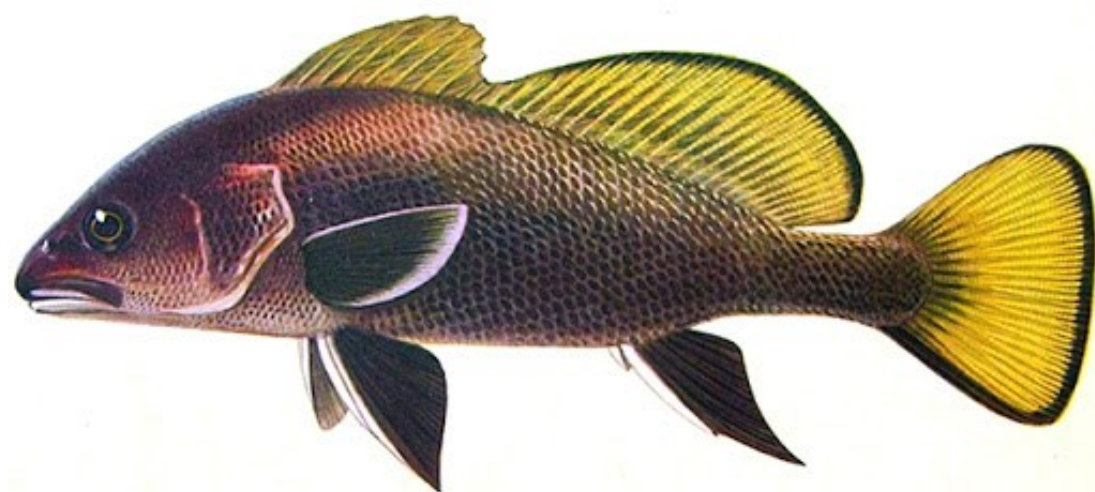


Рисунок 10 – Желтый горбыль

Являясь одним из важнейших промысловых видов в странах Северо - Восточной Азии с годовым выловом более 100 000 тонн, *L. polyactis* подвергается высокому промысловому давлению и в настоящее время приближается к чрезмерной эксплуатации. Эта рыба является итеропарозным видом и созревает в годовалом возрасте со средней продолжительностью жизни около 20 лет. Средний возраст этого вида составлял три года в 1960-е годы и постепенно снижался до одного года в настоящее время из-за высокого промыслового давления. Понимание структуры и динамики популяций крайне важно для сохранения и управления этим видом. Исследования, основанные на нерестовых миграционных путях и морфологической изменчивости, предположили, что три дикие группы соответствовали трем географически хорошо разделенным группам по местам нереста, Бохайского моря и северной части Желтого моря (БС-Нью-Йорк), в Центральной и южной части Желтого моря (СМУ-ОМУ) и Северной и центральной части Восточно-Китайского моря (НПВ-УИК), соответственно. Этот вид рыб мигрирует из своих зимующих скоплений на нерестилища в начале апреля и начинает нереститься с конца апреля в прибрежных водах НЕКСА до июня в прибрежных водах БС-Ниса с постепенным пространственным и временным изменением [3].

После нереста эта рыба питается в близлежащих прибрежных водах. С сентября по октябрь все рыбы мигрируют в свои места зимовки. Считалось, что этот вид мигрирует в натальные места для нереста [4]. Зимующие скопления являются примесями этих трех нерестовых групп, хотя они относительно изолированы. Соответственно, морфология и поведение нерестовых миграций для этих трех групп считались несовпадающими. Например, люди из разных групп варьировала в тело длины и в число мягких лучей спинного плавника; на нерестовой миграции этих групп начинались в разное время с НПВ-УИК группой, начиная первый и БС-Нью-Йорк на прошлой группы; оптимальная температура стирки для этих

групп также различны, с НПВ-УИК группой, имеющей самый высокий нереста температуру и БС-Нью-Йорк группу самой низкой [5]. После нереста *L. polyactis* будет кормиться в близлежащих водоемах. Несколько исследований генетической структуры *L. polyactis* в изученных нами районах дали противоречивые или даже противоречивые результаты. Хотя все исследования с использованием RAPD и AFLP [8] предполагали дифференциацию на три группы, разделение этих трех групп в каждом исследовании было различным. Исследование, основанное на митохондриальной контрольной области, не выявило значимой генетической структуры, что позволяет предположить панмиксию у *L. polyactis*. Такое несогласие в выводах о дивергенции и строении *L. polyactis* это в какой-то степени препятствовало управлению запасами и их сохранению. Учитывая низкое разрешение выборки в этих исследованиях (например, анализ АФЛП включал только четыре образца; исследование мтДНК было сосредоточено только на Желтом море) [9], необходимо более полное исследование, поскольку результаты предыдущих исследований недостаточны.

Методологии генетического тестирования. По мере того, как число генетических тестов быстро росло за последнее десятилетие, то же самое происходило и с различными типами используемых методик генетического тестирования. Тип используемого теста зависит от типа измеряемой аномалии. В общем, три категории генетического тестирования-цитогенетическое, биохимическое и молекулярное – доступны для обнаружения аномалий в структуре хромосом, функции белка и последовательности ДНК соответственно.

Цитогенетическое тестирование. Цитогенетика включает в себя исследование хромосом для выявления структурных аномалий. Хромосомы делящейся клетки человека могут быть четко проанализированы в белых кровяных клетках, особенно Т-лимфоцитах, которые легко собираются из крови. Клетки из других тканей, таких как костный мозг, околоплодные воды

и другие ткани, также могут быть культивированы для цитогенетического анализа. После нескольких дней культивирования хромосомы фиксируют, раскладывают на предметных стеклах микроскопа и окрашивают. Методы окрашивания для рутинного анализа позволяют идентифицировать каждую хромосому в отдельности. Отчетливые полосы каждой хромосомы, выявленная путем окрашивания, позволяет анализировать хромосомную структуру.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) – это процесс, который ярко окрашивает хромосомы или части хромосом флуоресцентными молекулами для идентификации хромосомных аномалий (например, вставок, делеций, транслокаций и амплификаций). FISH обычно используется для выявления специфических хромосомных делеций, связанных с детскими синдромами, такими как Синдром дигеорге (делеция части хромосомы 22, также называемой del22) и раковые заболевания, такие как хронический миелолейкоз (транслокация, включающая хромосомы 9 и 22).

Биохимическое тестирование. Клиническое тестирование на биохимическое заболевание использует методы, которые исследуют белок, а не ген. Многие биохимические генетические заболевания известны как «врожденные ошибки метаболизма», потому что они присутствуют при рождении и нарушают ключевой метаболический путь. В зависимости от заболевания могут быть разработаны тесты для непосредственного измерения активности белка (прямое измерение активности фермента), уровня метаболитов (косвенное измерение активности фермента) и размера или количества белка (структура белка). Эти тесты требуют образца ткани, в котором присутствует белок, обычно это кровь, моча, околоплодные воды или спинномозговая жидкость. Поскольку генные продукты могут быть более нестабильными, чем ДНК или РНК, и могут быстро разрушаться, образец должен быть собран, надлежащим образом сохранен и быстро отправлен в соответствии со спецификациями лаборатории.

Различные технологии, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография/масс-спектрометрия (ГХ/МС) и тандемная масс-спектрометрия (МС/МС), позволяют как качественно обнаруживать, так и количественно определять метаболиты. Кроме того, в биотестах могут использоваться методы флуориметрической, радиоизотопной или тонкослойной хроматографии.

Молекулярное тестирование. Прямой анализ ДНК применим, когда известна последовательность генов, представляющих интерес. Для маленьких мутаций ДНК, прямое тестирование ДНК, как правило, является наиболее эффективным методом, особенно если функция белка неизвестна и биохимический тест не может быть разработан. Тест ДНК может быть выполнен на любом образце ткани и требует очень небольшого количества образца. Для проведения тестирования можно использовать несколько различных молекулярных технологий, включая прямое секвенирование, анализы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизацию.

ПЦР – это распространенная процедура, используемая для амплификации целевых сегментов ДНК с помощью повторные циклы денатурации (термоиндуцированное разделение двухцепочечной ДНК), отжига (связывание специфических праймеров целевого сегмента с родительской цепью ДНК) и удлинения (расширение последовательностей праймеров с образованием новой копии целевой последовательности). Затем усиленный продукт может быть дополнительно протестирован. При некоторых генетических заболеваниях в одном и том же гене может происходить множество различных мутаций, что затрудняет молекулярное тестирование. Однако, если большинство случаев конкретного генетического заболевания вызвано несколькими мутациями, то эта группа мутаций сначала тестируется перед тем, как проводится более полное тестирование, такое как секвенирование.

Сравнительная геномная гибридизация (CGH) или хромосомный микрочиповый анализ (СМА) – это молекулярно-цитогенетический метод анализа выигрышей или потерь в ДНК, которые не обнаруживаются при обычном хромосомном анализе. Метод основан на соотношении флуоресцентно меченой ДНК пациента и нормальной референтной ДНК. CGH может обнаруживать небольшие делеции и дупликации, но не структурные хромосомные изменения, такие как сбалансированные реципрокные транслокации или инверсии или изменения числа хромосомных копий.

Анализ микрочипов ДНК, также называемый анализом генов, геномов или ДНК-чипов, является инструментом для определения экспрессии генов. Молекулы мРНК связываются или гибридизуются, в частности, с шаблоном ДНК, как правило, с геном или частью гена, из которого он произошел. Когда массив содержит много шаблонов ДНК, уровень экспрессии сотен до тысяч генов из отдельного образца пациента может быть измерен с помощью компьютера, чтобы обнаружить количество мРНК, связанной с каждым сайтом в массиве.

Анализ микрочастиц белка используется для количественного определения количества белка, присутствующего в биологических образцах. Подобно анализу микрочипов хромосом и ДНК, гибридизация меченых целевых белков в образце пациента измеряется по сравнению с эталонным образцом. Также называемый биомаркером, наличие, отсутствие, увеличение или уменьшение определенного белка может быть индикатором заболевания у человека. Например, анализ спинномозговой жидкости пациента на наличие амилоидных бета-или тау-белков может быть использован для диагностики болезни Альцгеймера.

Кариотипирование – это выделение, окрашивание и визуальное исследование хромосом с целью выявления хромосомных перестроек. Кариотипирование используется в пренатальной диагностике (в частности амниоцентез для трисомия), исследование повторяют не вынашиванием

беременности, обследование детей и взрослых с особенностями наводит на мысль о синдроме (стенокардия, инфаркт, ишемическая характеристики или другие, связанные аномалиями, задержкой психического развития, обучаемости или поведенческих аномалий), и выделение подтипов лимфом, лейкозов и солидных опухолей с целью уточнения диагноза, лечения и прогноза стратификации.

Клетки культивируют из образцов крови, костного мозга, околоплодных вод, тканей или опухолей в стерильных условиях в течение 4-7 дней, в зависимости от типа клеток. Для кариотипирования хромосомы должны быть изолированы от клеток в метафазе, которая является стадией клеточного цикла, на которой хромосомы принимают свою характерную конденсированную, дискретную форму. Различные химические агенты могут быть добавлены к культивируемым клеткам, чтобы синхронизировать их клеточные циклы и сделать возможным довести максимальное количество до предсказуемой метафазы. Затем клетки набухают путем добавления гипотонического раствора для диспергирования хромосом, которые фиксируются химически, исследуются микроскопически и затем окрашиваются. Стандартное G-бандажирование (Giemsa, Leishman'S или вариант) производит паттерн бандаж, характерный для отдельных хромосом и позволяющий идентифицировать аномалии в количестве и морфологии (делеция, добавление, транслокация больших сегментов ДНК) хромосом.

Цитогенетический анализ с помощью G-полосок не может разрешить структурные аномалии, которые невелики (лучшее разрешение составляет около 2000-3000 килобаз),³ внутри G-отрицательных полос или включают транслокации между областями, имеющими сходные паттерны окрашивания. Разрешение также зависит от исходной ячейки. Разрешение от лимфоцитов крови лучше, чем от фибробластов, выращенных из околоплодных вод, и оба, как правило, лучше, чем клетки из опухолей.

Разрешение очень малых делеций (микроделеций) и малых транслокаций возможно при флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Этот метод использует короткие последовательности одноцепочечной ДНК (зонды), несущие флуоресцентные метки, для обнаружения хромосомной ДНК с комплементарной последовательностью. Ген-специфические зонды, также известные как “локус-специфические”, связываются с отдельными участками хромосомы, будь то ген или повторяющаяся последовательность, такая как центромера или теломера. Такие локус-специфичные зонды могут обнаруживать аномальную дупликацию гена или хромосома. Использование 2 различных геноспецифических зондов может обнаруживать транслокации, слишком малые для обнаружения нормальным кариотипированием, например, когда генетический материал из онкогена с *-abl* на хромосоме 9 вставляется в ген *BCR* на хромосоме 22, как это происходит при хроническом миелолейкозе. Целые хромосомные зонды представляют собой смеси более мелких, специфичных для хромосом зондов, которые позволяют каждой хромосоме быть “окрашенной” в другой цвет. Окраска хромосом не обнаруживает транслокаций внутри хромосом и не позволяет точно идентифицировать точки останова. В настоящее время разрабатываются различные расширения этой техники, такие как спектральная окантовка, которая создает многоцветный узор окантовки.

Потенциал рыб для обнаружения гораздо меньших хромосомных аномалий, чем можно обнаружить при кариотипировании, уже упоминался. Рыба не требует, чтобы клетки находились в метафазе перед анализом, потому что она полагается на наличие или отсутствие флуоресцентного сигнала для идентификации хромосом или частей хромосом, а не на определенный узор связывания. Это позволяет осуществлять наблюдение за большим количеством клеток и требует гораздо меньшего объема выборки, чем кариотипирование – даже до одной клетки (рисунок 11).



Рисунок 11 – Новообразования у рыбы

Все чаще этот метод переходит из исследовательской лаборатории в рутинное использование, особенно когда образцы находятся в ограниченном количестве (например, для пренатальной диагностики) (рисунок 12).

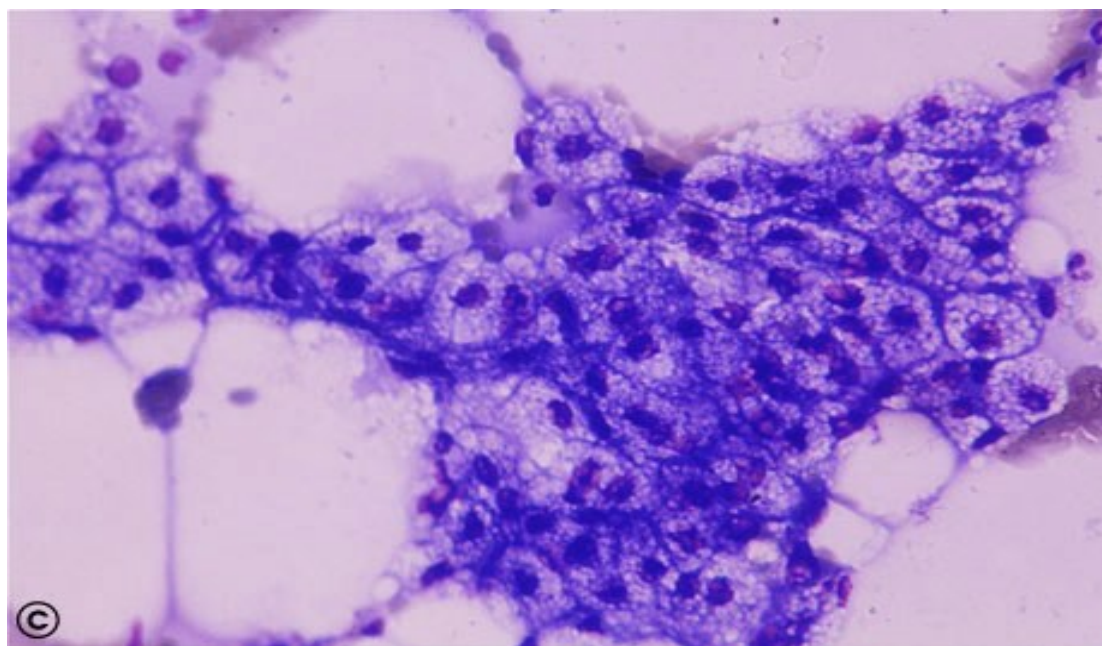


Рисунок 12 – Онкология крови рыб

Лабораторная работа №1

Лабораторное оборудование для измерения гематологических показателей крови у рыб

Цель работы: определение основных гематологических показателей у здоровой и больной рыбы.

Оборудование и материалы: аналитический анализатор URIT-2900 Vet Plus, кровь рыбы, вакуумные пробирки, штатив для пробирок.

Задания:

1. Изучить основные гематологические показатели крови рыб.
2. Ознакомиться с принципом работы гематологических анализаторов.

Ход работы.

Гематологический анализатор URIT-2900 Vet Plus – это автоматический гематологический анализатор является количественным счётчиком форменных элементов крови с дифференциацией лейкоцитов для диагностического использования в лабораториях (рисунок 13).



Рисунок 13 – Автоматический гематологический анализатор URIT-2900 Vet Plus

Гематологические анализаторы – это лабораторное оборудование, предназначенное для анализа крови. Данное оборудование отличается надежностью, удобством, длительностью срока службы. Для анализа достаточно всего капли крови. Анализатор значительно экономит время оператора, а также снижает процент ошибки.

Анализируемые параметры: эритроциты, гемоглобин, гематокрит, тромбоциты, средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, анизоцитоз эритроцитов, анизоцитоз тромбоцитов, средний объем тромбоцитов, тромбоциты, гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов (таблица 1).

Таблица 1 – Основные показатели красных клеток крови

| Показатель | Единицы измерения | Метод определения |
|---|-------------------|--|
| HGB (Hemoglobin) – концентрация гемоглобина | г/л | Фотометрический |
| RBC (Red Blood Cells) – эритроциты | $10^{12}/л$ | Кондуктометрический |
| MCV (Mean Cell Volume) – средний объем эритроцитов | фл | Кондуктометрический |
| HCT (Hematocrit) – гематокрит | % | $HCT = RBC \times MCV / 10$ |
| MCH (Mean Cell Hemoglobin) – среднее содержание гемоглобина в эритроците | пг | $MCH = HGB / RBC$ |
| MCHC (Mean Cell Hemoglobin Concentration) – средняя концентрация гемоглобина в эритроците | г/дл | $MCHC = HGB \times 10 / HCT[\%]$ |
| RDW (Red cell Distribution Width) – ширина распределения эритроцитов по объемам. Характеризует степень анизоцитоза эритроцитов. | % | Кондуктометрический: $RDW = SDRBC \times 100 / MCV$ |

MCH можно пересчитать в значения цветового показателя: ЦП = $MCH/33,4$ (рисунок 14).

