

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Н.А. Кленова, О.Н. Макурина, Е.В. Писарева, М.Ю. Языкова

**СПЕЦПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ ЖИВОТНЫХ, РАСТЕНИЙ И
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Издательство «С-Принт»
2013

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета
Самарского государственного университета*

ББК 28.072

К 50

Кленова Н.А., Макурина О.Н., Писарева Е.В., Языкова М.Ю.

Спецпрактикум по биохимии животных, растений и микроорганизмов. Учебное пособие. – Самара: Изд-во «С-Принт», 2013 – 148 с.

ISBN 978-5-903590-19-3

Учебное пособие предназначено для студентов и магистрантов, специализирующихся по биологической химии и микробиологии. Оно может быть использовано для подготовки и проведения исследований по курсовым и дипломным работам. В составе пособия представлены справочные сведения, дается подробное описание методик, задания для студентов учебного и исследовательского характера. Так как в пособии описаны множество современных методик определения активности ферментов, количественного определения белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот и низкомолекулярных органических и неорганических соединений, оно может быть полезным аспирантам и исследователям всех биологических специальностей.

Рецензенты: д.б.н., профессор Кавеленова Л.М.,
д.б.н., профессор Ведясова О.А.

РАЗДЕЛ 1. СПРАВОЧНЫЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Подготовка к проведению биохимических исследований

Для того чтобы биохимические исследования были выполнены качественно, а результаты получились достоверными, прежде всего, необходимо подготовить посуду, в которой будут проводиться эксперименты. Посуда должна использоваться только химически чистой.

Качественная подготовка посуды: пробирок, колб, стаканчиков, мерной посуды и пипеток предполагает предварительное полоскание её в проточной воде и дальнейшее замачивание в специальном растворе или хромовой смеси. При этом пробирки и колбочки замачивают в пластиковой ёмкости, а пипетки в высоком цилиндре. И те, и другие должны быть полностью заполнены моющим раствором.

Универсальный моющий раствор. На 10л водопроводной воды добавить 50мл жидкого моющего средства типа «Прогресс» и 20мл 3%-ного раствора перекиси водорода.

Очень важно, чтобы раствор не содержал абразивных компонентов, которые царапают стекло. После 2-х часового замачивания посуда отмывается с применением ершей для мытья посуды, и тщательно промывается под проточной водой. Перед этим готовится ёмкость с дистиллированной водой, куда промытая посуда погружается. Из дистиллированной воды посуда помещается в сушильный шкаф в штативах или больших стаканах (пробирки) в перевернутом состоянии, колбы и стаканчики также переворачиваются. Время высушивания 2 часа при температуре 160-170°C. Мерная посуда должна сушиться при температуре не более 50°C.

Если посуда сильно загрязнена или невозможно использование фосфатсодержащих моющих средств, применяют хромовую смесь.

Хромовая смесь. Бихромат калия 60г, концентрированная серная кислота 80мл, дист. вода 270мл.

1.2. Приготовление и концентрации растворов

Для приготовления растворов нужной концентрации навеску необходимо поместить в чистый стаканчик подходящего размера и добавить небольшое количество растворителя. Размешать стеклянной палочкой или, если растворение затруднено, целесообразно стаканчик поставить на магнитную мешалку. Для некоторых веществ необходимо помещение в водяную баню или нагревание на плитке. Такие условия растворения обычно указываются в методике. После растворения, раствор количественно переносится в мерную колбу соответствующей ёмкости (50, 100, 200, 250, 500 или 1000мл) в зависимости от сделанной навески и доводится дистиллированной водой до метки.

После приготовления раствора, он должен быть обязательно перенесен во флакон для хранения и использования. Ни в коем случае нельзя хранить раствор в мерной посуде. Флакон с реактивом должен быть тщательно промаркирован. Необходимо указать название соединения, его концентрацию, дату приготовления, а для буферного раствора и pH.

Процентная концентрация. Количество граммов вещества в 100мл раствора (г%). Иногда применяется выражение мг% – количество мг в 100мл раствора. Раствор процентной концентрации приготовить проще всего, навеска определяется самой концентрацией: 3% – 3г на 100мл раствора и т.п. Однако необходимо учитывать, что некоторые вещества выпускаются в виде кристаллогидратов с

определенным количеством воды в составе. В таком случае необходимо сделать пересчет на содержание воды.

Например: Необходимо приготовить 0,5%-ный раствор сернокислой меди, а она представлена в виде кристаллогидрата: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Рассчитываем долю сернокислой меди в совокупном молекулярном весе кристаллогидрата:

$$\text{М.М. CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 64 + 32 + 64 + 5 \times 18 = 250$$

$$\text{М.М. CuSO}_4 - 64 + 32 + 64 = 160.$$

Далее составляем пропорцию:

250г содержат 160г CuSO_4

X г — 0,5г

$$X = 0,5 \times 250 / 160 = 0,78\text{г}$$

Таким образом, чтобы приготовить 100мл 0,5% раствора сернокислой меди необходимо взвесить 0,78г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и довести до 100мл дистиллированной водой.

Молярная концентрация. Понятие конечной концентрации. Молярная концентрация – количество грамм (мг; мкг) – молей вещества в 1000мл раствора. Конечная концентрация – это количество вещества (в М, mM, мкМ), которое должно содержаться в растворе, если его объем равнялся бы одному литру.

Например, необходимо приготовить 0,154М раствор NaCl в объеме 200мл.

Рассчитываем М.М. NaCl: $23 + 35,5 = 58,5$ г. Умножаем М.М. на необходимую нам молярность: $58,5 \times 0,154 = 9,00$ г. На 1000 мл навеска будет равна 9г, а на 200мл – 1,80г. Не трудно догадаться, что данная концентрация соответствует физиологическому раствору – 0,9%.

Допустим, нам необходимо рассчитать количество NaCl в 3мл пробы, если известно, что его конечная концентрация 0,154М. Составляем пропорцию:

1000мл содержат — 9г хлористого натрия;

3мл содержат — Xг,

$$X = 3 \times 9 / 1000 = 0,027\text{г или } 27\text{мг.}$$

Нормальная концентрация. Нормальная концентрация – это количество г (мг, мкг)-эквалентов в 1000мл раствора. Грамм-эквивалент рассчитывается делением М.М. на валентность. Нормальная концентрация используется в биохимии реже, чем молярная, в основном для кислот и щелочей.