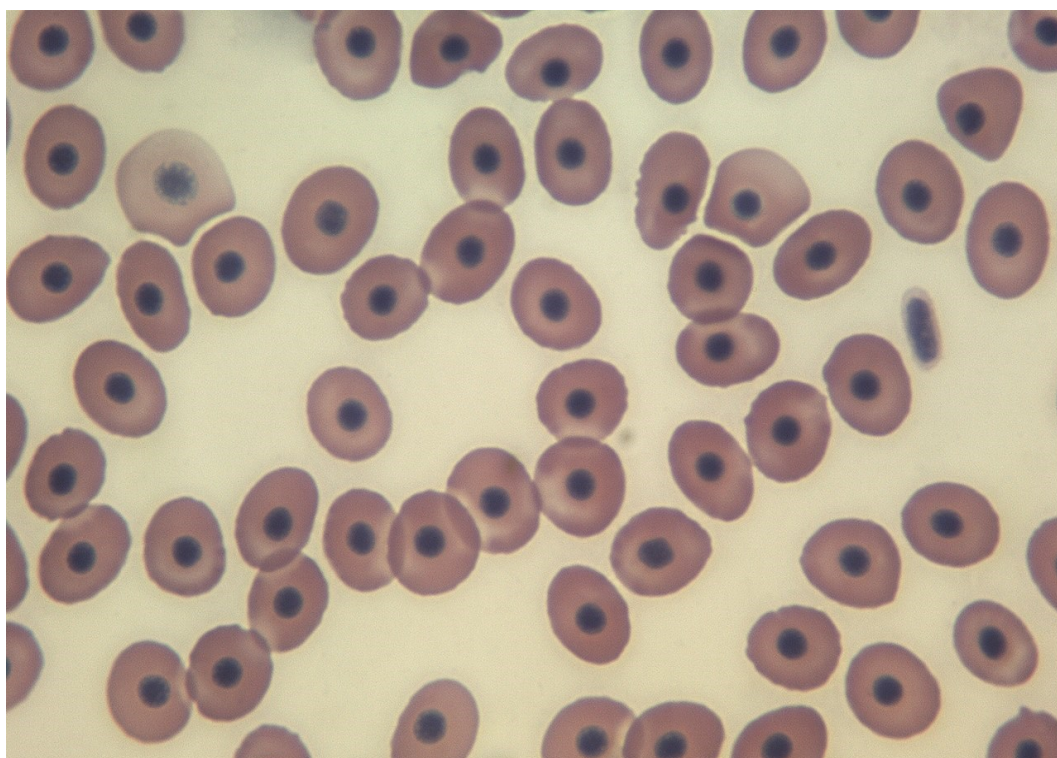


Рисунок 14 – Красные клетки крови рыб

Эритроцитарные индексы связаны между собой соотношением: $MCH = MCHC \times MCV/100$. А так как $MCHC$ очень стабильный показатель и его среднее значение в правильно откалиброванном анализаторе примерно равняется 34 %, то приблизительно: $MCH = 34 \times MCV/100$, а $ЦП = MCV/100$ (таблица 2).

Таблица 2 – Основные показатели белых клеток крови и тромбоцитов

| Показатель | Единицы измерения | Метод определения |
|---|-------------------|---------------------|
| WBC (White Blood Cells) – лейкоциты | $10^9/л$ | Кондуктометрический |
| В анализаторах с частичной дифференцировкой лейкоцитов определяются следующие показатели (относительные и абсолютные количества): | | Кондуктометрический |
| LYM (LY) – лимфоциты | %, $10^9/л$ | |
| MID (MON) – средние клетки (в них входят моноциты и частично эозинофилы и базофилы) | %, $10^9/л$ | |

| Показатель | Единицы измерения | Метод определения |
|--|--------------------|-----------------------------------|
| GRA (GRAN) – гранулоциты | %, $10^9/\text{л}$ | |
| PLT (Platelets) – тромбоциты | $10^9/\text{л}$ | Кондуктометрический |
| MPV (Mean Platelet Volume) – средний объем тромбоцитов | фл | Кондуктометрический |
| P-LCR (Large Platelet Ratio) – относительное количество крупных тромбоцитов (> 12 фл) | % | Кондуктометрический/ расчетный |
| PDW (Platelet Distribution Width) – ширина распределения тромбоцитов по объемам. ×) | % | Кондуктометрический |
| PCT (Platelet Grit) – тромбокрит ×) | % | Расчетный |

Данный аппарат является полностью автоматической системой, отличающийся компактностью:

- 18 анализируемых параметров + 3 гистограммы, дифференциация лейкоцитов на 3 субпопуляции (рисунок 15).

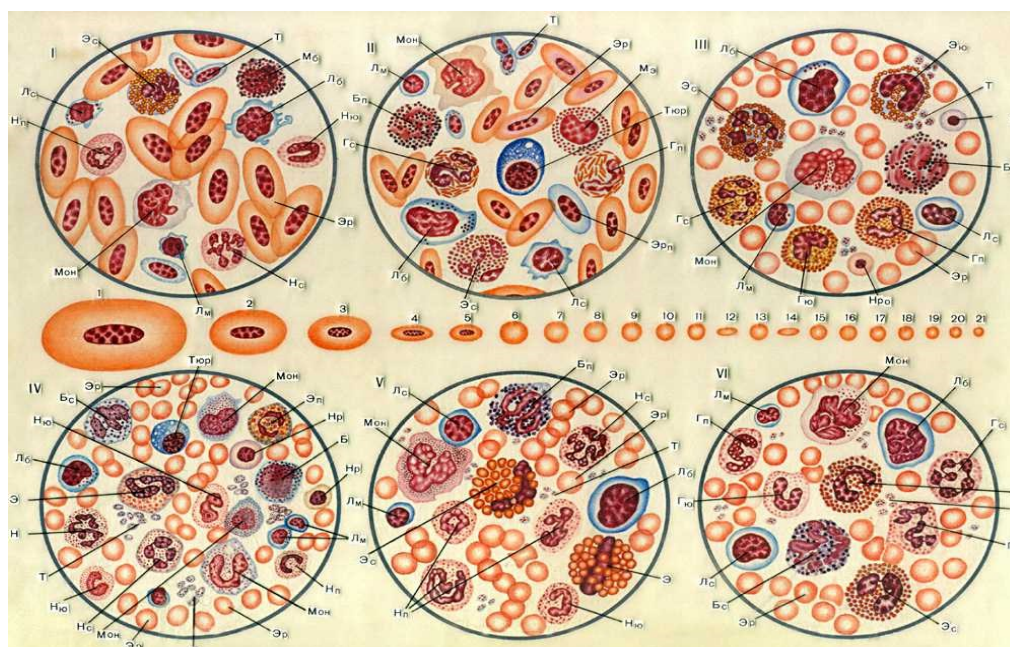


Рисунок 15 – Анализируемые параметры в крови

- производительность: 60 тестов в час;

- возможность хранения до 20.000 результатов тестов, включая гистограммы;
- автоматическое разведение образца, внесение реагентов, смешивание, прочистка засорений;
- автоматическая очистка пробоотборника;
- автоматический контроль остаточного объема реагентов;
- встроенный термопринтер, возможность подключения внешнего принтера;
- цветной ЖК дисплей высокого разрешения;
- интерфейс на русском языке.

При взятии крови отловленную рыбу следует обернуть стерильной салфеткой, место пункции обработать антисептиком. Размер иглы подбирают в зависимости от размера рыбы (рисунок 16).



Рисунок 16 – Подготовка к взятию крови у рыб

После того как проколота кожа и игла вошла в мышцы, следует потянуть поршень шприца для создания разрежения в нем. Удерживая шприц таким образом, необходимо медленно продвигать иглу по направлению к

позвоночнику рыбы. При попадании иглы в вену в канюле шприца появится кровь (рисунок 17). После пункции вены следует взять необходимое количество крови, затем иглу извлечь, место пункции обработать антисептиком, рыбу отпустить.



Рисунок 17 – Взятие крови у рыб

При взятии крови из культи хвоста срезают спинной и анальный плавники, удаляют чешую, слизь, протирают кожу спиртом, затем отсекают хвостовой стебель по медиальной линии позади анального плавника и собирают кровь в стерильную посуду (рисунок 18).

Все рыбы должны быть подсчитаны и взвешены, чтобы контролировать скорость роста в конце испытания кормления. Параметры, характеризующие ростовые показатели рыб в каждой группе, включая средний прирост массы, среднесуточный прирост, кормовой коэффициент и коэффициент белковой эффективности, рассчитывались по стандартным протоколам. Формулы следующие: i) средний прирост массы тела (г/рыба) = средний конечный вес

(г) - средний начальный вес (г); ii) средний суточный прирост (г / рыба / день) = средний прирост массы тела (г/рыба)/продолжительность эксперимента (дней); iii) коэффициент белковой эффективности = прирост влажного веса (г)/потребление белка (г); iv) коэффициент кормления (%) = сухой корм (г)/прирост влажного веса (г); и v) выживаемость (%) = (конечное количество рыб/начальное количество рыб) × 100 %.



Рисунок 18 – Взятие крови из хвостовой вены у рыб

Анализ пищеварительного фермента в гепатопанкреасе и кишечнике. После регистрации измерений тела из каждой группы отбирают по 45 рыб. Гепатопанкреас и кишечник рыбы удаляют, замораживают в жидком азоте и затем консервируют при температуре -80°C для дальнейшего анализа. Для анализа пищеварительных ферментов образцы тканей гомогенизируют в ледяном физиологическом растворе, а супернатант удерживают после центрифугирования при $3200 \times g$ в течение 20 мин. Активность липазы оценивают с помощью фенолфталеинового индикатора, а

активность протеазы определяют методом Фолин-фенольного реагента. Кроме того, для оценки активности ПСР используют набор для анализа щелочной фосфатазы (АКФ), а активность Na⁺/K⁺-АТФазы оценивают с помощью набора для анализа Na⁺/K⁺-АТФазы.

Производительность кишечника. Еще 45 рыб, собранных из каждой группы, вскрывают и извлекают кишечник. Регистрируют вес и длину кишечника рыб из каждой группы. Кроме того, индекс массы кишечника и индекс длины кишечника рассчитывают следующим образом: i) индекс массы кишечника (%) = [средняя масса кишечника (г)/средняя конечная масса тела (г)] × 100%; и ii) Индекс длины кишечника (%) = [средняя длина кишечника (см)/средняя конечная длина тела (см)] × 100 %.

Гистологический анализ. После регистрации измерений тела из каждой группы отбирают еще 20 рыб и отбирают 0,5 см каждого сегмента кишечника на охлажденной разделочной доске и разрезают на 5 мкм срезы с помощью микротомы Leica RM2128 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия). Часть срезов из каждого сегмента кишечника окрашивают гематоксилином и эозином (H&E) и наблюдают под микроскопом Olympus BH-2 (Olympus, Токио, Япония). Высоту кишечных складок и толщину слизистой оболочки оценивают путем анализа более десяти различных видов каждого образца сегмента кишечника с использованием программного обеспечения Spot (версия 4.0.6; Диагностические приборы, Стерлинг-Хайтс, Мичиган, США).

Другая часть срезов ткани используется для иммуногистохимического анализа с целью выявления распределения и экспрессии соматостатина. После трехкратной промывки PBS срезы регидратируют и инкубируют в 3 % H₂O₂ в течение 10 минут. Затем срезы инкубируют с первичным антителом кролика против соматостатина (BA0124; Wuhan Boster Biological Technology, Ltd, Wuhan, Hubei, China) в разведении 1:100 при 4°C в течение 17 ч с последующей инкубацией с конъюгированным биотином вторичным антителом козы против кролика (BA1003; Wuhan Boster Biological Technology,

Ltd, Wuhan, Hubei, China). Наконец, срезы окрашивают с помощью набора Стрептавидин-Биотиновой пероксидазы (Wuhan Boster Biological Technology, Ltd, Ухань, Хубэй, Китай) и визуализируют с использованием диаминобензида в качестве хромогена. Срезы, инкубированные с ПБС вместо первичного антитела, рассматриваются как отрицательный контроль. Срезы наблюдаются, а изображения снимаются с помощью цифровой камеры (Moticam 2500, Motic, Гонконг, Китай), прикрепленной к микроскопу Nikon (Nikon Eclipse 50i, Nikon, Токио, Япония) (рисунок 19).

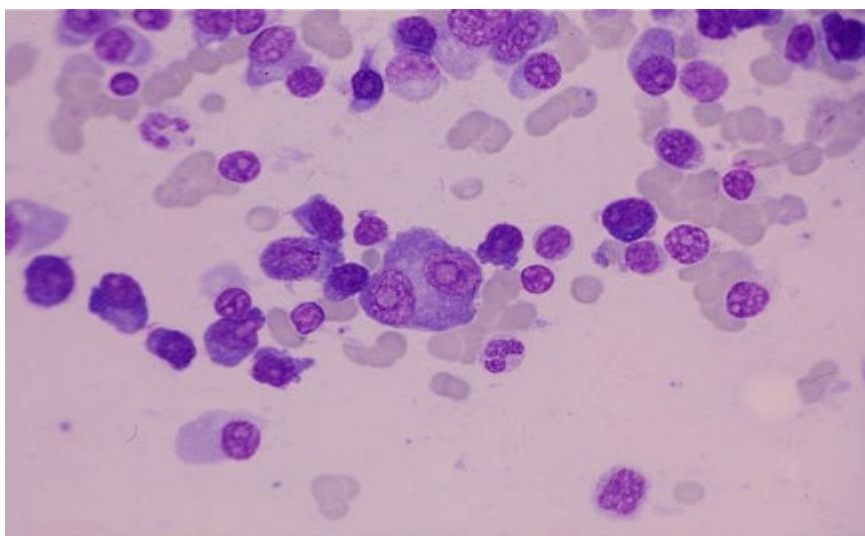


Рисунок 19 – Анализ клеток крови на микроскопе

Экспрессию соматостатина среди групп оценивают путем определения количества соматостатин-позитивных клеток.

Вопросы для самопроверки:

1. Принцип работы гематологического анализатора?
2. Методика взятия крови у рыбы?
3. Какое количество параметров определяет гематологический анализатор?

4. Какие пробирки и антикоагулянт используют для взятия крови у рыбы?

Лабораторная работа №2

Клиническое значение измерения газов и электролитов в крови

Цель работы: изучить изменения газов и электролитов в крови рыбы.

Оборудование и материалы: анализатор Osmetech OPTI CCA, цельная кровь рыбы, вакуумные пробирки, штатив для пробирок, рН-метр рН-150 МИ.

Задания:

1. Ознакомиться с методиками анализа сыворотки крови на анализаторе Osmetech OPTI CCA.
2. Изучить основные этапы работы с рН-метром.

Ход работы.

Анализатор Osmetech OPTI CCA – предназначен для измерения рН, PCO_2 , PO_2 , Na, K, Ca, C1, Glu, tHb и SO_2 в образцах цельной крови и рН, Na, K, Ca, C1 и Glu в сыворотке и плазме, а также цельной крови (рисунок 20).



Рисунок 20 – Анализатор Osmetech OPTI CCA

pH. Показатель pH крови, сыворотки или плазмы может быть единственным наиболее важным фактором в оценке кислотно–щелочного состояния животного. pH отображает баланс между буфером (кровь), почечной и дыхательной системой.

pH является одним из наиболее трудно регулируемым параметром организма. Причины ненормального показателя pH в основном классифицируются следующим образом:

- a) первичный недостаток гидрокарбоната – метаболический ацидоз;
- b) первичный избыток гидрокарбоната – метаболический алкалоз;
- c) первичная гиповентиляция – респираторный ацидоз;
- d) первичная гипервентиляция – респираторный алкалоз.

Увеличение pH крови, сыворотки или плазмы (алкалоз) может быть обусловлено увеличением гидрокарбонатов плазмы; или могут быть признаки респираторного алкалоза, связанного с увеличением выведения CO_2 из-за гипервентиляции. Снижение показателя pH (ацидемия) крови, сыворотки или плазмы может быть обусловлено увеличением органических кислот, повышенным выделением ионов H^+ в большинстве почечных расстройств; увеличенное потребление кислот при таких состояниях, как отравление салицилатами или потеря щелочных растворов в организме. Респираторный ацидоз является результатом снижения альвеолярной вентиляции и может быть острым вследствие отёка лёгких и обструкции воздухопроводящих путей; или хроническим вследствие обструктивных или рестриктивных заболеваний. Определить pH крови можно на приборе pH-метр (рисунок 21).

PO_2 . Показатель артериальной крови PO_2 используется для оценки способности организма абсорбировать кислород в лёгких. Величины PO_2 ниже нормальных (артериальная гипоксемия) обычно возникают вследствие лёгочных, кровеносных или дыхательных нарушений (например, обструкция бронхов, сосудистые нарушения, снижение сердечного выброса, повышенное потребление кислорода, анатомический порок сердца, низкое содержание

кислорода). В основном, уровни O_2 выше 100 мм рт. ст. не вносят значительный вклад в изменение содержания кислорода; с нормальным содержанием гемоглобина 80-100 мм рт. ст. PO_2 обеспечивает 97 % уровня насыщения, а уровень больше 100 % не может быть достигнут.



Рисунок 21 – рН-метр рН-150 МИ, ООО "Измерительная техника"

Натрий. Натрий является главным катионом внутриклеточной жидкости. Его основные функции в организме поддерживать осмотическое давление, кислотно–щелочной баланс и передавать нервные импульсы. Функции натрия в мембранах клеток обеспечивать передачу нервных импульсов и нейромышечной возбудимости вследствие создания электрического потенциала между различными мембранами клеток. Натрий участвует в некоторых ферментативных реакциях в роли кофактора. Организм обладает сильным свойством сохранять общее содержание солей, и даже незначительные смещения этого показателя можно обнаружить при патологических состояниях.

Низкие величины натрия (гипонатриемия) скорее отражают избыток жидкости в организме, чем низкое содержание натрия. Низкие уровни натрия можно связать: с низким потреблением натрия; с потерями натрия из-за рвоты или диареи с достаточным возмещением воды и недостаточным возмещением соли; диуретическими расстройствами или нефропатией с потерей соли; осмотическим диурезом, метаболическим ацидозом; увеличенным содержанием натрия в почках при гиперальдостеронизме, синдромом Кушинга; недостаточным поступлением воды из-за комы или болезней гипоталамуса; дегидратацией; или избыточной терапией солями.

Показатель натрия может использоваться в диагностике и мониторинге всех нарушений водного баланса, инфузионной терапии, рвотных состояний, диареи, изжоги, сердечной и почечной недостаточности, центрального и почечного диабета, эндокринных нарушений, эндокринных расстройств и первичных или вторичных расстройствах мозгового вещества надпочечников; или других заболеваний, связанных с дисбалансом электролитов.

Калий. Калий является главным катионом межклеточной жидкости и выполняет функцию основного буфера вне клетки. 90 % калия содержится вне клетки и повреждённые клетки выбрасывают калий в кровь. Калий играет важную роль в нервной проводимости, функций мышц и помогает поддерживать кислотно-щелочной баланс и осмотическое давление.

Повышенный уровень калия (*гиперкалиемия*) может быть при олигурии, анемии, мочевой обструкции, почечных нарушениях при воспалении почки или шока, метаболическом или респираторном ацидозе, почечном ацидозе канальцев из-за обмена K^+/H^+ и гемолизе крови. Низкие уровни калия (*гипокалиемия*) могут быть при избыточной потере калия из-за диареи или рвотных состояниях, недостаточном поступлении калия, синдроме мальабсорбции, сильной изжоге и увеличенном выделении альдостерона. Высокий или низкий уровни калия могут влиять на мышечную раздражимость, дыхательную функцию и функцию миокарда. Показатель

калия может использоваться для мониторинга электролитного дисбаланса в диагностике и лечении шока, сердечной или циркуляторной недостаточности, кислотно-щелочного состояния, всех видов почечных заболеваний, диареи, гипер- и гипофункции коркового вещества надпочечников и других заболеваний, вовлекающих нарушение обмена электролитов (рисунок 22).



Рисунок 22 – Анализ электролитов крови рыб

Ионизированный кальций. Кальций крови представлен в виде свободных ионов кальция (50 %); в виде кальция, связанного с белками (преимущественно с альбумином-40 %); и 10 % связаны с анионами такими как, гидрокарбонат, цитрат, фосфат и лактат. Однако только ионизированный кальций может использоваться организмом в таких необходимых процессах, как мышечное сокращение, работа сердца, передача нервных импульсов и свёртывание крови. Osmetech OPTI SSA измеряет часть ионизированного кальция из общего количества. В некоторых болезнях, таких как панкреатит и

гиперпаратиреозит, ионизированный кальций играет роль более важную для диагноза, чем общий кальций.

Повышение кальция (**гиперкальциемия**) может присутствовать при различных видах злокачественных опухолей, и измерения кальция могут служить, как биохимические маркеры. В основном, ионизированный кальций может быть более чувствительным, но измерения ионизированного или общего кальция имеют равное значение в обнаружении скрытых злокачественных опухолей. Гиперкальциемия в основном происходит при критических состояниях пациентов с нарушениями кислотно-щелочной регуляции, потерей белка и альбумина, что даёт явное преимущество в мониторинговании состояния кальция при измерении ионизированного кальция.

Заболевания, возникших вследствие повреждения клубочковой зоны, часто происходит изменение концентрации кальция, фосфата, альбумина, магния и pH. Эти показатели имеют особенность изменяться, в то время как ионизированный кальций не зависит от общего кальция; следовательно, измерение ионизированного кальция является предпочтительным для более точного контроля состояния кальция при заболеваниях почек. Ионизированный кальций имеет важное значение для диагностики и мониторингования артериальной гипертензии, паратиреозидизма, почечных заболеваний, истощения, камней в почках, множественной миеломы и диабета.

Хлор. Хлор – это анион, который преимущественно находится в межклеточном пространстве. Он поддерживает клеточное постоянство благодаря своему влиянию на осмотическое давление. Хлор также имеет значение в мониторинговании водного и кислотно-основного состояния. В случае метаболического ацидоза, происходит возрастание концентрации хлора в то время, как концентрация гидрокарбоната падает.

Пониженные уровни хлора также наблюдаются при сильной рвоте и диарее, язвенном колите, обструкции пилорического отдела желудка, сильных изжогах, тепловом ударе, диабетическом ацидозе, Аддисоновой болезни, острых с повышением температуры состояниях, таких как пневмония.

Глюкоза. Глюкоза является основным источником энергии для организма. В частности, работа головного мозга и эритроцитов полностью зависит от глюкозы. Концентрация глюкозы в крови играет основную роль в метаболизме энергии, и её сохранение является жизненно необходимой. Концентрация глюкозы в крови определяется соотношением потребления глюкозы и её поступлением из продуктов питания или образованием внутри организма. Изменения соотношения может произойти либо при гипергликемии (повышенный уровень содержания глюкозы в крови), либо при гипогликемии (пониженный уровень содержания глюкозы в крови). Оба из этих состояния оказывают серьёзное влияние на здоровье и требуют лечения. Это объясняет, почему измерение глюкозы является одним из наиболее востребованных тестов в лабораториях. В дополнение при лечении больных гипергликемией животное склонно становиться гипогликемичным, в случае если за показателем глюкозы тщательно не следят.

Результаты исследования записать в тетрадь и сравнить с референтными величинами.

Вопросы для самопроверки:

1. рН крови рыбы на каком приборе определяют?
2. Принцип работы анализатора Osmetech OPTI SSA?
3. Хлор его роль для организма рыбы?
4. Гиперкальциемия, основные её проявления?

Лабораторная работа №3

Биохимия крови рыб

Цель работы: научиться выполнять биохимический анализ сыворотки крови рыбы.

Оборудование и материалы: вакуумные пробирки с активатором свёртывания, штатив для пробирок, центрифуга лабораторная IEC MicroCL 21, ThermoElectron LED GmbH, Германия, шейкер термостатируемый ST-3, ELMi, автоматический биохимический анализатор DIRUI CS-T240, ЗАО «ДИАКОН», полуавтоматический биохимический анализатор «Стат Факс», набор реагентов для биохимии.

Задания:

1. Изучить методику проведения биохимического анализа.
2. Сравнить результаты анализа на автоматическом и полуавтоматическом анализаторе.

Ход работы.

Методы получения сыворотки крови. Биохимический анализ крови – одно из самых распространенных исследований, с помощью которого можно оценить обмен веществ в организме и работу внутренних органов – почек, печени, поджелудочной железы и др. Как правило, во время этого анализа исследуется достаточно большое количество параметров (состояние клеток крови, биохимические, иммунологические, гормональные показатели).

Кроме того, биохимический анализ крови необходим для ранней диагностики заболеваний, так как позволяет выявить нарушения в работе внутренних органов, когда еще нет никаких внешних симптомов болезни.

Существуют определенные нормы биохимического анализа крови. Отклонение от этих показателей – симптом разнообразных нарушений в деятельности организма, сбоя в работе каких-либо органов или систем.

Биохимический анализ крови обычно включает определение следующих показателей: амилаза сыворотки, общий белок, билирубин, железо, калий, кальций, натрий, креатинин, КФК (креатинфосфокиназа), ЛДГ, (лактатдегидрогеназа), липаза, магний, мочевая кислота, натрий, холестерин, триглицериды, печеночные трансаминазы, фосфор. При превышении установленной нормы какого-либо показателя биохимического анализа крови необходимо проконсультироваться со специалистом.

Биохимический анализ крови позволяет оценить обмен веществ и работу внутренних органов: печени, почек, поджелудочной железы и др. (рисунок 23).



Рисунок 23 – Внутренние органы рыб

Изменения в биохимическом анализе крови свидетельствуют о различных нарушениях функций внутренних органов. Повышение уровня

глюкозы говорит о нарушении обмена углеводов и свидетельствует о развитии сахарного диабета. О жировом обмене судят по содержанию в крови холестерина, липопротеидов, триглицеридов. При биохимическом анализе крови изменение концентрации фосфора, кальция свидетельствует о нарушении минерального обмена, что встречается при заболеваниях почек, рахите, некоторых гормональных нарушениях.

Важные показатели биохимии крови – калий, натрий и хлор, поскольку изменение концентрации этих элементов неблагоприятно сказывается на работе внутренних органов, особенно сердца. В биохимическом анализе крови наблюдается уменьшение содержания белка, что свидетельствует о наличии заболеваний печени, почек.

В биохимии крови на нарушение функции печени указывает повышение таких показателей, как: АЛТ, АСТ, ГГТ, щелочная фосфатаза, холинэстераза. При определении биохимии крови изменение уровня амилазы говорит о патологии поджелудочной железы. Повышение уровня креатинина, определяемого при биохимическом анализе крови характерно для почечной недостаточности. На инфаркт миокарда указывает повышение концентрации КФК-МВ, ЛДГ (рисунок 24).

Биохимический анализ подразумевает лабораторное исследование следующих показателей анализа крови:

Белки: Альбумин, Общий белок, С-реактивный белок, Гликированный гемоглобин, Миоглобин, Трансферрин, Ферритин, Железосвязывающая способность сыворотки (ЖСС), Ревматоидный фактор.

Ферменты: Аланинаминотрансфераза (АлАТ), Аспаратаминотрансфераза (АсАТ), Гамма-глутамилтрансфераза (Гамма-ГТ), Амилаза, Амилаза панкреатическая, Лактат, Креатинкиназа, Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), Фосфатаза щелочная, Липаза, Холинэстераза.

Липиды: Общий холестерин, Холестерин ЛПВП, Холестерин ЛПНП, Триглицериды.



Рисунок 24 – Получение сыворотки крови у рыбы

Углеводы: Глюкоза, Фруктозамин.

Пигменты: Билирубин, Билирубин общий, Билирубин прямой.

Низкомолекулярные азотистые вещества: Креатинин, Мочевая кислота, Мочевина.

Неорганические вещества и витамины: Железо, Калий, Кальций, Натрий, Хлор, Магний, Фосфор, Витамин В₁₂, Фолиевая кислота.

Химический состав биологического материала переменчив. Он может за короткий промежуток времени значительно изменяться. Поэтому для получения сопоставимых результатов необходимо соблюдать ряд правил при отборе и хранении биологического материала. Это важно, так как нормативные значения определены с учетом этих правил:

1. Отбор материала необходимо производить с учетом суточной динамики. Кровь принято отбирать утром, до кормления. При повторном исследовании отбирать материал необходимо в одно и то же время.

В течение четырех часов после кормления концентрация некоторых субстратов (общий белок, глюкоза, липиды и ряд других) повышена (к примеру, норма для содержания глюкозы в сыворотке крови у крупного рогатого скота колеблется в пределах 2,2 – 3,2 ммоль/л, однако в течение 1 – 2 часов после кормления ее концентрация может возрасти в 2–4 и более раз, при углеводном перекорме глюкоза может кратковременно появляться в моче). Процесс отбора биологического материала должен быть максимально безболезненным и быстрым (беспокойство, болевая реакция, длительный венозный застой в месте инъекции значительно изменяют состав крови) (рисунок 25).



Рисунок 25 – Шприцы для биохимии

2. Взятие материала всегда проводят до лечебных процедур, особенно внутривенных инъекций электролитов, раствора глюкозы. Так же необходимо учитывать лекарственные препараты, которые вводились животному (например, вакцинация живыми вакцинами приводит к снижению фагоцитарной активности нейтрофилов).

3. Полученный материал сразу же помещается в чистую и закрытую посуду. Контакт с внешней средой не допускается. В случае, если исследуемое

вещество (например, билирубин, витамин В₂ и др.) разрушаются на свету, биологический материал помещают в светонепроницаемый пакет или ящик.

4. Биологические процессы продолжают и *in vitro*, поэтому их необходимо минимизировать. Для этого, если не используются консерванты, наиболее подходит низкая температура. Клеточные структуры сохраняют при температуре 4 – 8 °С (не допуская замораживания). Сыворотку, плазму и другие безклеточные биологические материалы лучше сразу после получения замораживать и транспортировать в таком виде. Считается, что при температуре –25 °С активность ферментов минимальна. Для каждого определяемого показателя при определенных условиях существуют максимальные сроки хранения (указываются обычно в методиках).

Пробы крови берут у животных перед кормлением или через 5-6 часов после кормления. Различают стабилизированную кровь, предохраненную от свертывания посредством внесения в нее стабилизатора (антикоагулянта). Она используется для получения плазмы и форменных элементов. В качестве антикоагулянтов применяют различные соли, осаждающие ионизированный кальций и другие катионы двухвалентных металлов, необходимых для свертывания крови, а также вещества животного происхождения (гепарин, герудин), блокирующих вторую фазу свертывания.

Наиболее часто используются следующие антикоагулянты:

- соли щавелевой кислоты (калия или натрия оксалаты) в количестве 10 – 20 мг на 10 мл крови или 0,15 мл 10 %-ного раствора;

- натрий лимоннокислый прибавляют из расчета 16 мг на 10 мл крови, в 3,2 %-ном растворе берут одну часть на 19 частей крови;

- трилон Б (динатриевая или дикальевая соль ЭДТА – этилендиаминтетрауксусной кислоты) – 10 мг на 10 мл крови или 0,1 – 0,2 мл 10 %-ного раствора (3-4 капли на пробирку);

- гепарин берут из расчета 50 ЕД на 10 мл крови (1–2 капли из иглы для внутривенных инъекций).

При добавлении раствора антикоагулянта вносимый объем учитывается, т.к. он влияет на гематокритную величину. Химическое вещество, входящее в состав антикоагулянта при анализе не определяется.

Цельная кровь и другой клеточный биологический материал доставляется в лабораторию в термосе при 4 – 8 °С.

Разделение крови на плазму и форменные элементы проводят путем отстаивания и центрифугирования стабилизированной крови при 500 – 800 g 10 – 20 мин (рисунок 26).

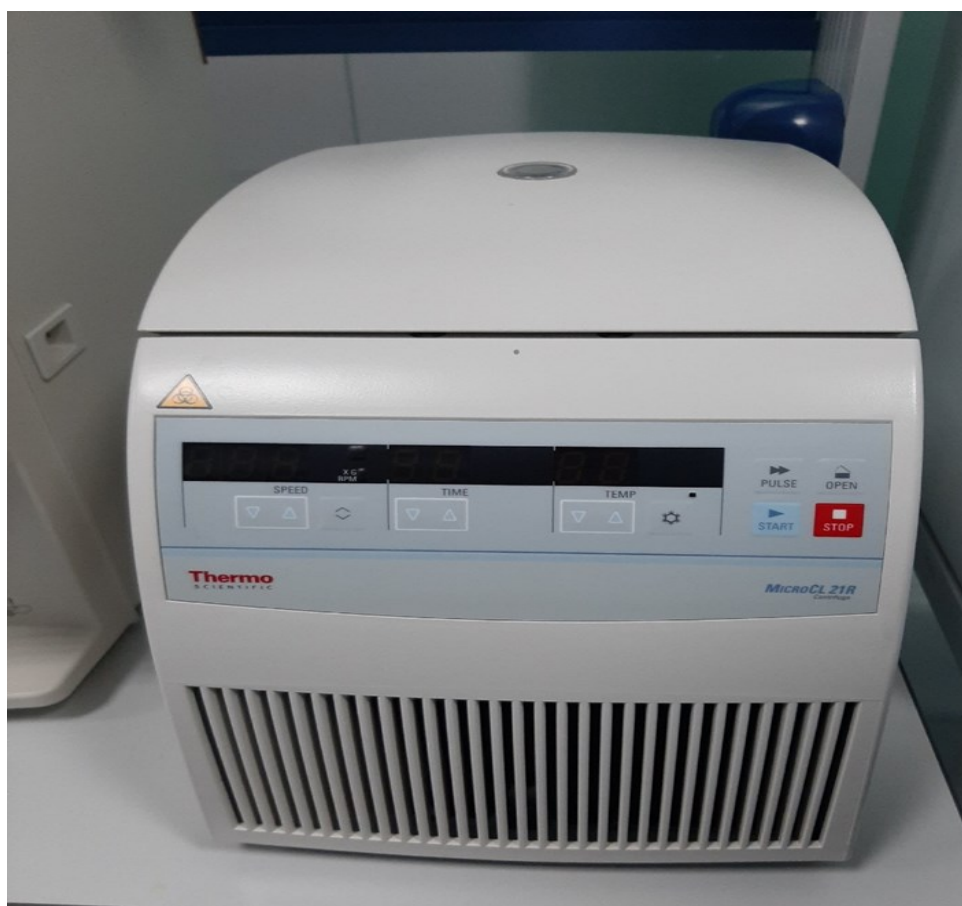


Рисунок 26 – Центрифуга лабораторная IEC MicroCL 21, ThermoElectron LED GmbH, Германия

Для получения сыворотки кровь отбирают в сухие чистые пробирки. Кровь при комнатной температуре сворачивается в течение 5–11 минут и при дальнейшем стоянии расслаивается. Над сгустком собирается сыворотка. Для

ускорения отделения сыворотки в лаборатории свернувшуюся кровь отделяют от стенок пробирки спицей из нержавеющей стали и помещают в термостат при температуре 37 – 38 °С (на 15 – 45 минут) (рисунок 27).



Рисунок 27 – Шейкер термостатируемый ST-3, ELMi

Отделившуюся сыворотку выливают в центрифужные пробирки и центрифугируют при тех же условиях, что и плазму.

При определении значительного количества веществ в крови (например, глюкозы, мочевины, кальция, фосфора, аскорбиновой кислоты, каротина и ряда др.) необходимо освободить ее от белка. Достигается это посредством осаждения белка под действием определенных химических реактивов. В качестве универсального осаждающего раствора в лабораторной практике используются 5 – 40 % растворы трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Концентрация ТХУ выбирается в зависимости от степени осаждения.

Конечная концентрация ее должна составлять 2,5 – 5 %. Наиболее часто сыворотку разводят в определенной пропорции дистиллированной водой и затем добавляют равное количество 10 % ТХУ (например, в пробирку вносится 0,1 мл сыворотки, 0,4 мл дистиллированной воды и 0,5 мл 10 % ТХУ). Хорошо осаждаются белки при смешивании сыворотки или плазмы крови с 96 % этанолом в соотношении 1:3. Если сыворотка, плазма или безбелковый фильтрат получены на ферме, то в лабораторию они доставляются в замороженном состоянии.

Дефектом, искажающим результаты исследований по целому ряду показателей, является гемолиз (лизис форменных элементов) крови.

Признакам его является равномерное окрашивание отстоявшейся плазмы или сыворотки в вишнево–красный цвет (за счет гемоглобина). Гемолизирующая сыворотка практически, не для каких исследований не пригодна.

Наиболее частыми причинами гемолиза являются:

- взятие крови в шприц (вакуум, создающийся в шприце при оттянутом поршне, разрушает мембраны эритроцитов);
- вспенивание крови при взятии, когда струйка крови направляется не по стенке пробирки, а на дно;
- взятие крови в холодную пробирку, с наличием на стенках конденсата или замерзание ее при транспортировке в холодное время года;
- центрифугирование на больших оборотах центрифуги (более 1000 g).

Анализ в настоящее время проводят различными лабораторными методами, один из современных это использования автоматических анализаторов (рисунок 28).



Рисунок 28 – Автоматический биохимический анализатор DIRUI CS-T240,
ЗАО «ДИАКОН»

В лаборатории возможно проведение биохимического анализа при помощи биохимического фотометра Стат Факс 1904. Данный аппарат является компактной бихроматической системой с шестью светофильтрами и встроенным инкубатором на 37 °С, управляемый с помощью микропроцессора. Прибор может применяться для измерений поглощения или концентрации, рассчитываемой по стандартам. Основным достоинством прибора является измерение и расчет результатов как по конечной точке, так и в режиме кинетики. Кроме прямого считывания по одноволновой схеме, возможно выбрать дифференциальные светофильтры для бихроматического считывания в одном из операционных режимов. Этот прием позволяет учитывать ненаполненность в кюветах и помогает устранить эффект мутности (рисунок 29).



Рисунок 29 – Полуавтоматический биохимический анализатор «Стат Факс»

Определение билирубина на приборе Стат Факс. Набор реагентов для определения концентрация общего и прямого билирубина в сыворотке крови. Метод Йендрассика-Грофа (рисунок 30).



Рисунок 30 – Набор реагентов для исследования билирубина

Принцип метода: прямой (связанный, конъюгированный с глюкуроновой кислотой) билирубин непосредственно реагирует с диазотированной сульфаниловой кислотой, а общий билирубин - в присутствии кофеинового реагента с образованием окрашенного азосоединения. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации билирубина и измеряется фотометрически при длине волны 535 (500-560) нм.

Исследуемый материал: Сыворотка крови без следов гемолиза. Пробы стабильны 2 часа при комнатной температуре в защищенном от света месте. Хранить исследуемый материал при температуре 2-8 °С, в защищенном от света месте не более 5 дней.

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность. Для исследования приготовьте диазореагент: смешайте необходимые количества реагентов № 2 и № 3 в соотношении 100 : 23. Диазореагент стабилен не менее 10 дней при температуре 2-8 °С в плотно закрытой посуде из темного стекла.

Содержимое флакона с калибратором растворите в 2 мл дистиллированной воды. После полного растворения концентрация билирубина - 85,5 мкмоль/л. Растворенный калибратор стабилен в течение 5 дней при температуре 2-8 °С в защищенном от света месте.