Например, необходимо приготовить 0,1Н раствор NaOH. Рассчитаем М.М. NaOH: $23 + 16 + 1 = 40$. Валентность натрия равна единице, поэтому нормальность будет совпадать с молярной концентрацией.

$$X = 40 \times 0,1 = 4\text{г на } 1000\text{мл.}$$

Приготовление растворов кислот имеет определенные особенности. Большая часть кислот являются жидкостями и представлены уже в виде растворов. На этикетке указана процентность и плотность кислоты. Чтобы найти содержание кислоты в определенном объеме раствора, необходимо рассчитать *объемную массу*.

Например, в лаборатории имеется соляная кислота 36% с плотностью 1,174г/мл. Объемная плотность находится умножением процентности на плотность раствора:

$$X = 36 \times 1,174 = 42,26\text{г.}$$

Таким образом, в 100мл раствора на самом деле содержится 42,26г соляной кислоты. Исходя из этого, рассчитывается объем раствора кислоты, который необходим для приготовления раствора определенной концентрации.

Например, необходимо приготовить 100мл 0,1М HCl. Рассчитаем M.M.HCl: $1 + 35,5 = 36,5$. Для приготовления 100мл 0,1М раствора соляной кислоты нужно 0,365г кислоты. Определяем, сколько мл раствора 36% кислоты, плотностью 1,174 нам необходимо взять. Сначала найдем сколько кислоты должно содержаться в 100мл нашего раствора:

$$X = 0,365 \times 1,174 = 0,429\text{г}$$

Составляем пропорцию:

100 мл соляной кислоты содержат — 42,26г

X мл — 0,429г

$$X = 0,429 \times 100 / 42,26 = 1,02\text{мл}$$

Таким образом, чтобы приготовить 100мл 0,1М раствора из 36%-ной соляной кислоты, плотностью 1,174г/мл нужно взять 1,02мл этой кислоты и довести раствор до 100мл дистиллированной водой.

1.3. Расчет составов инкубационных смесей. Задания для студентов

Для определения концентраций различных веществ (субстратов, метаболитов, продуктов, медиаторов), а также для измерения активностей ферментов используют различного рода смесей, в которых происходит необходимая специфическая химическая реакция. Такие смеси обычно называют инкубационными, так как, кроме состава, они характеризуются определенными условиями протекания реакций (инкубацией).

Состав инкубационных смесей всегда указывается в конечных концентрациях. Так как реакции обычно проводятся в определенных объемах (кюветы, измерительные сосуды, колбы), задачей исследователя становится расчет оптимальных объемных соотношений ингредиентов смеси. При этом целесообразно учитывать следующие моменты:

- А) условия хранения ингредиентов;
- Б) дефицитность части реактивов;
- В) необходимость устранения неточностей взвешивания.

Задания для студентов

1. Рассчитайте состав 50мл инкубационной смеси, если она содержит 0,1М ТРИС-HCl, 5мМ ЭДТА, 2мМ NADP, 2мМ глюкозо-6-фосфата, 0,05мМ хлористого магния.

2. Инкубационная смесь для определения активности феррицианидредуктазы содержит 0,01М ТРИС-HCl, 5мМ ЭДТА, 0,2мМ $K_3Fe(CN)_6$, 0,2мМ NADH. Рассчитайте состав смеси на 10мл. Определите возможные объемные соотношения ингредиентов, если объем смеси не должен превышать 4 мл (объем кюветы).

1.4. Буферные растворы. Приготовление и свойства буферных растворов

Концентрация водородных ионов в клетках и внутренней среде организма является мощным и быстрым регулятором биохимических процессов. Для проведения биохимических исследований используются различные буферные растворы, поддерживающие pH, необходимый для протекания реакций.

Буферные растворы обычно состоят из 2-х составных частей: более кислой (кислота или кислая соль) и более щелочной (щелочь или щелочная соль). Необходимая концентрация водородных ионов достигается смешиванием их в определенных пропорциях. Буферная ёмкость зависит от свойств составных частей и их молярности. Молярность буфера определяется молярностью его составных частей.

Некоторые буферные растворы готовятся по-другому. Например, ТРИС-буфер. Его молярность определяется только гидрооксиметиламинометаном (ТРИС), навеска которого рассчитывается, а количество соляной кислоты либо находят по прописи, либо экспериментально – доводя буфер до необходимого pH прямо на pH-метре.

Буферные растворы прежде всего характеризуются буферной ёмкостью. *Буферная ёмкость* – это количество мл сильной кислоты или основания, которое необходимо добавить к 1л буферного раствора, чтобы изменить его pH на 1 единицу.

Задания для студентов

А. Определение и сравнение буферных ёмкостей различных буферов

1. Приготовьте составные части для натрий-фосфатного и цитратного буферов.

2. Подготовьте стаканчики ёмкостью 50-100мл для приготовления буферных смесей.

3. Для приготовления смесей с pH 6,0; 7,0; 8,0, используйте составные части для натрий-фосфатного буфера. Подготовьте буферы с разной молярностью: 0,1M; 0,05M; 0,01M.

4. Для приготовления смесей с pH 4,0; 5,0 используйте составные части для цитратного буфера. Подготовьте буферы с той же молярностью, как и фосфатные.

5. Определите буферную ёмкость приготовленных смесей, используя 0,1N раствор NaOH и 0,1N HCl.

Для этого в стаканчик внесите 50 мл определенной буферной смеси, поместите его на pH-метр, отметьте его pH, выдаваемый прибором (небольшое несоответствие, зависящее от точности приготовления и сливания растворов, а также от калибровки pH-метра, можно в данном случае не учитывать). Затем, используя либо кислоту, либо основание, определите количество мл, пошедшее на сдвиг pH на одну единицу.

Рассчитайте буферную ёмкость по формуле:

$$B = V \times N \times 200,$$

где B – буферная ёмкость, мл; V – объем кислоты или щелочи, пошедшей на сдвиг pH; N – нормальность кислоты или щелочи; 200 – коэффициент пересчета на 1000 мл буфера.

Данные занесите в таблицу:

Молярность буфера	Буферная ёмкость, мл			
	Фосфатный буфер		Цитратный буфер	
	0,1N NaOH	0,1N HCl	0,1N NaOH	0,1N HCl
0,1M				
0,05M				
0,01M				

Сделайте выводы о различиях буферной ёмкости данных буферов одинаковой молярности по кислоте и основанию. Чем это обусловлено?

Б. Определение буферной ёмкости сыворотки или плазмы крови

В крови буферная ёмкость определяется наличием трех буферных систем: гемоглобиновой (гемоглобин – калиевые соли гемоглобина); бикарбонатной (угольная кислота – бикарбонат натрия); фосфатной (однозамещенный и двузамещенный фосфорнокислый натрий).