Срок хранения всех реагентов год при комнатной температуре. Реагент № 3 и калибратор светочувствительны - хранить в защищенном от света месте. Дата изготовления, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

Пробы тщательно перемешайте.

Для определения прямого билирубина точно! через 5 мин (комнатная температура) измерьте величину экстинкции опытной пробы против соответствующей контрольной пробы при длине волны 535 нм (500 - 560 нм).

Для определение общего билирубина через 20 мин (комнатная температура) измерьте величину экстинкции опытной пробы против соответствующей контрольной пробы при длине волны 535 нм (500 - 560 нм).

Экстинкцию калибратора измерьте против дистиллированной воды через 20 мин (комнатная температура) при длине волны 535 нм (500-560 нм) (таблица 3).

Таблица 3 – Процедура анализа

| Подготовьте пробы следующего состава: | Опытная проба | | Контрольная проба | Калибровочная проба |
|---------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------|---------------------|
| | Общий билирубин | Прямой билирубин | | |
| Сыворотка, мл | ОД | ОД | ОД | - |
| Реагент № 1, мл | 1,4 | - | - | 1,4 |
| Реагент №4, мл | од | 1,6 | 1,8 | од |
| Калибратор, мл | - | - | - | од |
| Диазореагент, мл | ОД | ОД | - | од |

Биохимия крови позволит выявить нарушения в работе внутренних органов тогда, когда ещё нет никаких внешних симптомов болезни.

Вопросы для самопроверки:

1. Основные биохимические показатели сыворотки крови?
2. Принцип работы биохимического анализатора?
3. Какая разница между автоматическим и полуавтоматическим биохимическим анализатором?
4. Роль калибратора в исследовании сыворотки крови?

Лабораторная работа №4

Определение микроэлементов в сыворотке крови рыбы атомно-абсорбционным методом

Цель работы: изучить атомно-абсорбционный анализ для исследования сыворотки крови у рыбы.

Оборудование и материалы: атомно-абсорбционный анализатор «Спектр -5», сыворотка крови рыбы, трихлоруксусная кислота, центрифуга лабораторная IEC MicroCL 21, ThermoElectron LED GmbH, Германия, градуировочные растворы микроэлементов, лампы микроэлементов для анализа, соляная кислота, дистиллированная вода, мерные колбы.

Задания:

1. Изучить принцип атомно-абсорбционного анализа.
2. Ознакомиться с программой Спектр-5.

Ход работы.

Метод атомно-абсорбционного анализа является относительным (сравнительным), поэтому для установления вида градуировочной зависимости «Абсорбция - Концентрация элемента» используют градуировочные растворы, в которых концентрация с определяемого элемента известна. С помощью этих растворов строят градуировочный график в данных координатах «А-С». В области линейности число градуировочных растворов может быть минимальным - вплоть до одного, в области нелинейности число градуировочных растворов необходимо увеличивать.

Современные приборы атомно-абсорбционного анализа позволяют с помощью ЭВМ сразу получать математическую форму градуировочного графика с целью последующей выдачи результатов непосредственно в концентрациях элементов. Для этого, после измерения абсорбции элемента в

пробе, по градуировочному графику или математической форме этого графика рассчитывают концентрацию элемента в пробе. При проведении градуирования и анализа предполагается, что коэффициент a в уравнении поглощения одинаков для градуировочных растворов и анализируемых проб.

Качество аналитической методики или метода анализа, характеризующее возможности определения или обнаружения элементов в области их малых содержаний, называется чувствительностью. Простейшей численной характеристикой чувствительности служит коэффициент чувствительности - производная аналитического сигнала по концентрации определяемого элемента. Если градуировочная функция является линейной, то коэффициент чувствительности - это тангенс угла наклона градуировочной кривой. Чем выше коэффициент чувствительности, тем меньшее содержание элемента соответствует одной и той же величине аналитического сигнала, и тем выше (при прочих равных условиях) чувствительность методики в целом. Если при атомно-абсорбционных измерениях градуировочный график прямолинеен в изучаемой области концентраций, то чувствительность определяется соотношением DA/DC (dA/dC), т. е. изменением сигнала атомарного поглощения при изменении концентрации определяемого элемента, что соответствует тангенсу угла наклона градуировочного графика.

Методика подготовки сыворотки крови для анализа. К 2,0 мл (4,0 мл) плазмы крови добавляем 1,0 мл (2,0 мл) 1,2 % раствора HCl и инкубируем в течении 25 минут при комнатной температуре. После гидролиза белков их осаждает 1,0 мл (2,0 мл) 20 % ТХУ (трихлоруксусная кислота).

Через 15 минут центрифугируем 10-15 мин. При 2500 тыс. обор/мин.

Надосадочную жидкость отбираем для анализа. Получилось разведение 2 раза. Для разведения плазмы в 3,4,6 раз к ней добавляем соответствующее количество HCl и ТХУ. Сыворотка не должна быть гемолизированной!

Реактивы:

а) Для приготовления 1,2 % HCl нужно взять 27,5 мл

концентрированной HCl и довести до 500 мл дистиллированной H₂O.

б) Для приготовления 20 % ТХУ нужно предварительно ТХУ просушить на фильтре, и взять навеску больше, чем 20 г, на 0,5-1,0 г и довести объем дистиллированной водой до 100 мл в мерной колбе.

Надосадочную жидкость отбираем для анализа и исследуем на приборе (рисунок 31).



Рисунок 31 – Атомно-абсорбционный анализатор «Спектр -5»

Расчет:

$$\frac{\text{Экс}}{2} \times \frac{100}{1000} \times \text{разведение (2)} = \text{мг \%}$$

Экстинция – это показание гальванометра, умноженное на содержание элемента в том или ином стандарте и деленное на показание стандарта. $\text{мг\%} \times 1000 = \text{мкг\%}$.

Вопросы для самопроверки:

1. Принцип работы атомно-абсорбционного анализатора?
2. Какие тяжёлые металлы могут накапливаться в рыбе?

3. Абсорбция определение?
4. Основные реактивы для проведения атомно-абсорбционного анализа?

Лабораторная работа №5

Методика определения хрома в жабрах рыб атомно-абсорбционным методом анализа

Цель работы: изучить методику определения хрома в жабрах рыбы.

Оборудование и материалы: атомно-абсорбционный анализатор «Спектр -5», жабры рыбы, градуировочные растворы микроэлементов, лампы микроэлементов для анализа, соляная кислота, дистиллированная вода, мерные колбы, сушильный шкаф, весы электронные, муфельная печь, азотная кислота, нитрата хрома $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$.

Задания:

1. Изучить роль хрома для организма рыб.
2. Обозначить этапы определения хрома в жабрах рыбы.

Ход работы.

Атомно-абсорбционным методом хром определяется в различных объектах:

- в атмосферном воздухе;
- в воздухе рабочей зоны;
- в атмосферных осадках;
- в стенном покрове;
- в почве;
- в питьевой воде;
- в природных и сточных водах;
- в промышленных водах;
- в пищевых продуктах и пищевом сырье;
- в биоматериалах.

Отбор проб заключается в выделении и взвешивании жабр (рисунок 32).



Рисунок 32 – Извлечение жабр у рыб

Жабры вырезают из рыб и обрабатывают азотной кислотой ($\rho = 1,42 \text{ г/см}^3$), затем помещают в сушильный шкаф и высушивают при температуре равной $5 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение часа. При данной температуре органические и минеральные вещества не разрушаются, а выпаривается только вода. Затем каждая проба взвешивается и вновь помещается в сушильный шкаф на час, и снова свешивают. Таким образом доводят массу жабр до постоянного веса. Как правило, эта процедура занимает 3-4 часа.

Минерализация. Взвешенную пробу помещают в фарфоровую чашку. Проводят обугливание на электрической плите до прекращения выделения дыма. Озоление проводят в муфельной печи. Пробу помещают в печь при температуре $250 \text{ }^\circ\text{C}$, затем ступенчато, прибавляя $50 \text{ }^\circ\text{C}$ в час, температура доводится до $450 \text{ }^\circ\text{C}$. Проведя озоления пробу охлаждают в бюксе до комнатной температуры. Далее проводят обработку азотной кислотой разведённой 1:1. После кислоту выпаривают на электрической плитке и помещают пробу в муфельную печь на 1 час при $T = 300 \text{ }^\circ\text{C}$. Далее пробу охлаждают, добавляют HNO_3 ($\rho = 1,42 \text{ г/см}^3$) и выпаривают до влажных солей.

Полученную массу растворяют в однопроцентной азотной кислоте в мерной колбе на 10 мл. Это и есть готовый анализируемый раствор.

Приготовление серии градуировочных растворов. Серию градуировочных растворов готовят из стандартного раствора какой-либо соли хрома, содержащего 1,000 г. хрома в 1 дм³.

Существует несколько вариантов приготовления этих растворов. Рассмотрим два из них.

Порцию дихромата калия высушивают при $T=105\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение двух часов в сушильном шкафу. Затем охлаждают до комнатной температуры, берут навеску массой 2,825 г высушенного дихромата калия и разводят в воде, добавляют 5 см³ концентрированной азотной кислоты и доводят водой до объема 1000 см³. Хранят этот раствор в полиэтиленовом сосуде или в сосуде из боросиликатного стекла при комнатной температуре. Раствор стабилен в течение года при хранении в темноте; рН раствора 1- 2.

Второй вариант несколько проще, и заключается в том, что используется государственный стандартный образец нитрата хрома $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ (ГОСТ 4212-76) объемом 5 мл, с концентрацией хрома 1 мг/мл. Раствор разводят дистиллированной водой до 50 мл, и концентрация хрома в растворе будет составлять 100 мкг/мл – это стандартный или основной раствор.

Затем берут три мерных колбы на 100 мл, в которые соответственно добавляют 1, 3 и 5 мл основного раствора и добавляют дистиллированной воды до метки. Концентрация хрома в колбах будет соответственно 1 мкг/мл, 3 мкг/мл и 5 мкг/мл. Это и будут готовые к употреблению градуировочные растворы.

Измерение и обработка результатов на приборе. Прибор подготавливают по инструкции для спектрофотометра. Исходный состав пламени перед юстировкой его состава по расходу ацетилена (при фиксированном расходе кислорода) устанавливается при измерении абсорбции хрома - в области восстановительного пламени, потому, что с

увеличением восстановительного характера пламени чувствительность определения хрома повышается, но при этом увеличиваются и влияния мешающих элементов. Высота горелки перед точной юстировкой максимума поглощения устанавливается в интервале 7-10 мм. При юстировке необходимо вводить поправки на смещение нуля.

Для определения хрома используют две длины волны 357,9 нм или 359,4 нм.

При наличии в приборе компьютерной системы расчета концентрации по величине абсорбции используют рекомендованные в технической инструкции прибора компьютерные программы. При ручной обработке данных строят график зависимости абсорбции от концентрации элемента в градуировочных растворах, либо находят концентрацию элемента с помощью математических расчетов. Показания оптической плотности градуировочных растворов приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Показания абсорбции градуировочных растворов

| С мкг/мл | A | A2 | A3 | A_{ср} |
|-----------------|----------|-----------|-----------|-----------------------|
| 1 | 44 | 48 | 46 | 46 |
| 3 | 120 | 132 | 125 | 126 |
| 5 | 190 | 204 | 205 | 200 |

Зная, что $A = K \cdot C$, находим:

$$K_{\text{среднее}} = \frac{46 + 42 + 40}{3} = 43$$

Рассмотрим вычисление концентрации на конкретном примере: показания атомно-абсорбционного спектрофотометра оптической плотности исследуемого образца – 167,7 МБ.

Из формулы $A = K \cdot C$, следует:

$$C = \frac{\text{показания абсорбции (Cr)}}{K} = 43$$

Пример оформления результатов анализа и обработки данных приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты анализа

| №п/п | Род рыбы | Вес рыбы (г) | Возраст рыбы (лет) | Масса пробы жабр (г) | Содержание хрома в анализируемой пробе (мкг) | Концентрация хрома в жабрах (мкг) | Накопление хрома | |
|-----------------------|-------------|--------------|--------------------|----------------------|--|-----------------------------------|------------------|-----------|
| | | | | | | | мкг/год | мкг/г/год |
| р/ц Акбулак (р. Илек) | | | | | | | | |
| 1 | подуст | 50 | | 0,6 | 3,9 | 6,5 | 1,9 | 3,2 |
| 2 | подуст (II) | 60 | | 0,8 | 4,5 | 5,6 | 1,5 | 1,8 |
| 3 | жерех | 70 | | 3,0 | 2,0 | 6,9 | 0,5 | 2,3 |
| р/ц Илек (р. Илек) | | | | | | | | |
| 4 | карась | 100 | | 0,2 | 1,6 | 8,0 | 0,2 | 1,3 |
| р/ц Илек (р. Урал) | | | | | | | | |
| 5 | карась | 260 | | 0,5 | 2,5 | 5,0 | 0,2 | 0,5 |
| с. Буртинское (озера) | | | | | | | | |
| 6 | карась | 160 | | 0,2 | 2,1 | 10,5 | 0,2 | 1,3 |

Таким образом, в результате проделанной работы, анализ жабр рыб показывает, что хром находится в рыбах и его содержание превышает предельно допустимую концентрацию.

Вопросы для самопроверки:

1. Хром и его роль для организма?
2. При каких температурных условиях проходит минерализация проб?
3. Этапы отбора жабр рыбы.
4. Какая длина волны используется для исследования хрома.

Лабораторная работа №6

Экспресс-методы определения тяжёлых металлов в рыбе

Цель работы: провести экспресс анализ рыбы на содержание тяжёлых металлов.

Оборудование и материалы: атомно-абсорбционный анализатор «Спектр -5», биологические ткани рыбы, градуировочные растворы микроэлементов, лампы микроэлементов для анализа Zn, Cr, Fe, Cu, Cd, Pb, Mn, Co, Ni, соляная кислота, дистиллированная вода, сушильный шкаф, весы электронные, муфельная печь, мерные колбы на 25 мл, серная кислота, перекись водорода.

Задания:

1. Изучить принцип минерализации образцов рыбы.
2. Порядок работы с муфельной печью.

Ход работы.

Все чаще используют быстрые упрощенные методы, при которых органическая основа разрушается не полностью: кислотный гидролиз, эмульгирование с гидроокисями тетраалкиламмония и др. Ниже приводятся некоторые из этих методик.

I. Неполная минерализация биологических тканей рыбы минеральными кислотами.

1 г пробы помещают в высокий стакан, покрытый часовым стеклом, и нагревают с 10 мл HCl (1 : 1). Выпаривают до объема 3 мл (в растворе остаются неразложенные жиры), фильтруют в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки водой.

В пламени по методу добавок определяют Zn, Cr и Fe, а в графитовой печи - Cu, Cd, Pb, Mn, Co и Ni.

В другом варианте пробу кипятят в течение 15-30 мин с 20 мл HCl (1:1), фильтруют и после надлежащего разбавления определяют в растворе пламенным методом Na, K, Mg, Ca, Cu, Zn, Sn и Fe.

II. Эмульгирование с гидроокисью тетраметиламмония (или тетраэтиламмония): к 1 г ткани (пищевого продукта, крови и др.) добавляют 2-5 мл 10-25%-ного раствора гидроокиси тетраалкиламмония в воде (или спирте, толуоле); сосуд герметически закрывают и взбалтывают смесь в течение 2 ч при 70 °С. После охлаждения объем доводят до 10 мл водой или подходящим растворителем. В растворе определяют Cu, Zn, Cd, Sn, Mn, Ni, Pb и др. с атомизацией в пламени, чашке Дельвса и графитовой печи.

III. Разложение в тefлоновом автоклаве: 0,5 г пробы разлагают с 2 мл HNO₃ или 5 мл H₂SO₄ при 150 °С в течение 30 мин. После охлаждения автоклав открывают и разводят пробы до определенного объема (нельзя использовать большие количества пробы, HClO₄ или H₂O₂!).

Для летучих элементов – Hg, Sn, As, Sb, Se и Te – используют специальные методы подготовки пробы и самого анализа (мокрая минерализация в сильно окислительной среде; выделение в виде летучих гидридов или определение в графитовой печи с надлежащей модификацией матрицы).

При анализе растворов, полученных после минерализации пигментов животного происхождения, наблюдаются матричные эффекты, подобные эффектам при клинических анализах, но часто более серьезные; для исключения влияний используют те же способы.

Вопросы для самопроверки:

1. Мокрая и сухая минерализация определения??
2. Тяжёлые металлы какой вред наносят организму?
3. Матричные эффекты их принцип действия?

Лабораторная работа №7

Определение витаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Цель работы: изучить метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения витаминов.

Оборудование и материалы: жидкостный хроматограф «Орлант», плазма крови, этанол, гексан, хлороформ, метанол, центрифуга лабораторная IEC MicroCL 21, ThermoElectron LED GmbH, колонка: RP C8, длина 250 мм, диаметр 4 мм, спектрофотометрический детектор (СФД), программа «Мультихром».

Задания:

1. Изучить витамины в рыбе и их роль в питании.
2. Хроматография и её аспекты.
3. Освоить программу МультиХром и принцип работы с ней.

Ход работы.

Прибор для измерения витаминов в сыворотке крови – жидкостный хроматограф (рисунок 33).

Принцип метода. В эппендорф берется 300 мкл плазмы крови, смешивается с 300 мкл этанола и 300 мкл гексана.

Полученная смесь интенсивно встряхивается на вортексе в течение 1 мин., затем центрифугируется 3 мин. при 3000 об./мин. Супернатант отделяется. Операция повторяется не менее 3 раз.

Полученные гексановые вытяжки объединяются и упариваются в токе азота или под вакуумом при T не более 40 °С.

Упаренный образец растворяется в 2x50 мкл смеси хлороформ: метанол (1:1), переносится в конический эппендорф минимального объема и добавляется 150 мкл. подвижной фазы «А» (состав приведен ниже).



Рисунок 33 – Жидкостный хроматограф «Орлант»

В случае выпадения осадка эппендорф центрифугируется при 1000 – 1500 об/мин. в течение 1 мин. Супернатант переносится в стеклянную коническую вставку для виал объемом 200 мкл и анализируется.

Условия хроматографирования жирорастворимых витаминов, выделенных из плазмы крови.

Колонка: RP C8, длина 250 мм, диаметр 4 мм.

Температура колонки: 35⁰С.

Длины волн, nm:

Канал 1: 265, переключение на 292 с 13,4 мин.

Канал 2: 292, переключение на 450 с 10 мин. (таблица 6).

Таблица 6 – Градиент

| Подача, мл/мин | A,% | B,% | Общее время, мин. |
|-------------------|-----|-----|-------------------|
| 1 | 70 | 30 | 3 |
| 1 | 88 | 12 | 7 |
| 1 | 100 | 0 | 12 |
| 1,25 | 100 | 0 | 18 |

Подвижная фаза:

«А» - раствор 100 ммол. ацетата аммония в смеси метанол: ацетонитрил (60:40).

«В» - раствор 100 ммол. ацетата аммония в воде.

Полученную надосадочную жидкость вводим в колонку для хроматографии при использовании детекторов.

Спектрофотометрический детектор (СФД) предназначен для измерения величины поглощения света потоком жидкости, прошедшим через хроматографическую колонку. Измерение производится при сканировании фиксированного набора длин волн в ультрафиолетовом или видимом диапазоне. В окне метода СФД представлен специальной пиктограммой.

Для настройки параметров СФД выполните следующее.

- Щелкните мышью по пиктограмме СФД, откроется окно Спектрофотометрический детектор, лист Детектор.
- Измените, если требуется, область измерения оптического сигнала, выбрав в списочном поде значение Спектрофотометр на УФ область или Спектрофотометр на видимую область.
- Установите значения длины волны, на которых будет производиться регистрация сигнала, Выделяя в правом списке требуемое значение и щелкая мышью по кнопке со стрелкой <. При этом выбранное значение будет перемещаться в левый список, а указанное над ним число выбранных значений будет увеличиваться на 1. При необходимости

исключить какое-либо значение из левого списка выделите его и щелкните мышью по кнопке 3 - выбранное значение вернется в правый список.

- Измените, если требуется, постоянную времени регистрации сигнала, установив требуемое значение в поле Постоянная времени.

- Измените, если требуется, масштаб регистрации сигнала, установив в поле Масштаб регистрации величину сигнала, соответствующую полной шкале самописца (используется при подключении внешнего самописца).

- Если требуется произвести запуск СФД без включения остальных устройств, входящих в хроматографическую систему, воспользуйтесь кнопками Старт/Стоп в области Ручное управление.

Флуориметрический детектор (ФМД) предназначен для измерения величины флуоресценции потока жидкости, прошедшего через хроматографическую колонку, при возбуждении светом заданной длины волны. В окне метода ФМД представлен специальной пиктограммой.

Для настройки параметров ФМД выполните следующее.

- Щелкните мышью по пиктограмме ФМД, откроется окно Флуориметрический детектор, лист Детектор.

- Введите требуемое значение в поле Длина волны возбуждения.

- Измените, если требуется, постоянную времени регистрации сигнала, установив требуемое Значение в поле Постоянная времени.

- Измените, если требуется, масштаб регистрации сигнала, установив в поле Масштаб регистрации величину сигнала, соответствующую полной шкале самописца.

- Если требуется произвести запуск ФМД без включения остальных устройств, входящих в хроматографическую систему, воспользуйтесь кнопками Старт/Стоп в области Ручное управление.

Для подачи элюента используется блок насосный (БН), основными элементами которого являются два насоса и два переключающих крана - шестиходовой и трехходовой.

С помощью БН могут быть реализованы два программируемых режима подачи элюента: градиентная подача двухкомпонентной смеси с заданной зависимостью (градиентом) относительного содержания компонентов и непрерывная подача одного элюента в произвольных количествах, не ограниченных объемом насосов. В этих режимах работой насосов и положением кранов управляет программа. Возможен также ручной режим управления насосами и кранами.

В окне метода БН представлена специальной пиктограммой. Щелчок мыши по пиктограмме БН открывает окно Блок насосный для задания параметров работы насосов или ручного управления. В зависимости от того, какой режим работы насоса предусмотрен в используемом методе, это окно будет содержать либо листы Градиентная подача, Промывка, Ручное управление, Каналы и Links, либо листы Непрерывная подача, Ручное управление и Links (см. ниже). Переход между режимами градиентной и непрерывной подачи осуществляется только путем смены метода (команда Система/Сменить...).

Градиентная подача. При использовании режима градиентной подачи два насоса, управляемые контроллером, одновременно подают в систему две различные жидкости в количествах, обеспечивающих заданный градиент. Гидравлические соединения в системе должны соответствовать описанию, приведенному в Руководстве по эксплуатации.

Градиент устанавливается пользователем в виде кусочно-линейной зависимости путем задания набора узловых точек. Для каждой точки задается относительная концентрация (в %) первого компонента (при этом концентрация второго вычисляется программой), а также отрезок времени до следующей узловой точки. В течение этого времени производится

программное изменение концентрации до значения, указанного для следующей точки. При работе в режиме градиентной подачи пользователю необходимо задать по крайней мере 2 узловые точки.

Для настройки параметров режима градиентной подачи выполните следующее.

- Щелкните мышью по пиктограмме БН, откроется окно БН, лист Градиентная подача, страница Профиль градиента.
- Задайте общую скорость подачи элюента в линию в поле Общая скорость подачи.
- Задайте скорость набора элюента в насосы в поле Скорость набора (максимальное значение 1500 мкл/мин).
- Задайте градиент с помощью процедуры, описанной ниже в разделе Задание градиента.
- Если требуется произвести проверку работы градиентной системы без запуска остального оборудования, нажмите кнопку Старт – произойдет запуск насосов.
- Если требуется остановить работу БН до окончания процедуры или приостановить ее с последующим возобновлением, используйте кнопки Стоп, Пауза и Продолжение соответственно.
- Завершите настройку параметров, нажав кнопку ОК. Окно БН закроется.

Для задания градиента выполните следующее.

- Задайте первую узловую точку следующим образом.
- Нажмите кнопку Добавить. Откроется окно Добавить в конец списка.
- Введите начальное значение концентрации первого компонента в поле Насос1. При этом в поле Насос 2 автоматически будет введено значение, дополняющее заданное до 100 %.

- Введите продолжительность отрезка времени до второй точки в поле Время.

- Нажмите кнопку ОК, при этом окно Добавить в конец списка закроется. В поле Узловые точки градиента окна БН появится первая строка.

- Задайте вторую узловую точку, повторив вышеописанную процедуру. При этом в окне БН, кроме добавления второй строки в поле Узловые точки градиента, произойдут изменения в полях суммарных значений, расположенных ниже поля Узловые точки градиента: в поле Суммарное время будет введено значение, указанное в поле Время для первой точки, а в поля Объем элюента для насоса 1 и Объем элюента для насоса 2 - значения объемов жидкостей, которые набираются в насосы для обеспечения заданного градиента в течение указанного времени. Значение суммарного времени будет также введено в поле Продолжит. на листе Общие паспорта хроматограммы.

- Задайте все остальные узловые точки описанным выше способом. При этом при добавлении очередной точки значения в полях суммарных значений будут увеличиваться на величины, указанные для этой точки. Обратите внимание на то, что в последней строке списка для значения времени применяется серый цвет. Это означает, что последняя величина не используется при определении полной длительности хроматограммы, так как число интервалов всегда на единицу меньше числа узловых точек.

- Если требуется ввести новую точку в произвольном месте списка, выделите щелчком мыши строку, перед которой должна быть введена новая точка и нажмите кнопку Вставить. При этом откроется окно Вставить... узел, аналогичное окну Добавить в конец списка. Выполните все процедуры добавления точки, как это описано выше. При закрытии окна будет соответствующим образом изменена нумерация точек, а также величины в полях суммарных значений.

- Если требуется внести изменения для уже существующей точки, выделите щелчком мыши соответствующую строку, и нажмите кнопку Изменить (можно также дважды щелкнуть мышью по строке). При этом откроется окно Изменить... узел, аналогичное окну Добавить в конец списка. После внесения требуемых изменений и закрытия окна строка в списке узловых точек и величины в полях суммарных значений будут изменены соответствующим образом.

Системные настройки. Перед запуском градиентной подачи БН должен произвести набор элюентов в насосы. Кроме того, при работе с автосамплером БВП (см. раздел Блок ввода пробы) перед запуском каждого анализа может потребоваться промывка колонки путем подачи смеси элюентов, соответствующей первому участку профиля градиента. На странице Системные настройки листа Градиентная подача пользователь имеет возможность выбрать способ набора элюентов, выбрав требуемый вариант в области Режим заполнения насосов, а также установить опцию предварительной промывки.

- Для того чтобы в начале производился набор полного объема шприцов, и далее подача необходимых объемов в соответствии с заданным профилем градиента, установите переключатель Полный объем шприцов.

- Для того чтобы в шприцы набирался только необходимый объем элюентов, рассчитанный согласно заданному профилю с некоторым запасом, установите переключатель Заданный объем с запасом и введите величину требуемого запаса в поле Запас.

- Если объем элюента, используемый в одном анализе, много меньше полного объема шприцов, возможно выполнить серию анализов при однократном заполнении шприцов. При этом программа выдаст предупреждающее сообщение, если остаток элюента перед очередным анализом хотя бы в одном шприце окажется меньше требуемого объема с некоторым запасом. Для задания такого режима установите переключатель

Информировать, когда остаток в шприцах меньше заданного объема с запасом и введите величину требуемого запаса в поле Запас.

При работе в режиме однократного заполнения шприцов эта процедура должна выполняться предварительно вручную!

- Для того чтобы при работе с автосамплером БВП производилась промывка колонки перед запуском каждого анализа, установите флажок Предварительная промывка согласно 1-му узлу градиента и введите величину объема жидкости, используемой для промывки, в поле Запас. При этом по окончании промывки сигнал от БП, разрешающий ввод пробы, будет передаваться на БВП.

Предварительная промывка будет производиться только в том случае, если в окне Блок ввода пробы установлен флажок Использовать промывку при работе в очереди (см. раздел Блок ввода пробы, Ввод пробы)!

Ручное управление в режиме градиентной подачи. При ручном управлении пользователь имеет возможность включить только один или оба насоса одновременно, задав произвольную скорость и объем подаваемой или набираемой жидкости. При этом положение крана 1 будет устанавливаться автоматически в соответствии с режимом работы насосов.

Работа при ручном управлении производится следующим образом.

- Щелкните мышью по пиктограмме БН, откроется окно БН. Перейдите на лист Ручное управление. На этом листе кроме полей, в которые вводятся параметры, представлены поля с телеметрической информацией (индикаторы) о положении кранов и насосов, обычно окрашенные в зеленый цвет. Если по какой-то причине данные телеметрии отсутствуют, поля окрашиваются в темно-красный цвет и содержат вопросительные знаки.

- Установите флажок Насос1 и/или Насос2, при этом поля Скорость и Объем для выбранного насоса становятся доступными для ввода данных.

- Введите в соответствующие поля значения скорости набора (слива) и объема набираемой (сливаемой) жидкости.

- Перед запуском насоса в режиме подачи убедитесь по индикатору Положения насосов или визуально, что в нем имеется достаточный объем жидкости, и в случае необходимости предварительно произведите набор элюента.

- Включите насосы, нажав кнопку Набор или Подача. Кран КП1 при этом автоматически установится в положение, соответствующее заданной операции, после чего произойдет запуск насосов на набор/подачу с заданной скоростью. На индикаторах Расходы элюента при этом будут представляться текущие значения объема жидкости, поданного насосом. При совместной работе двух насосов каждый из них будет работать со своей скоростью и остановится после подачи (набора) заданного для него объема жидкости. Остановка также может произойти раньше, при полном освобождении (заполнении) насоса, в этом случае в поле Положение появится значение Пустой (Полный).

- Если требуется прекратить работу насоса раньше или приостановить ее с последующим возобновлением, используйте кнопки Стоп, Пауза и Продолжение соответственно.

- Если при выключенном насосе требуется изменить положение крана КП1, нажмите кнопку Подача или Набор.

- Если при выключенном насосе требуется изменить положение крана КП2, нажмите кнопку Слив или Линия.

- Если требуется произвести перезапуск контроллера, управляющего работой БН, нажмите кнопку Сброс.

Непрерывная подача. При использовании режима непрерывной подачи два насоса, управляемые контроллером, попеременно подают в систему одну и ту же жидкость. При этом пока один из насосов подает элюент в систему, второй производит набор жидкости (с существенно большей скоростью), а затем ждет окончания работы первого насоса, после чего подачу элюента с той же скоростью производит второй насос, а первый переходит в режим набора и

ожидания. Гидравлические соединения в системе должны соответствовать описанию, приведенному в Руководстве по эксплуатации.

Система БН, используемая в режиме непрерывной подачи, позволяет работать с электрохимическим детектором.

Для настройки параметров режима непрерывной подачи выполните следующее.

- Щелкните мышью по пиктограмме БН, откроется окно БН, лист Непрерывная подача.

- Задайте скорость подачи жидкости в линию, введя значение в поле Скорость подачи.

- Задайте полный объем элюента, который требуется подать в линию в продолжение хроматографического процесса, введя значение в поле Подаваемый объем (максимальное значение 16 000 000 мкл).

- Задайте скорость набора жидкости, введя значение в поле Скорость набора (она должна быть существенно больше скорости подачи, максимальное значение 1500 мкл/мин).

- Задайте переходную скорость, используемую в момент переключения с одного насоса на другой, введя значение в поле Скорость переходная. Этот параметр подбирается экспериментально, в зависимости от вязкости жидкости, таким образом, чтобы максимально сгладить пульсации, возникающие в момент смены насоса.

- Задайте скорость слива жидкости, введя значение в поле Скорость слива (вспомогательный параметр, используемый при сливе жидкости из насоса перед началом работы).

- Если требуется произвести проверку работы БН без запуска остального оборудования, нажмите кнопку Старт. При этом возможно прекратить работу насоса раньше или приостановить ее с последующим

возобновлением, используйте кнопки Стоп, Пауза и Продолжение соответственно.

- Завершите настройку параметров, нажав кнопку ОК. Окно БН закроется.

Режим, используемый по умолчанию, предусматривает, что работа насосов начинается с заполнения первого насоса. При этом, если в обоих насосах была жидкость, из второго она предварительно сливается, а в первом остается, и далее производится набор до его заполнения. Если требуется предварительно слить остаток жидкости из первого насоса, эту процедуру следует выполнить в ручном режиме.

При ручном управлении пользователь имеет возможность включить только один из насосов, задав произвольную скорость и объем подаваемой или набираемой жидкости. При этом положение КП будет устанавливаться автоматически в соответствии с режимом работы насоса.

Таблица 7 – Значения в группе полей

| Поле | Значение | Комментарий |
|--|-----------------|---|
| Насос 1, Насос 2 | Объем, мкл | Объем жидкости в насосе определяется только после того, как поршень хотя бы раз достиг крайнего положения |
| Кран 1 (режим градиентной подачи) | Подача | Оба насоса подключены на подачу жидкости |
| | Набор | Оба насоса подключены на набор жидкости |
| Кран 1 Подача/Набор (режим непрерывной подачи) | H1/H2 | Насос 1 – на подачу, насос 2 – на набор жидкости |
| | H2/H1 | Насос 2 – на подачу, насос 1 – на набор жидкости |

На отсутствие телеметрических данных, кроме значения 222, указывает также изменение цвета поля и текста: вместо черных знаков на зеленом фоне появляются желтые знаки на темно красном фоне. Пользователь имеет возможность настроить эти цвета.

Блок ввода пробы (БВП) служит для автоматического ввода ряда образцов в последовательности, заданной в очереди. В окне метода БВП представлен специальной пиктограммой.

Для настройки параметров БВП выполните следующее.

- Щелкните мышью по пиктограмме БВП, откроется окно Блок ввода пробы, лист Ввод пробы.

Процедура автоматического ввода пробы разделяется на три операции: предварительный слив, набор пробы и заполнение петли. Параметры, при которых выполняются эти операции, сгруппированы в одноименных областях окна.

Для настройки параметров процедуры ввода пробы выполните следующее.

- Введите значение в поле Скорость слива в области Предварительный слив.

- В области Набор пробы задайте следующие параметры.

- Введите номер сосуда (21, 25,29, 33 или 37), из которого будет набираться жидкость, а также набираемый объем и скорость набора для буфера №1.

- Выполните ту же процедуру для пробы. При этом номер сосуда (1...39) и объем требуется задавать только в том случае, если предполагается запуск вручную из окна Блок ввода пробы - в противном случае программа использует значения этих параметров, установленные на листе Проба паспорта хроматограммы или заданные в Таблице очереди.

- Введите номер сосуда для ополаскивания иглы (21, 25,29, 33 или 37).

- Введите номер сосуда (21, 25, 29, 33 или 37) и набираемый объем для буфера №2 (скорость набора жидкости автоматически устанавливается такой же, как для пробы).

- Введите значения в поля Объем ввода и Скорость ввода в области Заполнение петли.

- Если анализ производится в режиме градиентной подачи, и перед вводом пробы требуется промывка колонки, в области Инжекция выберите переключатель. По команде от БН (см. раздел Градиентная подача, Системные настройки). В этом случае по окончании промывки от блока насосного поступает сигнал, разрешающий ввод пробы. При установке переключателя автономно ввод пробы будет начинаться при запуске анализа.

Предварительная промывка будет производиться только в том случае, если в окне БН установлен флажок Предварительная промывка согласно 1-му узлу градиента!

Все введенные параметры будут использоваться программой при управлении процедурой автоматического ввода пробы. Кроме того, эта процедура, а также каждая операция по отдельности, может запускаться из этого окна вручную.

- Для ручного запуска выполните следующее. Для запуска операции предварительного слива, набора пробы или заполнения петли нажмите кнопку Ручной старт в соответствующей области окна.

- Для запуска всей процедуры ввода пробы нажмите кнопку Общий ручной старт в низу окна.

- Если требуется прекратить выполнение процедуры раньше или приостановить ее с последующим возобновлением, используйте кнопки Стоп, Пауза и Продолжение соответственно. Промывка для задания параметров промывки узла ввода пробы служит лист

Промывка может выполняться однократно, в режиме ручного запуска, или перед каждым вводом пробы при работе в очереди.

- Задайте скорость подачи элюента при промывке, введя требуемое значение в поле Скорость промывки.

- Задайте объем элюента, который будет использован для промывки, введя величину набираемого объема и число повторов процедуры в поля Набрать и слить и ...раз.

- Для того чтобы промывка выполнялась перед запуском каждой хроматограммы при работе в очереди, выполните следующее.

- Установите флажок Использовать промывку при работе в очереди

- Укажите номера сосудов с элюентом, которые будут использоваться для набора жидкости, перемещая строки между списками Используемые сосуды и Неиспользуемые сосуды с помощью кнопок >> и <<. (Несколько сосудов используется для того, чтобы увеличить объем жидкости, которая может быть использована для промывки при большом числе хроматограмм в очереди.)

- Для однократной промывки выполните следующее.

- Укажите номер сосуда с элюентом, который будет использоваться для набора жидкости (21, 25, 29, 33 или 37).

- Нажмите кнопку Старт.

- Если требуется прекратить выполнение процедуры раньше или приостановить ее с последующим возобновлением, используйте кнопки Стоп, Пауза и Продолжение соответственно.

Лист Ручное управление предназначен для управления отдельными узлами блока ввода пробы: краном-инжектором, иглой, каруселью и насосом. Элементы управления узлами сгруппированы в одноименных областях, в каждой из которых представлено также поле индикатора для вывода информации о текущем положении узла. Если по какой-то причине данные телеметрии отсутствуют, поля окрашиваются в темно-красный цвет и содержат вопросительные знаки.

Управление узлами производится следующим образом.

- Для перевода крана-инжектора в положение, соответствующее заполнению петли или вводу пробы, нажмите кнопку Петля или Ввод.
- Для перемещения иглы в верхнее или нижнее положение нажмите кнопку Вверх или Вниз.
- Для поворота карусели в требуемую позицию введите в поле номер сосуда (1...39), затем нажмите кнопку Повернуть.
- Для управления работой насоса выполните следующее.
 - Для набора жидкости введите требуемые значения в поля Скорость и Объем в области Насос/Набор, затем нажмите кнопку Старт.
 - Для подачи жидкости введите требуемые значения в поля Скорость и Объем в области Насос/Подача, затем нажмите кнопку Старт.
 - Если требуется прекратить работу насоса раньше или приостановить ее с последующим возобновлением, используйте кнопки Стоп, Пауза и Продолжение соответственно.
- Если требуется произвести перезапуск контроллера, управляющего работой БНП, нажмите кнопку Сброс.

Устройство ввода пробы (УВП) предназначено для ручного ввода пробы. В окне метода устройство ввода пробы представлено специальной пиктограммой.

Программа не управляет положением УВП, однако информация о нем может быть выведена на экран монитора.