1. Определите рН сыворотки или плазмы с помощью рН-метра.

2. Разведите сыворотку или плазму в два раза дистиллированной водой (рН дистиллированной воды должен равняться 7,0). Определите, изменяется ли рН.

3. Проведите определение буферной ёмкости сыворотки или плазмы по кислоте и по щелочи, учитывая разведение.

Ответьте на следующие вопросы: 1. Изменяется ли рН сыворотки и плазмы при разведении дистиллированной водой?

2. Буферная ёмкость сыворотки или плазмы выше по кислоте или по основанию?

Ответы обоснуйте.

2.3. Методы стандартизации. Выводы формул расчета концентраций метаболитов и активностей ферментов. Единицы измерений

В современных биохимических исследованиях для определения концентрации веществ используют чаще всего методы абсорбционного анализа: фотокolorиметрический, спектрофотометрический. В данном случае для расчетов пользуются законом Бугера-Ламберта-Бера. Согласно данному закону *концентрация вещества в растворе прямо пропорциональна оптической плотности, толщине поглощающего слоя и зависит от длины волны.* Так как оптическая плотность представляет собой логарифм отношения интенсивности падающего света (I_0) к интенсивности проходящего (I), то запись закономерности выглядит следующим образом:

$$\lg I_0/I = a \cdot C / l \quad \text{или} \quad E = a \cdot C / l$$

где E – оптическая плотность, a – коэффициент пропорциональности (коэффициент экстинкции).

Если концентрация равна 1М, а толщина поглощающего слоя – 1см, то коэффициент экстинкции обозначается как *молярный коэффициент экстинкции* и имеет размерность $M^{-1} \cdot cm^{-1}$. Молярный коэффициент экстинкции обозначается греческой буквой ϵ .

Коэффициент экстинкции можно определить по калибровочному графику зависимости E от C .

$$A = \sum (E_i / C_i) / n$$

Принципы составления формул расчета. При составлении формул расчета необходимо запомнить следующие принципы. В числитель всегда помещают значения оптической плотности после отнятия контрольного значения, разведение исходной биологической субстанции, объем инкубационной смеси в кювете. В знаменатель – коэффициент экстинкции (или молярный коэффициент экстинкции, если концентрацию можно выразить в молях), объем исследуемой жидкости в составе смеси, время инкубации (для определения активности ферментов).

$$X \text{ M/(мин)} = \frac{\Delta E \times P \times V_1}{\epsilon \text{ (или } a) \times V_2 \times (t)}$$

Иногда необходимо стандартизировать полученные результаты в зависимости от взятой навески ткани, количества клеток, содержания белка. В таком случае в знаменатель также вносится величина навески, содержание белка или количество клеток в определенном объеме исследуемого материала.

Расчет концентраций содержания различных субстратов может осуществляться также с помощью эталонных растворов с известным количеством определяемого вещества (расчет по стандарту). Проба, содержащая известное количество определяемого соединения, проводится через все стадии методики, как и опытная, а затем расчет осуществляется по формуле:

$$X (M, mM, \mu M) = C \times E_{оп.} / E_{ст.},$$

где C – концентрация вещества в стандарте (M, mM, мкM);

E оп. – оптическая плотность опытной пробы (либо показатель флуоресценции);

E ст. – подобный показатель у стандартной пробы.

Единицы измерений. Обычно используется система СИ – моль (M), кг, л, секунда, метр. Но могут быть использованы более удобные миллимоли (mM), микромоли (μM), нанометры, минуты, часы. Для единиц активности ферментов существует международная единица активности – U (кат), которая представляет собой M/мин × литр.

Задания для студентов

1. Инкубационная смесь для определения активности феррицианидредуктазы содержит 0,01M ТРИС-HCl, 5mM ЭДТА, 0,2mM K₃Fe (CN)₆, 0,2mM NADH. Составьте формулу расчета активности фермента, если известно, что стандартизация проб осуществляется за счет определения гемоглобина в исследуемых гемолизатах эритроцитов и выражается в г/л, а время инкубации составляет 10 минут. Молярный коэффициент экстинкции НАДН равен 6220M⁻¹см⁻¹.

2. Для определения активности ЛДГ (лактатдегидрогеназы) используют 3,0мл фосфатного буфера 0,1M, pH 7,4; 0,1мл раствора НАДН 6mM; 0,1мл раствора пировинограднокислого натрия 6mM; Реакция измеряется в течение 3 минут. Молярный коэффициент активности для НАДН – 6220M⁻¹см⁻¹. Составьте формы расчета активности ЛДГ в mM НАДН в минуту на мг белка в мл, если для определения активности используются: а) сыворотка крови (0,1мл) с содержанием белка 65г/л; б) гемолизат эритроцитов (10мл), содержащий 2,5г гемоглобина на литр.

1.6. Прописи наиболее часто применяемых буферных растворов

1. HCl-KCl, буфер (Clark and Lubs) 0,1M; pH от 1,1 до 2,2

pH (20°C)	0,2M HCl, мл	0,2M KCl, мл	pH (20°C)	0,2M HCl, мл	0,2M KCl, мл
1,1	47,3	2,7	1,7	11,9	38,1
1,2	37,6	12,5	1,8	9,4	40,6
1,3	29,8	20,2	1,9	7,5	42,5
1,4	23,7	26,3	2,0	6,0	44,1
1,5	18,8	31,2	2,1	4,7	45,3
1,6	15,0	35,0	2,2	3,8	46,2

Каждый раствор доводят до 100мл дист.водой. При практическом использовании pH имеет одинаковую величину от 20 до 60°C.

2. Глицин-HCl буфер, 0,05M; pH 2,2-3,6

Глицин, М.М. 75,07

pH	0,2M глицин, мл	0,2M HCl, мл	pH	0,2M глицин, мл	0,2M HCl, мл
2,2	50	44,0	3,0	50	11,4
2,4	50	32,4	3,2	50	8,2
2,6	50	24,2	3,4	50	6,4
2,8	50	16,8	3,6	50	5,0

Общий объем довести до 200мл дист.водой.

3. Цитратный буфер, 0,1M; pH 3,0-6,6

Лимонная кислота, М.М.210,14; Цитрат натрия трехзамещенный×2H₂O, М.М. 294

pH	0,1M лимонная к-та, мл	0,1M цитрат натрия, мл	pH	0,1M лимонная к-та, мл	0,1M цитрат натрия, мл
3,0	18,6	1,4	5,0	8,2	11,8
3,2	17,2	2,8	5,2	7,3	12,7
3,4	16,0	4,0	5,4	6,4	13,6
3,6	14,9	5,1	5,6	5,5	14,5
3,8	14,0	6,0	5,8	4,7	15,3
4,0	13,1	6,9	6,0	3,8	16,2
4,2	12,3	7,7	6,2	2,8	17,2
4,4	11,4	8,6	6,4	2,0	18,0
4,6	10,3	9,7	6,6	1,4	18,0

Общий объем довести 100мл дист.водой.