- Для получения информации о положении УВП щелкните мышью по пиктограмме, откроется окно УВП, лист Положение. В индикаторном поле Положение УВП может быть представлено значение Петля или Ввод.

Блок комбинированный (БК) служит для автоматического ввода ряда образцов в заданной последовательности. В окне метода БК представлен специальной пиктограммой.

Для настройки параметров БК выполните следующее.

- Щелкните мышью по пиктограмме БК, откроется окно Блок Комбинированный, лист Режим работы.
- Для задания параметров работы детектора выполните следующие.
- Установите значение длины волны, на которых будет производиться регистрация сигнала, выделяя в правом списке требуемое значение и щелкая мышью по кнопке со стрелкой «.. При этом выбранное значение будет помещаться в левый список, а указаны над ним число выбранных значений будет увеличиваться на 1. При необходимости исключить и какое-либо значение из левого списка выделите его и щелкните мышью по кнопке 3 -выбранное значение вернётся в правый список.
- Измените, если требуется, постоянную времени регистрация сигнала, установи в требуемое значение в поле Постоянная времени.
- Измените, если требуется, масштаб регистрации сигнала, установи в поле Масштаб регистрация величину сигнала соответствующая полной шкале само пишется используется при подключении внешнего самописца.
- Если требуется произвести запуск с СФД без включения остальных устройств, входящих в хроматографическую систему, Воспользуйтесь кнопками Включить/Остановить области Ручное управление.
- Для задания параметров работы насоса перейдите на лист Насос.
- Установите значения скорости насоса при наборе и подаче элюента путем ввода их в одноименные поля.
- Установите значения объема в полях Промывка, 1й буфер, Проба, 2й буфер. Для промывки и в качестве буфера будет использоваться элюент, соответствующий наибольшему номеру с ненулевым значением объема в списке ступеней градиента.
- Установите объемы для формирования ступеней градиента путем ввода их в соответствующие поля. Набор элюентов осуществляется в порядке нарастания их номеров, а подача- в обратном порядке.
- Завершите настройку параметров, нажав кнопку ОК.

Программой МультиХром, версия 2.x предусмотрена возможность ручного пооперационного управления работой хроматографа. Этот режим используется, главным образом, при выполнении подготовительных и вспомогательных операций (при смене растворителя, промывке колонки и др.). Работа в ручном режиме производится следующим образом.

- В окне БК перейдите на лист Ручное управление.
- Для набора элюента выполните следующее.
- Задайте объем элюента, который требуется набрать, в поле Объем.
- Задайте скорость набора элюента в поле Набор.
- Задайте номер требуемого элюента в поле, расположенном рядом с кнопкой Элюент, и нажмите эту кнопку. Игла опустится в емкость с указанным элюентом.

- Нажмите кнопку Набор. В насос будет набрано указанное количество элюента, после чего

- набор будет автоматически остановлен.
- Для ввода элюента в колонку выполните следующее.
- Наберите требуемый элюент описанным выше способом.
- Задайте объем вводимой жидкости в поле Объем.
- Задайте скорость подачи жидкости в поле Подача.
- Нажмите кнопку Колонка. Игла переместится для ввода жидкости в колонку.

- Нажмите кнопку Подача. В колонку будет введено указанное количество жидкости, после чего процесс будет автоматически завершен.

- Для слива жидкости из насоса нажмите кнопку Слив. Игла переместится в положение для слива. Все содержимое насоса будет слито с максимально возможной скоростью подачи, после чего процесс будет автоматически завершен.

- Для запуска регистрации базовой линии при работе в ручном режиме нажмите кнопку Запустить промывку. При этом откроется окно хроматограммы, в котором будет идти базовая линия.

- Если требуется поднять или опустить иглу вручную, используйте кнопку Поднять/Опустить. (Обычно эта процедура выполняется автоматически при перемещении иглы в новое положение).

Программой также предусмотрена возможность приостановки и последующего возобновления хроматографического процесса, которая осуществляется на листе Ручное управление, следующим образом.

- Нажмите кнопку Пауза. Произойдет одновременная остановка работы насоса и приема сигнала.

- Для возобновления процесса нажмите кнопку Продолжить.

Вопросы для самопроверки:

1. Мокрая и сухая минерализация определения?
2. Тяжёлые металлы какой вред наносят организму?
3. Матричные эффекты их принцип действия?
4. Как проводят ручную настройку прибора?
5. Программы МультиХром её плюсы и минусы?

Лабораторная работа №8

Методика определения витамина А в рыбе и рыбных продуктах

Цель работы: изучить метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения витаминов.

Оборудование и материалы: гидроксид калия (КОН), водный 50%-й раствор КОН: растворить в 500 г КОН в дистиллированной воде и довести объем до 1 литра, Пирогаллол А (или гидрохинон), Сульфат натрия безводный, Гексан, Серный эфир, свободный от пероксидов, Пропанол-2 (изопропиловый спирт), Этанол, Бутилокситолуол, ГСО витамина А. комплект для микроволновой ВЭЖХ "Милихром" со сканирующим УФ-эффектом, колонка 64,80 или 120×2 мм, заполненная Сила орлом 600 (размер частиц мкм), водяная баня, роторно-вакуумный испаритель, Колбы круглодонные со шлифом ёмкостью 250 мл, делительные воронки емкостью 250 и 500 мл, мерная посуда.

Задания:

1. Изучить роль Витамина А для рыбной продукции.
2. Научиться проводить пробоподготовку рыбы для анализа методом жидкостной хроматографии.

Ход работы.

Методика анализа витамина А. Определение витамина А в премиксах, комбикормах и биологических объектах концентрации витамина А (МЕ/г): премиксы - ; комбикорма - более 2,0; биологические объекты - мкг/г.

Метод заключается в омылении образцов экстракции витамина А неполярными растворителями (эфир, гексан), а также в проведении микроколоночной разделения на колонке с прямой фазой и определения с

помощью УФ-детектора, при длине волны 324 нм. Расчёт содержания витамина А проведен с учётом двух форм (цис- и транс-) ретинола.

Раствор фенолфталеина: растворить 2 г фенолфталеина в 100 мл этилового спирта Элюент для микроколоночной ВЭЖХ: гексан : пропанол-2 (98 : 2), добавить 2 мл пропанола-2 в мерную колбу емкостью 100 мл и довести объем до метки гексаном. Стандарт витамина А: полный транс-ретинол (рисунок 34).

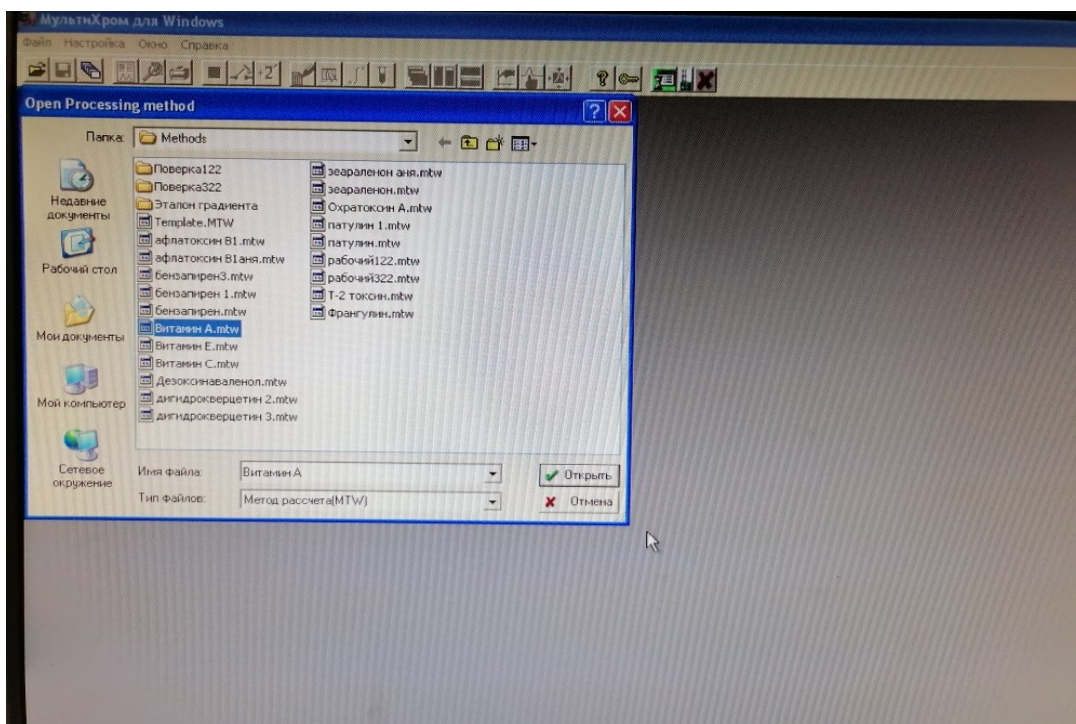


Рисунок 34 – Работа в программе МультиХром

Приготовление стандартного раствора ретинола (гидролизом ретинилацетата щёлочью). В колбу со шлифом ёмкостью 250 мл поместить около 4000 МЕ ретинилацетата в масле (фармакопейный препарат), добавить 200 мг пирогаллола или гидрохинона, 30 мл этилового спирта и 5 мл 50 %-го водного раствора КОН. Затем провести омыление с обратным холодильником на водяной бане ($T = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 30 мин, охладить до комнатной температуры, добавить 15 мл дистиллированной воды. Перенести содержимое

колбы делительную воронку емкостью 250 мл, промыть колбу 20 мл этилового спирта, который тоже перенести в делительную воронку (рисунок 35).

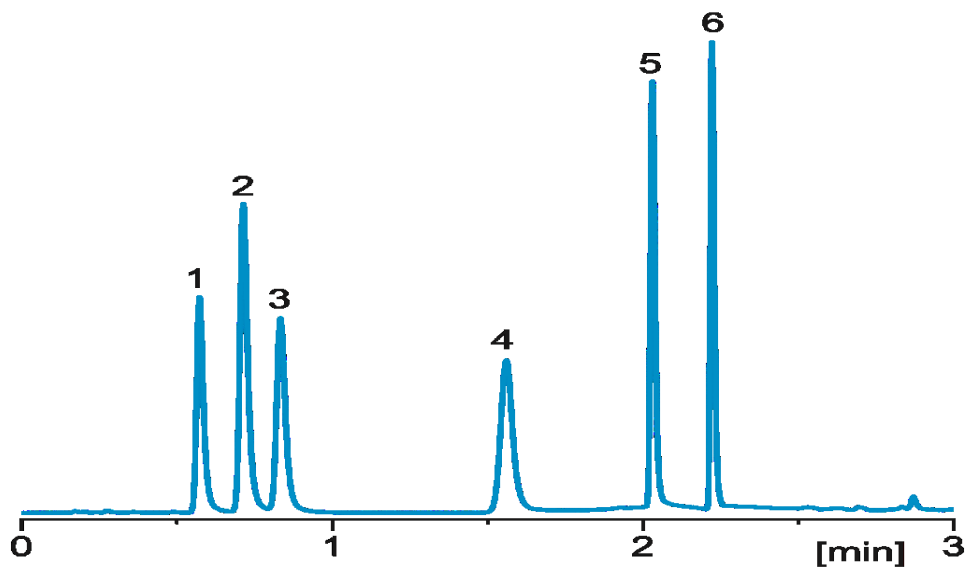


Рисунок 35 – Хроматограмма стандартного раствора ретинола, полученного гидролизом ретинил-ацетат щелочью: 1 – 13-цис-ретинол; 2 – полный транс ретинол

Экстрагируем ретинол 3 раза по 30 мл смесью серного эфира и гексана в соотношении 1:1. Промываем объединенный экстракт дистиллированной водой до нейтральной реакции вод по фенолфталеину. Затем переносим экстракт в колбу емкостью 150-250 мл, на дно которой помещают 5 г безводного сульфата натрия. Закрываем колбу пробкой и ставим на 40 минут в холодильник ($T = +4\text{ }^{\circ}\text{C}$). После чего переносим содержимое колбы в мерную колбу емкостью 250 мл, профильтровывая через бумажный фильтр, во избежание потерь промываем осушитель и фильтр 20 мл гексана, добавляем 50 мг бутилокситолуола и доводим объем раствора до метки гексаном. Концентрация ретинола в данном растворе равна 160 МЕ/мл, что необходимо проверить на спектрофотометре.

При определении содержания витамина А в комбикорме и биологических объектах концентрация витамина А должна быть 2,5-5,0 МЕ/мл, для премиксов - 5-100 МЕ/мл. Примечание: при хранении в холодильнике (+4 °С) стандартный раствор стабилен в течение 1 месяца.

Подготовка образцов и омыление. При необходимости образцы комбикормов, премиксов и биологических объектов измельчают (гомогенизируют). Помещают навеску в колбу со шлифом емкостью 150 или 250 мл, добавляют 150 мг пирогаллола или гидрохинона, этиловый спирт, щелочь и присоединяют обратный холодильник. Помещают в колбу водяную баню (Т=85°С) на 30 минут периодически перемешивают содержимое колбы. После обновления добавляют в колбу 15 мл дистиллированной воды и охлаждают до комнатной температуры (для быстроты охлаждения можно поместить в холодную воду).

Совместное определение ретинола и альфа-токоферола в плазме (сыворотке) крови. Диапазон концентраций: ретинол - 0,03-2,0 мкг/мл; альфа-токоферол - 0,5-20 мкг/мл. Принцип метода. Метод основан на осаждение белков плазмы (сыворотки) крови этиловым спиртом, экстракции липидов гексаном и последующем количественном в одновременном определении витамина А и Е методом микроколоночный нормально-фазной ВЭЖХ с УФ-детекцией.

Раствор бутилокситолуола (0,025 %-й) в этиловом спирте, Раствор бутилокситолуола (0,0125%-й) в гексане, Элюент для жидкостной хроматографии: гексан : пропанол-2 (99 : 1), Стандартный раствор ретинола (полный транс-ретинол) в гексане концентрацией от 0,1 до 1,0 мкг/мл (раствор 1), Стандартный раствор dl-альф-токоферола в гексане концентрацией от 0,... до 20 мкг/мл (раствор 2). Микроколоночный жидкостный хроматограф "Милихром" со сканирующим УФ-детектором, Колонка 64×2 мм или 120×2 мм, заполненная Силасорбом 600 (размер частиц 5 мкм), Встряхиватель, центрифуга с охлаждением ротора (рисунок 36).

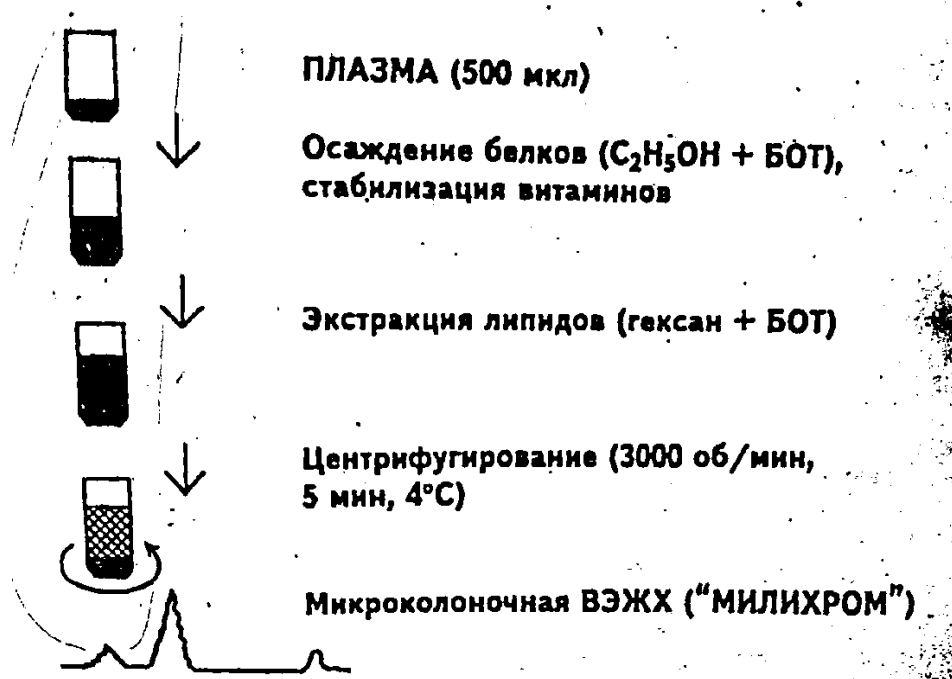


Рисунок 36 – Схема одновременного определения витаминов в плазме (сыворотке)

Подготовка образцов и экстракция. В полиэтиленовую пробирку с пробкой (50×10 мм) вносят 0,5 мл гепаринизированной плазмы крови, добавляют 0,5 мл 0,025 %-го спиртового раствора бутилокситолуола (БОТ), тщательно перемешивают, после способствует эффективному выпадению белков, приливают 0,0125 %-го раствора БОТ в гексане и встряхивают в течение 5 минут (на вортексе-вихревом стряхивателе – 30 с). Схема анализа представлена на рис. 12. Затем проводят центрифугирования (5 мин, 3000 об/мин, температура 4 °С, при отсутствии центрифуги с охлаждением можно охладить отдельно ротор в морозильнике и затем провести в нем центрифугирование). В результате центрифугирования в пробирках образуются два слоя: нижний, состоящий из спирта, водорастворимых веществ и белка, и верхний состоящий из гексана и липофильных компонентов. После центрифугирования помещаем пробирки на 30 мин в

холодильник. Верхний, гексановый слой (объем пробы 50... мкл), используем при анализе на микроколоночном жидкостном хроматографе.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Колонка 64*2 мм (или 120*2 мм), Силасбор 600 (размер частиц 5 мкм) (рисунок 37).

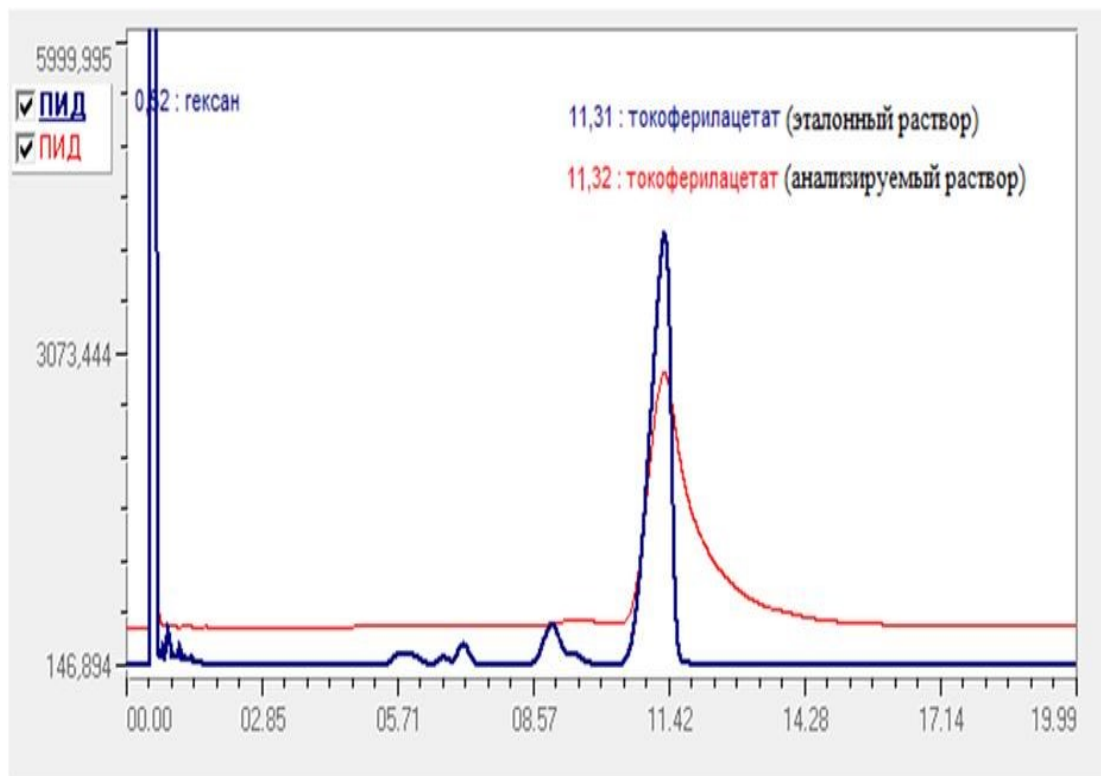


Рисунок 37 – Хроматограмма альфа-токоферола и ретинола из экстракта плазмы крови 1 – альфа-токоферол; 2 – ретинол

Идентификацию пиков проводят по стандартным веществам, а также по ультрафиолетовым спектрам разделяемых веществ, получать которые позволяет конструкция прибора. На рисунке показана типичная хроматограмма разделение витаминов А и Е, выделенных из липидного экстракта плазмы крови.