4. Ацетатный буфер, 0,2M или 0,1M; pH 3,6-5,8

pH, 25°C	0,2M CH ₃ COOH, мл	0,2M CH ₃ COONa, мл	pH	0,2M CH ₃ COOH, мл	0,2M CH ₃ COONa, мл
3,6	92,5	7,5	4,8	41,0	59,0
3,8	88,0	12,0	5,0	30,0	70,0
4,0	82,0	18,0	5,2	21,0	79,0
4,2	73,0	26,5	5,4	14,0	86,0
4,4	63,0	37,0	5,6	9,0	91,0
4,6	52,0	48,0	5,8	6,0	94,0

Общий объем 200мл (+ 100мл дист.воды) (0,1M буфер) или 100мл 0,2M буфер.

5. Янтарная кислота – NaOH буфер, 0,05 M; pH 3,8-6,0

Янтарная кислота М.М. 118,09

pH	0,2M янтарная к-та, мл	0,2M NaOH, мл	pH	0,2M янтарная к-та, мл	0,2M NaOH, мл
3,8	25	7,5	5,0	25	26,7
4,0	25	10,0	5,2	25	30,3
4,2	25	13,3	5,4	25	34,2
4,4	25	16,7	5,6	25	37,5
4,6	25	20,0	5,8	25	40,7
4,8	25	23,5	6,0	25	43,5

Общий объем 100мл доводится дист. водой.

6. Калий /натрий фосфатный буфер, 0,05М, рН 5,8-8,0
 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$

рН	0,2М		рН	0,2N	
	KH_2PO_4 , мл	NaOH , мл		KH_2PO_4 , мл	NaOH , мл
5,8	50	3,72	7,0	50	29,63
6,0	50	5,70	7,2	50	35,00
6,2	50	8,60	7,4	50	39,50
6,4	50	12,60	7,6	50	42,80
6,6	50	17,80	7,8	50	45,20
6,8	50	23,65	8,0	50	46,80

Общий объем 200мл доводится дист. водой.

7. Натрий-фосфатный буфер, 0,1М, рН 5,8-8,0

рН	0,2М NaH_2PO_4		рН	0,2М NaH_2PO_4	
	мл	NaH_2PO_4 , мл		мл	NaH_2PO_4 , мл
5,8	8,0	92,0	7,0	61,0	39,0
6,0	12,3	87,7	7,2	72,0	28,0
6,2	18,5	81,5	7,4	81,0	19,0
6,4	26,5	73,5	7,6	87,0	13,0
6,6	37,5	62,5	7,8	91,5	8,5
6,8	49,0	51,0	8,0	94,7	5,3

Общий объем 200мл доводится дист.водой.

8. Триэтаноламин-НСI буфер. 0,005М, рН 7,1-8,6
 М.М. триэтанолamina (ТЭА) – 149,2

рН, 25°C	0,2N HCl , мл	0,01M ТЭА, мл	рН, 25°C	0,2 N HCl , мл	0,01M ТЭА, мл
7,10	8,13	10	7,94	4,06	10
7,35	7,11	10	8,13	3,05	10
7,57	6,10	10	8,37	2,03	10
7,76	5,08	10	8,62	1,02	10

Общий объем довести до 20мл дист. водой.

9. Трис-НСI буфер, 0,05М, рН 7,2-9,1
 Трис – гидрооксиметиламинометан – М.М. 121,14

рН		0,1N HCl , мл	0,2 М трис, мл	рН		0,1N HCl , мл	0,2M трис, мл
23°C	37°C			23°C	37°C		
9,1	8,95	5,0	25	8,05	7,90	27,5	25
8,97	8,78		25	7,96	7,82	30,0	25
8,74	8,60		25	7,87	7,73	32,5	25
8,62	8,48		25	7,77	7,63	35,0	25
8,50	8,37		25	7,66	7,52	37,5	25
8,40	8,27		25	7,54	7,40	40,0	25
8,32	8,18		25	7,36	7,22	42,5	25
8,23	8,10		25	7,20	7,05	45,0	25
8,14	8,00		25				

Общий объем довести до 100мл дист.водой.

10. Карбонат/бикарбонатный буфер, 0,1 М, рН 9,1-10,6.

Общий объем – 100мл.

рН (25 ⁰ С)	0,1М Na ₂ CO ₃ , мл	0,1М NaHCO ₃ , мл	рН (25 ⁰ С)	0,1М Na ₂ CO ₃ , мл	0,1М NaHCO ₃ , мл
9,1	11,3	88,7	9,9	51,5	48,5
9,2	14,0	86,0	10,0	58,0	42,0
9,3	18,0	82,0	10,1	64,0	36,0
9,4	22,0	78,0	10,2	69,5	30,5
9,5	27,0	73,0	10,3	74,5	25,5
9,6	32,5	67,5	10,4	79,0	21,0
9,7	38,5	61,5	10,5	83,5	16,5
9,8	45,0	55,0	10,6	88,0	12,0

1.7. Международная система единиц СИ

Основными единицами системы СИ являются метр, килограмм, секунда, ампер, кельвин, кандела и моль. В международной системе единиц имеется только одна единица СИ для каждой физической величины. Для построения десятичных, кратных и дольных единиц СИ может использоваться любая из рекомендуемых десятичных приставок, называемых приставками СИ.

Приставки к единицам СИ

Множитель	Приставка	Обозначение	Множитель	Приставка	Обозначение
10 ⁻¹	деци	д	10	деко	да
10 ⁻²	санти	с	10 ²	гекто	г
10 ⁻³	милли	м	10 ³	кило	к
10 ⁻⁶	микро	мк	10 ⁶	мега	м
10 ⁻⁹	нано	н	10 ⁹	гига	г
10 ⁻¹²	пико	п	10 ¹²	тера	т
10 ⁻¹⁵	фемто	ф	10 ¹⁵	пета	п
10 ⁻¹⁸	атто	а	10 ¹⁸	екса	е

Наиболее часто употребляемые единицы измерений

Наименование единицы	Символ		Определение
	русский	латинский	
метр	м	m	-
миллиметр	мм	mm	10 ⁻³ м
микрометр	мкм	μm	10 ⁻⁶ м
нанометр	нм	nm	10 ⁻⁹ м
пикометр	пм	pm	10 ⁻¹² м
килограмм	кг	kg	-
грамм	г	g	10 ⁻³ кг
миллиграмм	мг	mg	10 ⁻⁶ кг
микрограмм	мкг	μg	10 ⁻⁹ кг
нанограмм	нг	ng	10 ⁻¹² кг
пикограмм	пг	pg	10 ⁻¹⁵ кг
литр	л	l	10 ⁻³ м ³
миллилитр	мл	ml	10 ⁻⁶ м ³ (10 ⁻³ л)
микролитр	мкл	μl	10 ⁻⁹ м ³ (10 ⁻⁶ л)
нанолитр	нл	nl	10 ⁻¹² м ³ (10 ⁻⁹ л)
пиколитр	пл	pl	10 ⁻¹⁵ м ³ (10 ⁻¹² л)

1.8. Характеристика сефадексов и других гранулированных гелей

Гидрофильные гели с трехмерной пространственной структурой молекулярной решетки обладают свойствами молекулярных сит. Они используются для очистки и разделения различных смесей веществ в методе эксклюзионной хроматографии – жидкостной хроматографии, основанной на неодинаковой способности молекул разного размера проникать в поры неионогенного геля, который служит неподвижной фазой. Различают гель-проникающую хроматографию (элюент – органический растворитель) и гель-фильтрацию (элюент – вода или буферные растворы). Хроматографические колонки наполняют сорбентами – сефадексами, декстрановыми гелями (мягкие сорбенты); поливинилбензолстироль, полиакриламид (полужесткие); пористые стекла (жесткие).

Сефадексы представляют собой зернистые гели из поперечно сшитых молекул декстрана, набухающие в воде и в растворах электролитов. Номер сефадекса показывает на количество воды, поглощаемой при набухании в расчете на 1г сухого сефадекса. G-10 поглощает 1мл воды, а G-100 – 10мл воды на 1г сухого вещества.

Характеристика гель-фильтров Сефадекс

Марка геля	Размер зерен, мкм	Набухаемость, мл/г	Диапазон фракционирования, М.М.	
			Пептиды и белки	Декстраны
G-10	40-120	2-3	700	700
G-15	40-120	2,5-3,5	1500	1500
G-25				
грубый	100-300	4-6	1000-5000	100-5000
средний	50-150			
тонкий	20-80			
сверхтонкий	10-40			
G-50				
грубый	100-300	9-11	1500-30000	500-10000
средний	50-150			
тонкий	20-80			
сверхтонкий	10-40			
G-75	40-120	12-15	3000-80000	1000-50000
сверхтонкий	10-40		3000-70000	
G-100	40-120	15-20	4000-150000	1000-100000
сверхтонкий	10-40			
G-150	40-120	20-30	5000-300000	1000-150000
сверхтонкий	10-40	18-22	5000-150000	
G-200	40-120	30-40	5000-600000	1000-200000
сверхтонкий	10-40	20-25	5000-250000	

Зависимость скорости фильтрации от диаметра колонки при оптимальном гидростатическом напоре

Марка сефадекса	Зернение, мкм	Оптимальный гидростатический напор, см водн.ст./см высоты колонки			Скорость элюции, мл/час		
		15 мм	25 мм	50 мм	15 мм	25 мм	50 мм
G-75	40-120	0,5-2,0	0,4-1,60	0,38-1,50	44	144	350
	10-40	0,5-2,0	0,40-1,60	0,38-1,50	11	27	90
G-100	40-120	0,25-1,0	0,24-0,96	0,19-0,76	28	72	235
	10-40	0,25-1,0	0,24-0,96	0,19-0,76	7	18	60
G-150	40-120	0,1-0,4	0,09-0,36	0,08-0,32	13	34	110
	10-40	0,1-0,4	0,09-0,36	0,08-0,32	3	8	27
G-200	40-120	0,05-0,2	0,04-0,16	0,03-0,12	7	18	60
	10-40	0,05-0,2	0,04-0,16	0,03-0,12	2	4	16

1.9. Физико-химические свойства поверхностно-активных веществ

Поверхностно-активное вещество	Число агрегации	Мицеллярный вес, M_n	Критическая концентрация мицеллообразования (мМ)
Додецилсульфат натрия	62	18000	8,2
Тетрадецилсульфат натрия	138	44000	2,1
Додецилсульфонат натрия	54	15000	9,8
Тетрадецилтриметиламмония хлорид	64	19000	4,5
Цетилтриметиламмония бромид	169	62000	0,92
Тритон X-100	140	90000	0,24
Дигитонин	60	70000	-
Холат натрия	2-4	900-1800	13,0-15,0
Таурохолат натрия	4	2200	10,0-15,0
Дезоксихолат натрия	4-10	1700-4200	4,0-6,0
Тауродезоксихолат натрия	5	2000	2,0-6,0

Некоторые поверхностно-активные вещества (детергенты)

Анионные	Катионные	Амфолитные	Неионные
Додецилсульфат натрия	Цетилтриметиламмония бромид	Пальмитоиллизолоецитин	Полиоксиэтиленизоалкоголь
Додецилсульфонат натрия	Тетрадециламмония бромид	Додецил-N-бетаин	Полиоксиэтилен-p-t-октилфенол (Тритон X)
Додецил-N-саркозинат натрия	Додецилпиримидиниума хлорид	---	Полиоксиэтиленониофенол (Тритон N)
Холат натрия	---	---	Полиоксиэтиленовые эфиры жирных кислот (Sterox CO)
Тауродезоксихолат натрия	---	---	Полиоксиэтиленовые сорбитоловые эфиры (Tween)
---	---	---	Дигитонин