Обработка результатов анализа. Для количественного определения витаминов готовят стандартные растворы. Затем подготавливают пробы, как было описано для образца плазмы крови, но 0,5 мл плазмы крови заменяет

водой, экстракцию проводят стандартным раствором витаминов в гексане с известной концентрации.

После хроматографического анализа строят калибровочную кривую, откладывая по оси абсцисс концентрацию витаминов, а по оси ординат высоту (площадь) пиков. Затем рассчитывают калибровочный коэффициент по отношению высоты (площади) пика к его концентрации (он соответствует тангенсу угла наклона калибровочного графика). Содержание витаминов в плазме (сыворотке) крови определяют по калибровочной кривой или по формуле:

$$X \text{ (мкг/мл)} = h \times K \quad (1)$$

где,

h - высота (площадь) пика определяемого компонента, мм;

K - калибровочный коэффициент.

Полученные по калибровочной кривой или по формуле данные необходимо умножить на 2 (для учета объемов образца и гексана). При приведении концентрация витаминов А и Е в международной системе СИ (мкмоль/л) необходимо её значение в мкг/100 мл умножить на коэффициенты 0,024 и 0,039 соответственно. Среднее аналитическое выделение витаминов А и Е из образцов плазмы крови составляет 97-98 %.

Вопросы для самопроверки:

1. Виды хроматографии?
2. Жидкостный хроматограф и его принцип работы?
3. Органические вещества, которые используют для хроматографии?
4. Как сделать расшифровку хроматограммы?

Лабораторная работа №9

Оценка метода масс-спектрометрического скрининга в образцах рыбы

Цель работы: изучение метода масс-спектрометрического скрининга в образцах рыбы.

Оборудование и материалы: мышечная ткань рыбы, 0,2 % моногидрата п-толуолсульфоновой кислоты, ледяной уксусной кислоты, ацетонитриле, экстракционный картридж Oasis PRIME HLB 6 см³, масс-спектрометр высокого разрешения Thermo Q-Exactive Orbitrap (HRMS) с нагреваемым источником ионизации электроспрея и системой Thermo Ultimate 3000 LC, колонка LC представляет собой Supelco Ascentis Express C18 (7,5 см × 2,1 мм, 2,7 мкм), сорбенты.

Задания:

1. Изучить основные загрязнители в рыбной продукции.
2. Оценить метод масс-спектрометрического скрининга при исследовании рыбы.

Ход работы.

Способность обнаруживать химические загрязнители, включая остатки ветеринарных препаратов в продуктах животного происхождения, таких как рыба, является важным примером анализа безопасности пищевых продуктов. В настоящей работе метод скрининга жидкостной хроматографии с высоким разрешением масс-спектрометрии (LC-HRMS) с использованием квадрупольно-орбитального прибора был применен для анализа остатков ветеринарных препаратов в тканях животных аквакультурных канальных сомов, радужной форели и атлантического лосося, а также импортных аквакультурных продуктов, включая европейского угря, желтого горбуна и

тилапию. По сравнению с традиционными методами МС использование HRMS с нецелевым сбором данных и возможностью точного измерения массы значительно расширило область применения соединений, которые можно было бы контролировать одновременно.

Подготовка образцов рыбы. Мышечную ткань рыбы (филе) гомогенизируют до мелкого порошка с сухим льдом. Рыбья кожа включена в пробоподготовку. Образцы рыбы обычно готовятся так, как они были бы проданы потребителю (с кожей или без нее). Ткани хранят при температуре – 20 °С до тех пор, пока не будут использованы. Образцы извлекают по ранее описанному методу [13]. Вкратце гомогенизированную ткань (2,0 г) экстрагируют в 8 мл экстракционного раствора, состоящего из 0,2 % моногидрата п-толуолсульфоновой кислоты (Вт/В) и 2 % ледяной уксусной кислоты (в/в) в 100 % ацетонитриле. Образцы Вихрево перемешивают в течение 30 мин, а затем центрифугируют (17 000×г) в течение 7 мин. Для очистки порцию (3 мл) экстракта пропускают через экстракционный картридж Oasis PRIME HLB 6 см³ (200 мг; Waters Corp.). Сорбирующий материал в картридже Oasis PRIME HLB предназначен для устранения фосфолипидных помех без серьезных потерь при извлечении анализируемого вещества. Часть образца пропускают через картридж под действием силы тяжести, а последние несколько капель экстрагента осторожно проталкивают через колбу пипетки, в результате чего получают примерно 2 мл жидкости (рисунок 38).

Для анализа более неполярных аналитов, включая авермектины и Лейко-метаболиты трифенилметановых красителей, особенно в ткани лосося, 100 мкл элюента твердофазной экстракции переносят во флакон для отдельной инъекции LC-MS. Оставшуюся часть экстракта доводят до почти сухого состояния под действием азота, а затем восстанавливают 400 мкл 10 % ацетонитрила в воде (v/v), смешивают и центрифугируют (28 900×g) в течение 7 мин. Аликвоту объемом 300 мкл переносят в жидкокристаллический флакон для анализа.

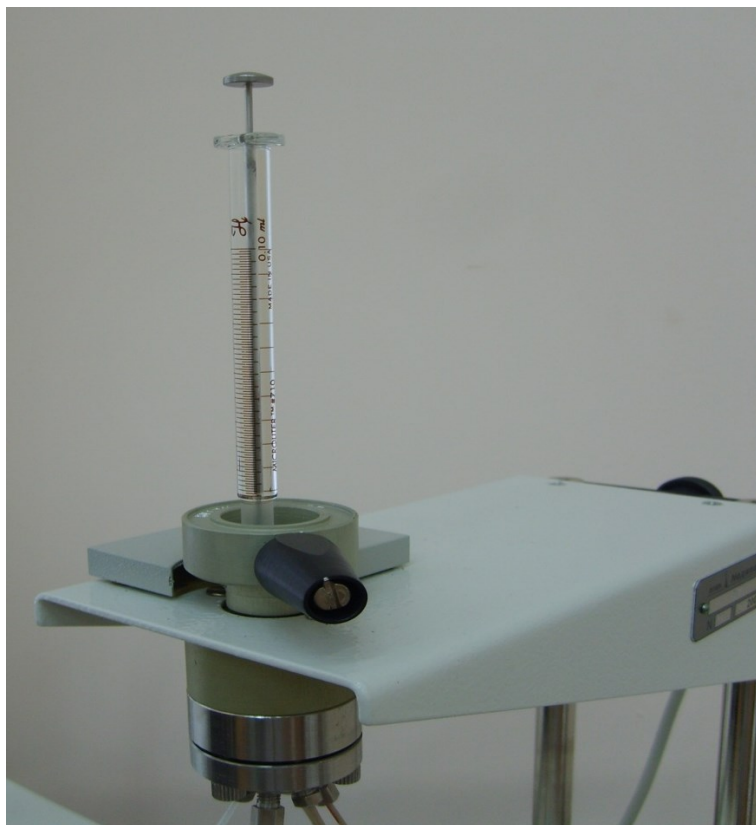


Рисунок 38 – Введение пробы

Для каждой партии произведенных или импортированных проб также анализируют отрицательные и положительные контрольные пробы, приготовленные из рыбы одного и того же вида. Положительный контрольный образец обогащен тест-соединениями, использованными ранее для валидации метода скрининга. Они включают 70 аналитов, представляющих широкий спектр аналитов и целевых уровней тестирования. Если реакция на одно из этих тестовых соединений, обнаруженного в произведенном или импортированном образце, была не менее 50 % от положительной (1× целевой уровень тестирования, ТТЛ) и соответствовала критериям идентификации [17], то образец считается предположительно положительным для этого соединения. Пороговый уровень отсечения 50 % по сравнению с положительным контролем устанавливают на основе измеренной дисперсии

отклика для анализируемых веществ, обогащенных рыбой, на уровне $1 \times \text{ТТЛ}$ [13]. Каждый тестовый образец извлекают и анализируют в двух экземплярах.

Инструментальный метод. В качестве прибора используют масс-спектрометр высокого разрешения Thermo Q-Exactive Orbitrap (HRMS) с нагреваемым источником ионизации электроспрея и системой Thermo Ultimate 3000 LC. Для сбора и анализа данных используют программы Thermo XCalibur (V.4.0) и TraceFinder (V.4. 1).

Колонка LC представляет собой Supelco Ascentis Express C18 (7,5 см \times 2,1 мм, 2,7 мкм). Подвижная фаза (0,3 мл/ мин) состоит из 0,1 % муравьиной кислоты в воде (а) и ацетонитрила (Б). Программа градиента LC выдерживалась при 5 % В в течение 1,5 мин, затем увеличивалась до 50 % В с 1,5 до 8,5 мин, затем до 99 % В с 8,5 до 9 мин и выдерживалась при 99 % В с 9 до 12 мин. Колонку повторно уравнивают при 5 % В в течение 2 мин перед следующей инъекцией. Другие параметры LC включают температуру печи при температуре 30 °С, лоток для образцов при температуре 10 °С и объем впрыска 10 или 20 мкл в зависимости от программы сбора данных.

Для анализа рыбных экстрактов используют две различные программы сбора MS. Обе программы сбора данных включают сканирование MS1 (m/z 150-1000), за которым следуют либо нецелевое сканирование всей ионной фрагментации (AIF) MS2, либо более целенаправленный сбор данных MS2 (DDMS2). Сбор АиФ первоначально используют для скрининга образцов с использованием инъекции рыбного экстракта в объеме 10 мкл. С AIF, все ионы прекурсора вводят в высокую клетку диссоциации столкновения (HCD) для того, чтобы сформировать ионы продукта одновременно. Отдельную инъекцию рыбного экстракта (20 мкл) проводят с использованием системы сбора данных DDMS 2, где MS2 данные собирают только тогда, когда Ион-предшественник из заранее определенного “списка включения” обнаруживают выше установленного порога. Когда это происходит, квадруполь фильтрует

Ион-предшественник в ячейку HCD, используя ограниченное окно m/z для получения фрагментарных ионов, связанных с этим соединением.

Из-за обновления программного обеспечения по сравнению с оригинальным методом некоторые настройки, особенно для DDMS2, немного изменены. В исследовании используют следующие настройки MS: aif full MS (разрешение 70К, 3e6 автоматическая регулировка усиления (AGC) цель, максимальное время впрыска 200 мс, диапазон сканирования m/z 150-1000) АиФ MS2 (70К разрешению, 3Э6 Ару цель, максимум вкачать время 200 мс, m/z 80-1000 сканирования диапазона, нормируемых энергии столкновения 10, 30, 50); ДДМС2 полный MS (70К разрешению, 5e6 Ару цель, максимум вкачать время 200 мс, m/z 150-1000 сканирования диапазона) ДДМС2 (17.5 К разрешению, 1e6 Ару цель, максимум вкачать времени 50 мс цикл граф 3, изоляция ширина 4 м/с Z, нормированная энергия столкновения 10, 30, 50) ДД параметров (интенсивность порога $2e4$, триггер Apex 0.1–6 сек, динамической изоляции 6 с) (рисунок 39).

Каждый полученный образец рыбы извлекают в двух экземплярах и анализируют (только положительные ионы) с помощью программ сбора данных AIF и DDMS2. Для анализа рыб, которые дозированы Амоксициллином или ампициллином, метод сбора данных DDMS 2 модифицирован с использованием списка включения, содержащего только β -лактамы соединения и метаболиты. Импортированные образцы рыбы анализируются АиФ и ДДМС-2 как в положительном, так и в отрицательном ионном режимах.



Рисунок 39 – Сорбенты

Данные анализируются с использованием программы количественного анализа данных, установленной для 70 валидированных соединений, чтобы определить, какие остатки удовлетворяют предполагаемым положительным критериям. Для того чтобы один из этих анализов был предположительно положительным, остаток должен был соответствовать качественному подтверждению критериев идентичности и имеют пиковую площадь $\geq 50\%$ по сравнению с матрично-экстрагированным стандартом при $1 \times \text{TTL}$ (положительный контроль).

Для поиска дополнительных остатков, выходящих за пределы валидированных тестовых соединений, используют метод скрининга данных Thermo TraceFinder, основанный на сравнении с базой данных соединений, содержащей ~ 350 потенциальных остатков ветеринарных препаратов, включая метаболиты и второстепенные компоненты. Критериями, используемыми в "методе скрининга", является допуск на массовую точность

3 ppm для Иона-предшественника, отношение сигнал / шум > 100 и сигнал >> 5000 отсчетов для первоначального обнаружения (рисунок 40).

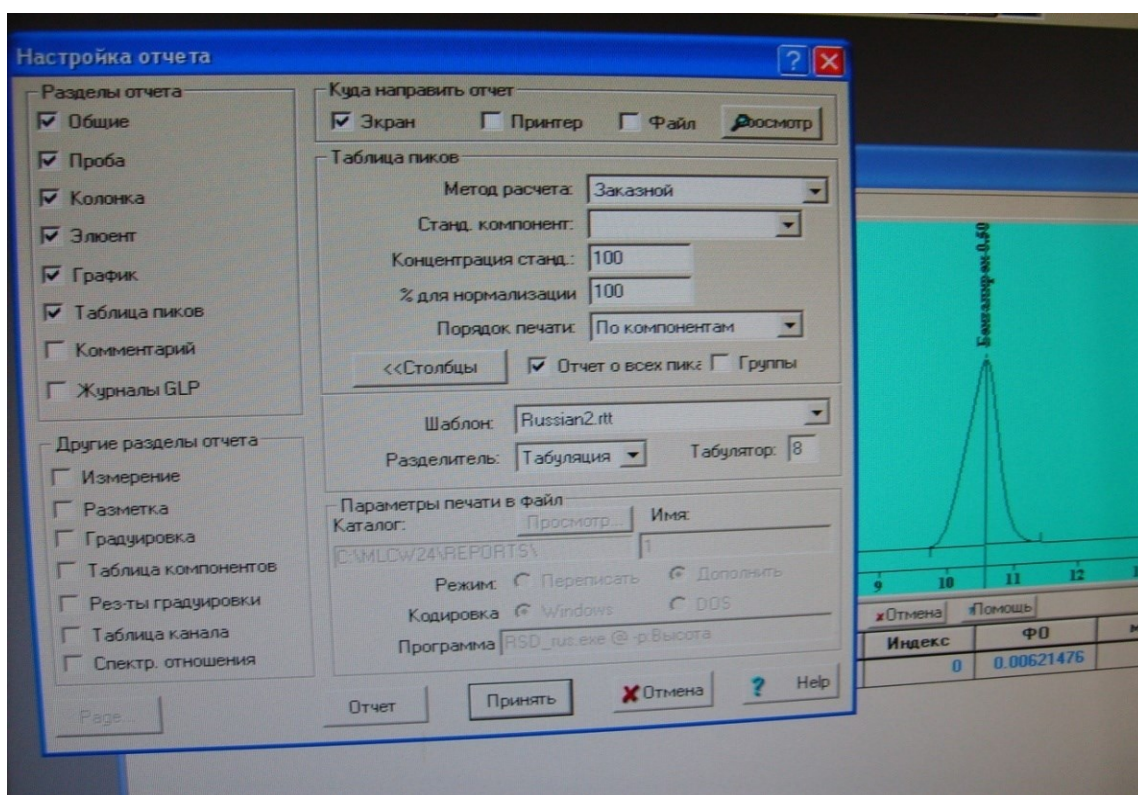


Рисунок 40 – Оформление результатов

Для подтверждения остатка с помощью программного обеспечения TraceFinder "метод скрининга" выбирают совпадение временного окна удержания в пределах 60 С и минимум одного фрагментарного Иона с порогом интенсивности > 500 отсчетов и допуском массы в пределах 10 ppm. Опция сопоставления изотопных паттернов также используют для фильтрации ложных обнаружений.

Кроме того, положительные результаты дополнительно оценивают на предмет валидности по следующим более субъективным критериям: интенсивность сигнала (предпочтительно пиковые области >1e>5), Гауссовская хроматографическая форма пика, повторяемость (соединение

обнаружено во всех репликах) и уникальность (пик обнаружен только в тестовых образцах, а не во всех образцах и контроле).

Вопросы для самопроверки:

1. Виды хроматографии?
2. Жидкостный хроматограф и его принцип работы?
3. Органические вещества, которые используют для хроматографии?
4. Как сделать расшифровку хроматограммы?

Лабораторная работа №10

Генетический анализ образца рыбы

Цель работы: изучить аспекты генетического анализа рыбы.

Оборудование и материалы: мышечная ткань рыбы, теста mode-shift, автоматический секвенсор ДНК ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems), точные тесты равновесия Харди-Вайнберга (HWE).

Задания:

1. Изучить основы генотипирование микросателлитов и секвенирование мтДНК.
2. Освоить ПЦР анализ в исследовании рыбы.

Ход работы.

1. Генотипирование микросателлитов и секвенирование мтДНК. Во-первых, все выборки должны быть генотипированы с использованием 22-из наших недавно разработанных мнимо нейтральных микросателлитных локусов, а именно, H5, H16 см, H22, H 26, сайт H31, h33 в, Ч37, В38, Х43, H44, H47, H51, Х54, H65, h70 технические характеристики, H71, Х75, В80, H82, H84, H106 и Х111 [15]. Кроме того, используют шесть микроспутников выявленных функциональных генов, в том числе гидромассажная шок протеин 27 (HSP27), гормон роста (GH), СС хемокина (KTC), рост дифференциации факторов-8 (GDF8), цитохрома Р450 (P450) и гепатоцеллюлярная карцинома-ассоциированный антиген 127 (HCA127), и микроспутников были расположены в 3 '- нетранслируемой или 5 ' - нетранслируемой этих генов. Эти гены, как хорошо известно, имеют функции в ответ на стресс, устойчивость к болезням, рост и развитие. Эти гены могут находиться под отбором в исследуемых популяциях. Эти локусы сначала генотипируют в нескольких образцах из разных географических регионов для

оценки генетической дифференциации. Поскольку популяционные генетические исследования предполагают, что локусы с относительно высоким уровнем дивергенции, вероятно, пострадают от естественного отбора, далее генотипировали все образцы, используя локусы с более высоким уровнем дифференцировки. Для вышеуказанных локусов прямые праймеры были 5'-мечены флуоресцентным красителем HEX или 6-FAM. ПЦР-амплификация также проводят в соответствии с консорциумом по разработке праймеров Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium. Продукты ПЦР разделяют на автоматическом секвенсоре ДНК ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems). Размер фрагмента измеряют в соответствии со стандартом ROX-500 с помощью GeneMapper (Applied Biosystems).