1.10 Стандартные растворы для рН-метрии

Буфер	рН				Состав	Примечание
	0°C	10°C	25°C	40°C		
НСl, 0,1N	1,10	1,10	1,10	1,10	Соляная кислота, приготовленная из фиксанала и стандартизированная титрованием	рН имеет постоянное значение до 95°C, возможные отклонения в пределах ±0,02 ед.
Тетраоксалат калия 0,05M (C ₄ H ₃ KO ₃ × 2H ₂ O) Кислый виннокислый калий, насыщенный при 25°C	1,67	1,67	1,68	1,70	12,7г тетраоксалата калия двуводного / литр Насыщенный при 25°C раствор соответствует 0,034M, желательны удаление остатка	Соль не должна нагреваться свыше 60°C Поддерживает рост плесневых грибов, что сопровождается повышением рН на 0,1ед. рН
Кислый фталевокислый калий (KH ₂ C ₈ H ₄ O ₄) 0,05M	4,01	4,00	4,01	4,03	10,21г кислого фталевокислого калия / литр	Высушенная в течение 1 часа при 105°C соль имеет низкую буферную емкость
CH ₃ COOH, 0,1N CH ₃ COONa, 0,1N	-----	-----	4,64	4,635	Равные объемы 0,2N CH ₃ COOH и 0,2N CH ₃ COONa (27,22 г/л)	-----
Кислый янтарнокислый натрий 0,025M / янтарно-кислый натрий 0,025M	5,46	5,42	5,40	5,41	Равные объемы 0,05M растворов или соответствующие молярности навески на литр	Поддерживает рост плесневых грибов
KH ₂ PO ₄ 0,025M / Na ₂ HPO ₄ 0,025M	6,98	6,92	6,86	6,84	3,40г KH ₂ PO ₄ + 3,55г Na ₂ HPO ₄ на литр	Поддерживает рост плесневых грибов
KH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	7,531	7,474	7,413	7,379	1,179г KH ₂ PO ₄ + 4,303г Na ₂ HPO ₄ на литр	Рекомендуется как стандарт для крови
NaHCO ₃ 0,025M / Na ₂ CO ₃ 0,025M	10,32	10,18	10,02	9,91	2,10г NaHCO ₃ + 2,65г Na ₂ CO ₃ на литр	Na ₂ CO ₃ должен быть высушен при 250°C в течение 2-х часов
Бура (тетраборнокислый натрий)	9,46	9,33	9,18	9,07	3,81г Na ₂ B ₄ O ₇ × H ₂ O на литр	Точная концентрация необязательна. Не следует нагревать свыше 25°C

РАЗДЕЛ 2. БЕЛКИ

Белки (протеины) – важнейшие органические соединения живых систем. После воды они составляют самый большой процент от всех химических соединений клеток и организмов. На планете Земля жизнь строится на основе белков. Кроме строительной, белки выполняют еще много важнейших функций в процессах жизнедеятельности: каталитическую, транспортную, двигательную, рецепторную, сигнальную, защитную, запасающую, энергетическую функции.

Белки – биополимеры, мономерами их крупных молекул являются α -аминокислоты. В состав природных белков входят 20 различных α -аминокислоты. Еще две – оксипролин и оксализин образуются уже после трансляции (синтеза). Молекулярная масса белков варьирует от 30000 до 1-2 млн. Да. Молекулы более малой молекулярной массы, состоящие от 2-х до 50 аминокислотных остатков (условно) называют пептидами.

Белковые молекулы имеют сложную структурно-функциональную организацию.

2.1. Методы осаждения и выделения белков

Осаждение белков

Во многих биохимических методиках бывает необходимо осадить белки, которые мешают определению различных соединений. Несмотря на множество методов осаждения белков, в каждой конкретной методике выбрать оптимальный вариант осаждения бывает достаточно сложно. При применении минеральных кислот трудно подобрать оптимальную концентрацию: слабые растворы не дают полноты осаждения, сильные растворяют белки. К тому же такие кислоты, как серная, соляная, азотная, могут привести к нежелательному разрушению веществ, подлежащих определению.

В зависимости от природы исходного материала, а также методики дальнейшего исследования для осаждения белков применяют следующие растворы кислот:

- ортофосфорная кислота, 1-3%-ная;
- метафосфорная кислота, 3-15%-ная;
- хлорная кислота, 0,1-1М;
- трихлоруксусная кислота, 5-20%-ная;
- фосфорновольфрамовая кислота, 3-10%-ная.

Задания для студентов

1. Приготовьте растворы кислот для осаждения белков.

А. 3%-ный раствор ортофосфорной кислоты; Б. 0,1М раствор хлорной кислоты; В. 15%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; Г. 10%-ный раствор метафосфорной кислоты.

2. Приготовьте растворы белков и гомогенаты различных тканей.

Необходимые реактивы и биологические субстанции. 1. Яичный белок; 2. Печень крысы (свежая или замороженная). 3. Растительная ткань (листья, мягкие части молодых стеблей, молодые корни, мягкие семена). 4. 0,154М раствор хлористого натрия (охлажденный) 5. 0,1М фосфатный буфер, pH 7,4. 0,01М ТРИС с 3,8мм глицина буфер, pH 8,3. 6. 6%-ный раствор NaOH. 7. Реактив Бенедикта: 17,3г цитрата натрия и 10г карбоната натрия растворить в 50мл дист. воды при

подогревании (без доведения до кипения). После перемешивания и растворения добавить 1,73г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, предварительно растворенного в 10мл дист. воды. Смесь довести дист. водой до 100мл.

А. Водный раствор яичного белка. 0,5мл цельного яичного белка разведите в 20 раз дист. водой. Осадок нерастворимых в воде глобулинов отфильтруйте.

Б. Гомогенат животной ткани. 0,5г печени (замороженную ткань разморозить, подсушить перед взвешиванием на фильтровальной бумаге) отмойте холодным физиологическим раствором (0,154M NaCl) от крови. Просушите на фильтровальной бумаге. Измельчите ножницами и гомогенизируйте в 10-ти кратном объеме 0,1M фосфатного буфера, pH 7,4. Освободите гомогенат от крупных неразрушенных частей ткани центрифугированием при 600g в течение 10 минут.

В. Гомогенат растительной ткани. Навеску растительной ткани (1-2г) растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством песка в 2мл 0,01M ТРИС-глициновом буфере, pH 8,3. Затем добавить еще 1мл буфера. После растирания гомогенат поместить в холодильник на 40-60мин ($t^0 +10- +14^0$) для экстракции белков (периодически вынимать и перемешивать). Затем гомогенат центрифугировать при 750g в течение 15 минут. Гомогенат довести буфером до 10мл, он содержит легкорастворимые белки.

1. Проведите осаждения белков, используя растворы приготовленных кислот. Соотношение растворов белков и кислот 1:1,5. Через 10 минут отцентрифугируйте пробы при 750g в течение 15 минут. Супернатант должен быть абсолютно прозрачным.

2. С супернатантом каждой пробы проведите качественную биуретовую реакцию на выявление белковых компонентов. Для этого к 1мл супернатанта добавить 1мл 6%-ного NaOH и 0,1мл реактива Бенедикта. Интенсивность окраски внесите в таблицу, оцените качество осаждения белков и пептидов. Для сравнения приготовьте контрольную пробирку: 1мл дист. воды + 1мл 6%-ного NaOH + 0,1мл реактива Бенедикта.

Таблица для оценки качества осаждения белков

Кислота	Супернатанты белков			Качество осаждения
	Яичный белок	Гомогенат животной ткани	Гомогенат растительной ткани	
	Интенсивность биуретовой реакции			
3% ортофосфорная кислота				
0,1 М хлорная кислота				
15% ТХУ				
10% метафосфорная кислота				
Контрольная проба	отрицательная (сине-голубое окрашивание)			-----

Получение кристаллического яичного альбумина

Оборудование и реактивы: мерные цилиндры на 50 и 100мл с притертыми пробками; воронки стеклянные; колба Бунзена с воронкой Бюхнера; стаканы стеклянные на 50мл; фильтры бумажные быстрофильтрующие (красная полоса); универсальная индикаторная бумага; 2 свежих яйца; сульфат аммония, насыщенный раствор (готовится растворением 75,7г соли в 100мл воды при слабом нагревании на водяной бане); сульфат аммония (порошок, кристаллы соли предварительно растираются в ступке пестиком); уксусная кислота 4%-ная.

Ход выделения. Белки двух свежих куриных яиц тщательно отделить от желтков и поместить в мерный цилиндр на 100мл с притертой пробкой. Прилить равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, закрыть крышкой и интенсивно перемешать. При полунасыщении раствора сульфатом аммония в осадок выпадают глобулины. Образовавшийся осадок глобулиновых белков отфильтровать через складчатый фильтр в цилиндр меньшего объема. К прозрачному фильтрату прибавить тонко измельченный порошок сульфата аммония из расчета 1,35г на 1 мл раствора и длительно перемешать, добиваясь полного растворения кристаллов. Таким образом получается 70%-ный раствор сульфата аммония, из которого выпадает в осадок альбумин. Осадок альбумина отфильтровать с помощью стеклянного фильтра и колбы Бунзена или отцентрифугировать, подбирая число оборотов и время по характеру осадка. Осадок перенести в химический стакан на 50мл и растворить в небольшом количестве воды. К полученному раствору по каплям при перемешивании добавить раствор 4%-ной уксусной кислоты, контролируя pH с помощью универсальной индикаторной бумаги. По достижении значения pH раствора 4,7-4,8 к раствору приливают осторожно, небольшими порциями насыщенный раствор сульфата аммония при постоянном помешивании до получения не исчезающей мути. Стаканчик накрыть чистым стеклом и поставить в холодильник. Через сутки или более выпадают кристаллы яичного альбумина. Кристаллы высушить, растереть в порошок и в дальнейшем проверить на чистоту в сравнении с промышленным препаратом.

Выделение миозина из мышечной ткани

Оборудование и реактивы: скелетные мышцы свежезабитого животного; измельчитель тканей; кристаллизатор со льдом; пробирки; марля; 10%-ный раствор хлористого аммония, порошок хлористого натрия.

Используйте скелетные мышцы крысы или другого животного. Срезанные мышцы необходимо тщательно отделить от соединительной и жировой ткани и поместить на лед.

5-10г навески измельчить в измельчителе тканей, поместить в пробирку и залить 3-х кратным объемом раствора: 0,3М KCl, 0,1М KH_2PO_4 , 0,05М K_2HPO_4 , 10мМ $Na_4P_2O_7$, 0,001М $MgCl_2$, pH 6,5. Экстракцию проводить 15-20 минут с перемешиванием стеклянной палочкой. Затем центрифугировать при 1000-5000g в течение 10-15 минут.

Надосадочную жидкость быстро отфильтровать через промытую экстрагирующим раствором вату. Миозин осадить из фильтрата, вливая 14 объемов 5мМ ЭДТА, pH 6,6-6,8 и осторожно перемешивая. Суспензию оставить на холоде на 2-3 часа. После жидкость декантируют и оставшуюся густую суспензию отцентрифугировать 20 минут при 2000g, так, чтобы в надосадочной жидкости не было видно хлопьев. Осадок перенести в мерный цилиндр, охлажденный льдом и растворить добавлением 3М KCl, 5мМ ЭДТА, pH 7,0 до конечной концентрации 0,5М KCl. В результате получается раствор неочищенного миозина.

Выделение казеиногена из молока

Казеиноген в молоке находится в виде анионов, растворенных в воде (казеиногена кальцинат). Недиссоциированные молекулы казеиногена малорастворимы в воде. Изoeлектрическая точка казеиногена находится при pH 4,7. При данном значении pH казеиноген утрачивает заряд и выпадает в осадок. Однако при добавлении кислоты в избытке, молекулы казеиногена приобретают новый заряд и переходят в раствор, что мешает выделению белка.

Оборудование и реактивы. 1. Молоко; 2. Концентрированная уксусная кислота; 3. Конические колбы на 50 или 100мл; 4. Воронки, пробирки, мерный цилиндр на 50 или 100мл, фильтры.

Ход работы. К 20мл молока прилить равный объем дист. воды, добавить 10-12 капель концентрированной уксусной кислоты, перемешать. Выпадает осадок казеиногена. Выпавший осадок казеиногена отфильтровать и промыть на фильтре дист. водой дважды.

Выделение муцина из слюны

Муцин гликопротеид, в слюне выполняющий функцию склеивания частичек пищи. Углеводный остаток муцина представлен нейтральным мукополисахаридом.

Оборудование и реактивы. 1. Свежесобранная слюна; 2. Уксусная кислота, концентрированная; 3. Конические колбы на 50мл, воронки, пробирки, стеклянные палочки, мерный цилиндр на 50мл, пипетки, фильтры.

Ход работы. В колбу собирать 10мл слюны и небольшими порциями приливать уксусную кислоту (1,5-2,0мл). Выпадает осадок муцина. Жидкость осторожно слить из колбы, а сгусток перенести на фильтровальную бумагу.

Экстрагирование белков из животных тканей

Экстракция водорастворимых белков

Оборудование и реактивы. Свежевыделенная ткань животного (печень, мышцы); чашка Петри; центрифуга; фильтровальная бумага; марля; холодильник.

Ход выделения. 2-3г свежесобранной ткани в чашку Петри, стоящую на льду. Ткань отмыть от крови и освободить от жира, соединительно-тканых оболочек. Затем подсушить на фильтровальной бумаге и взвесить. Ткань измельчить ножницами и гомогенизировать с 20-ти кратным объемом охлажденной дист. воды. До образования равномерной суспензии. Гомогенат оставить на 30 минут на холоду для лучшей экстракции, отфильтровать через три слоя марли и отцентрифугировать при 7000-7500g в течение 20 минут для удаления субклеточных частиц. Надосадочную жидкость слить и поместить в холодильник (экстракт 1). Осадок ресуспендировать в 10-ти кратном объеме дист. воды и заморозить. После размораживания снова гомогенизировать и отцентрифугировать в том же режиме (экстракт 2). Экстракты 1 и 2 соединить. Небольшое количество экстракта заморозьте для дальнейшего количественного определения. Осадок используйте для выделения водонерастворимых белков.