Двух фрагментов мтДНК Цитохром С оксидазы субъединицы (*KBIP*) и цитохрома В (*Cytb*) генов отбирают для секвенирования с использованием следующих праймеров наборы: 5'-cggtataatcttctttatag-3' и 5'-gtgtcatgaaggacaatgtc-3' для *KBIP*, и 5'-gcctgatgaaactttggctc-3' и 5'-caaggactccgcctagtttg-3' для цитохрома В, соответственно. Амплификацию ПЦР проводят в объеме 50 мкл, содержащем 0,5 мкм каждого праймера, 0,2 мм dNTP, 1,5 мм MgCl₂, 1×ПЦР-буфер, 1U Taq ДНК-полимераза (ферменты) и 20ng шаблон геномной ДНК. Программа ПЦР следующая: 5 мин при 94°C с последующим 35 циклами по 30 С при 94°C, 30 С при 55°C и 60 С при 72°C с окончательным продлением на 5 мин при 72°C. Затем продукты ПЦР очищают и используют в качестве шаблонов для секвенирования в обоих направлениях с помощью праймеров, приведенных выше. Работа по секвенированию также проводится на автоматическом секвенсоре ДНК ABI PRISM 3730. Последовательности депонируют в GenBank с регистрационными номерами JN243355-JN243749 и JN250600-JN250994.

2. Микроспутниковый анализ ДНК. Индексы генетической изменчивости, включая число аллелей (а), наблюдаемую гетерозиготность

(H_O), ожидаемую гетерозиготность (H_E), коэффициент инбридинга (F_{IS}) и богатство аллелей (A_R , оценка аллельного разнообразия независимо от размера выборки), рассчитывают в версии 2.9.3.2 FSTAT. Точные тесты равновесия Харди-Вайнберга (HWE) в каждой выборке для каждого локуса и дисбаланса связей (LD) между парами локусов тестируют с использованием методов Марковской цепи (10 000 демеморизаций, 1000 партий и 10 000 итераций на партию), выполненных в Genepop 4.0. Статистика Райта F и глобальные значения f_{ST} с 95% доверительным интервалом (Ди) также оценивают с использованием версии 2.9.3.2 FSTAT. Ошибки генотипирования и вклад нулевых аллелей проверяют с помощью Микрочекера. Статистическая способность обнаруживать генетическую дивергенцию измеряют для всех образцов и маркеров с помощью POWSIM 4.0 для оценки гипотезы генетической однородности в рамках точных тестов Фишера. Оценки мощности рассчитывают, как доля значимых результатов в 1000 раз моделирования.

Для нейтральности микроспутников используется Байесовский тест на основе моделирования, реализованный в BAYESCAN, чтобы проверить нейтральность микроспутников. Этот Байесовский метод основан на измерениях специфичных для локуса популяций F_{ST} , которые отражают вклад специфических для локуса эффектов, таких как отбор, и специфичных для популяции эффектов, таких как генетический дрейф и уровень иммиграции. Программа BAYESCAN определяет популяционные и локусные специфические эффекты на F_{ST} значения и оценки его апостериорной вероятности с использованием обратимого скачка Марковской цепи методом Монте-Карло (MCMC). Кроме того, мы использовали метод Бомонта и Николса, реализованный в программе LOSITAN. Этот метод предполагает, что выбывшие локусы при диверсифицирующем отборе будут демонстрировать повышенный уровень дифференциации популяции, и далее сравнивает уровень дифференциации популяции, коррелирующий с

гетерозиготностью в индивидуальном локусе, с моделируемым распределением локусов, основанным на наблюдаемом уровне дифференциации популяции. Однако недавно было показано, что результаты этого метода могут быть искажены наличием сильной иерархической структуры популяции и приводить к повышению уровня ложноположительных результатов. Поэтому мы дополнительно выполнили тест Excoffier et al., который основан на методе Бомонта и Николса в рамках иерархической островной модели. Выявление выброшенных локусов проводится в терминах F_{ST} во всех популяциях и в рамках модели из 10 групп, каждая из которых состоит из 50 популяций. Проводят этот тест на основе 100 000 смоделированных локусов и с помощью программного обеспечения Arlequin 3.5.

Структура населения оценивается с помощью попарных матриц F_{ST} , полученных путем вычисления попарной F-статистики Райта. В этом анализе оценивается два типа матриц F_{ST} : только нейтральные локусы и выброшенные локусы при диверсифицирующем отборе, обнаруженные в выбросных тестах. Значимость тестов вычисляют с помощью перестановки с 10.000 повторами с использованием ARLEQUIN 3.5. Для сравнения паттернов генетической структуры между / между этими типами маркеров проводят анализ главных компонент (PCA), основанный на данных частоты генов, с использованием PCAGEN. Также анализируют структуру популяции для нейтральных и целых наборов данных, используя программную структуру для визуализации генетической дивергенции между выборками и локациями. Эта программа используется для определения числа предполагаемых кластеров (K) и назначения отдельных лиц в соответствующие кластеры. Проводят этот анализ 20 раз в рамках модели примеси и используя 10^5 итераций после 10^5 итераций^{итераций} длина прожига при K колеблется от 1 до 8. Эти места включают в качестве Приоров, учитывая довольно низкую генетическую дивергенцию у этого вида. Наиболее вероятные структуры оценивают с использованием

методов К и ΔК. Влияние географической изоляции на генетическую структуру оценивают в виде изоляции по расстоянию (ВЗК) с использованием Мантельных тестов в программе IBD. Попарное расстояние оценивают как ближайшее морское расстояние между двумя коллекциями с помощью Google Maps (рисунок 41).



Рисунок 41 – Анализ рыбы

Популяционная структура нейтральных локусов также исследуют с использованием метода ландшафтной генетики в программном барьере. Эта программа направлена на выявление географических разрывов с генетическими разрывами в генетической структуре между популяциями. Устойчивость барьеров оценивают путем запуска барьера на 100 F_{ST} матрицах, генерируемых бутстрэппингом по локусам.

Для выяснения влияния различных факторов внешней среды на структурирование популяции используют иерархический байесовский подход Фолля и Гагиотти, реализованный в программе GESTE. Этот метод оценивает

конкретные значения F_{ST} для каждой популяции, а затем связывает их с факторами окружающей среды, используя обобщенную линейную модель.

В исследованиях оценивают семь переменных окружающей среды, включая температуру отбора проб и соленость, широту и долготу, а также историческую среднюю температуру в апреле, мае и апреле и мае, полученную из weather.sina.com.cn, что приводит к 2^7 (= 128) альтернативным регрессионным моделям. Этот метод вычисляет задние вероятности для каждой из этих моделей с использованием метода обратимого скачка MCMC. Проводят этот анализ с параметрами по умолчанию. Основываясь на результатах GESTE, также проверяют уровень корреляции между попарными F_{ST} и попарными различиями факторов окружающей среды с наибольшей задней вероятностью в тестах выбросов с использованием теста Мантеля. Так как вышеперечисленные факторы внешней среды считаются тесно связанными с поведением нерестовой миграции морских рыб, каминный тест был проведен только для доступных прибрежных образцов, которые гораздо более вероятны в состоянии нереста.

Демографическая история вариаций численности популяции изучается в виде избытка гетерозигот по нейтральным локусам с использованием программы Bottleneck версии 1.2.02. Поскольку потеря редких аллелей происходит гораздо быстрее, чем общих аллелей в популяциях, испытывающих узкие места, популяции, испытывающие недавнее сокращение размера, показали бы избыток гетерозигот по сравнению с популяциями, находящимися в равновесии с тем же числом аллелей. Этот анализ проводится в рамках двухфазной модели (TRM, с 90 % ступенчатой мутацией) с 1000 итерациями и с использованием теста mode-shift от Luikart et al. (рисунок 42).



Рисунок 42 – ПЦР анализ

3. Анализ митохондриальной ДНК. Последовательности ДНК редактируют и выравнивают с помощью BioEdit версии 7.0.5.3 и DnaSP 4.10.4. Суммарная статистика генетического разнообразия, включая разнообразие гаплотипов (h) и разнообразие нуклеотидов (π), рассчитывают с использованием ARLEQUIN 3.5.

Уровни генетической дифференцировки оценивают с помощью попарного F_{ST} , вычисленного в ARLEQUIN 3.5. Недавний поток генов между популяциями также оценивают в виде изоляции по расстоянию (IBD) с помощью теста Мантеля в программе IBD.

Филогенетический анализ последовательностей проводят методом максимального правдоподобия с использованием TREEFINDER и байесовским методом с использованием MrBayes 3.1.2. Перед этими двумя анализами наиболее подходящая эволюционная модель (GTR+I+G) оценивается с помощью информационного критерия Акайке (AIC) в программе ModelTest 3.7. Для байесовского метода проводят как секционированный, так и несекционированный анализ. Секционированный анализ выполняют по методу Wang et al. . Эту стратегию используют для

устранения эффекта несовместимости комбинаций последовательностей. В этом анализе запускают четыре независимые цепочки для поколений 2×10^6 с периодом выгорания 10^6 (рисунок 43).

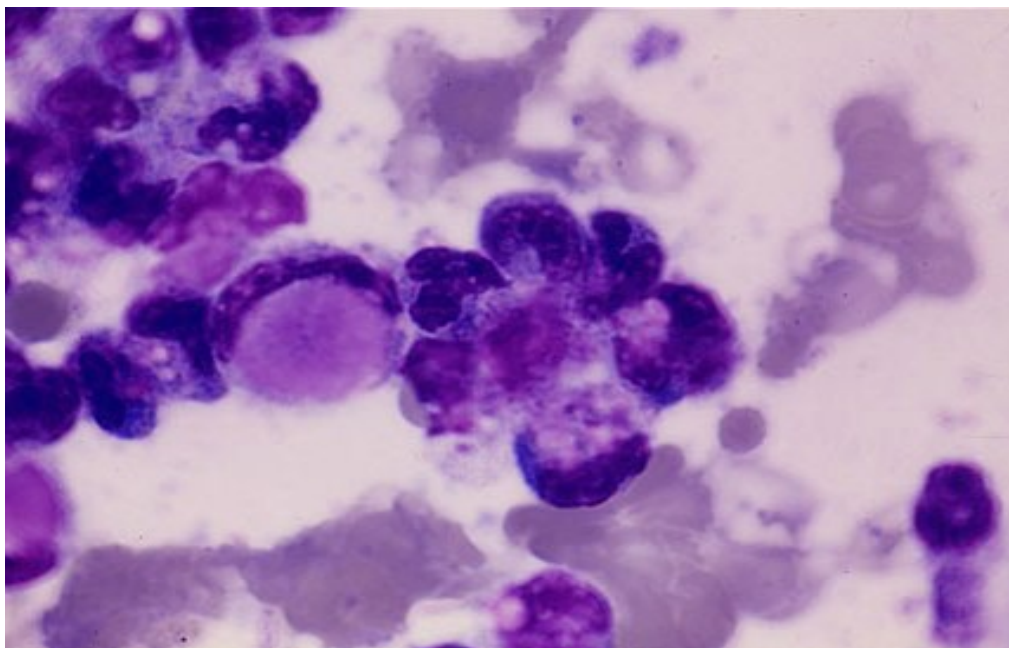


Рисунок 43 – Филогенетический анализ

Историческая популяционная экспансия изучается с использованием статистики Тадзимы D и Φ_{yS} с 10 000 перестановками, рассчитанными в ARLEQUIN 3.5. Демографическая история также проверяется с помощью распределения несоответствий. Популяции, пережившие недавнее расширение, демонстрируют плавное или унимодальное распределение, в то время как демографически стабильные популяции представляют собой рваные или мультимодальные паттерны распределения. Статистическая значимость проверяется с использованием суммы квадратов отклонения (SSD) и индекса неровности (R). Впоследствии оценивается время экспансии в популяциях, обнаруженных испытанными экспансию, используя уравнение $\tau = 2ut$, где τ - время экспансии, выраженное в виде мутационных единиц, u - скорость мутации за поколение, а t - время, измеренное в поколении с момента

экспансии. Частота мутаций между 1 % и 3 % в миллион лет для митохондриальных генов была выбрана в соответствии с Cantatore et al.

Вопросы для самопроверки:

1. Генетический анализ и его роль для исследования рыбы?
2. Индексы генетической изменчивости?
3. Методы выделения ДНК?

Список использованной литературы

1. Аринжанов, А.Е. Влияние наночастиц на гематологические показатели крови карпа [Электронный ресурс] / А.Е. Аринжанов, Е.П. Мирошникова, Ю.В. Килякова // Вестник мясного скотоводства. – 2013. – № 5 (83). – С. 92-97.
2. Влияние наночастиц металлов на физиологическое состояние и гематологические показатели крови рыб [Электронный ресурс] / А.Е. Аринжанов, Е.П. Мирошникова, Ю.В. Килякова, Е.А. Сизова // Российская аквакультура: состояние, потенциал и инновационные производства в развитии АПК: материалы Междунар. науч.-практ. конф. Воронеж: Воронежский ЦНТИ. – 2012. – С. 131-135.
3. Газиумарова, Л.Д. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника: инструкция по применению / Л.Д. Газиумарова, Л.П. Титов, Н.Л. Ключко. – Л. – Минск. – 2010. – 25 с.
4. Константинов, В.М. Сравнительная анатомия позвоночных животных / В.М. Константинов, С.П. Шаталова. – М.: Академия, 2005. – 304 с.
5. Мирошникова, Е.П. Влияние наночастиц различной дозировки на продуктивность карпа и обмен химических элементов = Effect of Nanoparticles Different Dosages Carp on Efficiency and Exchange of Chemical Elements [Электронный ресурс] / Е.П. Мирошникова, А.Е. Аринжанов, Ю.В. Килякова // Достижения науки и техники АПК. – 2014. – № 5. – С. 30-32.
6. Шарова, И.Х. Сравнительная анатомия и эволюция животных / И.Х. Шарова, К. В. Макаров. – М.: Энас, 2003. – 315 с.
7. Шмидт-Ниельсен, К. Физиология животных. Приспособление и среда: в 2 т. / К. Шмидт-Ниельсен. – М.: Мир, 1982. – 236 с.
8. Arakha, M. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface / M. Arakha, D. Samantarrai, T.

Panigrahi, B.C. Mallick, K. Pramanik, S. Jha // *Scientific reports*. – 2015. - № 5. – P. 14813 (doi: 10.1038/srep14813).

9. Ban, C. Improving flavonoid bioaccessibility using an edible oil-based lipid nanoparticle for oral delivery / C. Ban, S.J. Park, S. Lim, S.J. Choi, Y.J. Choi // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. - № 63. – 2015. - P. 5266-5272. (doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01495).

10. Castells, L. et al. Effect of different forage sources on performance and feeding behavior of Holstein calves / L. et al. Castells // *Journal of Dairy Science*. – 2012. – T. 95. – №. 1. – P. 286-293.

11. Connor, E.E. et al. Gene expression in the digestive tissues of ruminants and their relationships with feeding and digestive processes / E.E. et al. Connor // *Animal*. – 2010. – T. 4. – №. 7. – P. 993-1007.

12. Eugène, M. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants / M. Eugène, H. Archimede, D. Sauvant // *Livestock Production Science*. – 2004. – T. 85. – №. 1. – P. 81-97.

13. Feng, Z.V. Impacts of gold nanoparticle charge and ligand type on surface binding and toxicity to Gram-negative and Gram-positive bacteria / Z.V. Feng, I.L. Gunsolus, T.A. Qiu, K.R. Hurley, L.H. Nyberg, H. Frew, M.D. Torelli // *Chemical science*. – 2015. 6(9). – P. 5186-5196.

14. Gelvin, A.A. et al. Effect of field pea-based creep feed on intake, digestibility, ruminal fermentation, and performance by nursing calves grazing native range in western North Dakota / A.A. et al. Gelvin // *Journal of animal science*. – 2004. – T. 82. – №. 12. – P. 3589-3599.

15. Guilloteau, P. Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant: ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations / P. Guilloteau, R. Zabielski, J.W. Blum // *Physiol Pharmacol*. – 2009. – T. 60. – №. Suppl 1. – P. 37-46.

16. Haan, H.G. Studies on the Relationship Between Chromium (III) ion and Thyroid Peroxidase Activity in Sera of Patients with Thyroid Dysfunction. *Ibn*

AL-Haitham / H.G. Haan, T.J. Mahmood, P.A. Ismael // Journal For Pure and Applied Science. – 2017. 24(2). – P. 1-10.

17. Harmon, D.L. Factors affecting intestinal starch digestion in ruminants: A review / D.L. Harmon, R.M. Yamka, N.A. Elam // Canadian journal of animal science. – 2004. – T. 84. – №. 3. – P. 309-318.

18. Hepburn, D.D. In vivo distribution of chromium from chromium picolinate in rats and implications for the safety of the dietary supplement / D.D. Hepburn, J.B. Vincent // Chemical research in toxicology. – 2002. 15(2). – P. 93-100.

19. Hussain, N. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics / N. Hussain, V. Jaitley, A.T. Florence // Advanced drug delivery reviews. – 2001. 1(50). – P. 107-142.

20. Jasper, J. Effects of ad libitum milk intake on dairy calves / J. Jasper, D. M. Weary // Journal of Dairy Science. – 2002. – T. 85. – №. 11. – P. 3054-3058.

21. Lien, T.F. Nanoparticles of chromium picolinate enhance chromium digestibility and absorption / T.F. Lien, H.S. Yeh, F.Y. Lu, C.M. Fu // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2009. – 89(7). – P. 1164-1167.

22. Miller, K.P. Inorganic nanoparticles engineered to attack bacteria / K.P. Miller, L. Wang, B.C. Benicewicz, A.W. Decho // Chemical Society Reviews. – 2015. – 44(21). – P. 7787-7807 (doi:10.1039/c5cs00041f).

23. Preuss, H.G. Effects of different chromium compounds on blood pressure and lipid peroxidation in spontaneously hypertensive rats / H.G. Preuss, P.L. Grojec, S. Lieberman, R.A. Anderson // Clinical nephrology. – 1997. – 47(5). – P. 325-330.

24. Riales, R. Effect of chromium chloride supplementation on glucose tolerance and serum lipids including high-density lipoprotein of adult men / R. Riales, M.J. Albrink // Am. J. Clin. Nutr. - 1981. – 34. – P. 2670–2678.

25. Sizova, E.A. Comparative tests of ultradisperse alloy, salts and organic forms of Cu and Zn as sources of trace elements in the feeding of broiler chickens /

E.A. Sizova, S.A. Miroshnikov, S.V. Lebedev, Y.I. Levakhin, I.A. Babicheva, V.I. Kosilov // *Agricultural Biology*. – 2018. – 53(2). – P. 393-403. (doi: 10.15389/agrobiology.2018.2.393eng).

26. Wang, M.Q. Effects of chromium nanocomposite supplementation on blood metabolites, endocrine parameters and immune traits in finishing / M.Q. Wang, Z.R. Xu, L.Y. Zha, M.D. Lindemann // *Animal feed science and technology*. – 2007. – 139(1-2). – P. 69-80.