Солюбилизация водонерастворимых белков

Для солюбилизации мембранных белков применяют поверхностно-активные вещества (детергенты). В биохимических исследованиях часто используют додецилсульфат натрия (ДДС), тритон X-100, дезоксихолат натрия, а также ТВИН-20, ТВИН-80 и другие.

Наиболее эффективным солюбилизирующим агентом является ДДС (М.М. 288; оптимальная концентрация 0,3%). Затем по мере уменьшения экстрагирующей способности располагаются дезоксихолат и тритон X-100. Еще более мягкими солюбилизаторами, растворяющими только некоторые белки, являются детергенты

марки ТВИН. Солюбилизация белков ДДС сопровождается сильными конформационными изменениями и денатурацией. Дезоксихолат натрия, тритон X-100, ТВИН солюбилизируют белки без потери их биологической активности, поэтому применяются для экстракции ферментов и изучения их характеристик.

Реактивы: 1. 0,3%-ный раствор додецилсульфата натрия в 0,06М ТРИС-НСl буфере, рН 6,7; 2. 0,3%-ный раствор тритона X-199 в 0,06М ТРИС-НСl буфере, рН 6,7.

Ход выделения. Осадок, оставшийся после последнего центрифугирования, ресуспендировать с 40-кратным объемом раствора тритона X-100 и проинкубировать в термостате при 37°C в течение 1 часа, периодически помешивая. Затем суспензию отцентрифугировать 7000g, 20 минут. Экстракт тритон-растворимых белков отобрать в сухую чистую пробирку и сохранить для количественного определения. Осадок ресуспендировать в 40-кратном объеме 0,3%-ного ДДС натрия, инкубировать в термостате в тех же условиях в течение 1 часа, помешивая. Затем отцентрифугировать в том же режиме, осадок отбросить, а супернатант сохранить для количественного определения белков.

Экстрагирование белков из растительных тканей

Навеску ткани (1-2г) растереть в фарфоровой ступке с небольшим количеством песка в 2мл 0,01М ТРИС-глицинового буфера, концентрация глицина 3,8мМ, рН 8,3. После растирания гомогенат поместить в холодильник на 40-60 минут ($t^0+10-+14$) для экстракции белков (периодически вынимать и перемешивать). Затем гомогенат отцентрифугировать при 4000g в течение 15 минут. Экстракцию повторяют добавлением еще 1мл буфера. Оба центрифугата слить вместе, довести до объема 10 мл буфером, перемешать. *Супернатант содержит легкорастворимые белки.*

Выделение труднорастворимых белков. Оставшийся осадок промывают 4 раза в 50мл буфера, центрифугируя каждый раз в том же режиме. Надосадочную жидкость каждый раз отбрасывать. Затем провести экстракцию из осадка дважды 2мл того же буфера, содержащего 1% тритона X-100, центрифугируя каждый раз в режиме 1500g, 15 минут. Супернатанты слить вместе, довести объем до 10мл. *Супернатант содержит тритон-растворимые белки.*

Быстрая и эффективная экстракция растворимых белков грамотрицательных бактерий без разрушения клеточных стенок

Получение суспензии клеток бактерий. Биомассу микроорганизмов (например, *E. coli*), выросшую на твердой питательной среде, суспендировать в среде следующего состава: 20мМ ТРИС-НСl, рН 7,5; 12,5мМ ЭДТА. Выросшие колонии (3-4) размером 2-3мм взять на бактериологическую петлю и поместить в 1,5мл среды.

Экстракция белков. Буфер для экстракции: 20мМ ТРИС-НСl, рН 7,5; 12,5мМ ЭДТА, содержащий 1% тритона X-100 и 1М мочевины.

По 100-150мкл клеточной суспензии разлить в закрывающиеся центрифужные пробирки, прилить по 400мкл буфера для экстракции. Суспензию быстро перемешать 5-10с и инкубировать при 37°C в течение 20мин без встряхивания. В процессе инкубации пробирки вытаскивать каждые 5 минут и осторожно переворачивать пробирки. После инкубации клетки осадить в режиме 8000об/мин, 7 минут. Супернатанты содержат водорастворимые белки. Надосадочную жидкость осторожно отсосать, поместить в пробирки типа Eppendorf и заморозить для дальнейшего количественного определения.

Экстракция ДДС-растворимых белков из бактериальных клеток

Биомассу микроорганизмов можно получить путем приготовления суточного инокулята. Для этого 2-3мл культуры в стадии стационарного роста поместите в новую питательную среду (20мл) и поместите на 24 часа в термостат при 30-37°C. В 2мл суточного инокулята добавить 0,1мл 0,3%-ного додецилсульфата и растереть в гомогенизаторе Поттера. Затем переместить в ступку и растереть с добавлением химически чистого и прокаленного песка. Пробы оставить в закрытой посуде в холодильнике на 2-3 часа для лучшей экстракции. После окончания экстрагирования центрифугировать в режиме 6000об/мин, 10 минут. Супернатант использовать для количественного определения белков.

2.2. Методы количественного определения белков

Для количественного определения белков используют различные методы. Они отличаются по принципу, чувствительности, возможности использования применительно для определенных биологических субстанций. Применяют азотметрический (старый), фотоколориметрические, спектрофотометрические, рефрактометрические. Методы делят также на методы определения общего содержания белков, содержания группы белков или индивидуального белка.

Азотметрический метод (метод Кьельдаля). Метод впервые предложен Кьельдалем в 1883 году и основан на определении абсолютного количества азота в анализируемом образце, исходя из того, что белки содержат в среднем 16% азота в своем составе. В действительности содержание азота в составе белков колеблется от 14 до 19%, поэтому метод определения не отличается особой точностью, к тому же он очень трудоемкий. В связи с этим, данный метод описывается только для ознакомления с ним.

Определение включает три основных этапа.

Минерализация. Данный этап включает сжигание биологической субстанции при температуре 200-350°C с добавлением концентрированной серной кислоты и катализаторов (сернистой меди, перекиси водорода и др.). Сжигание осуществляют под тягой в вытяжном шкафу. Последующие этапы проводят в аппарате Кьельдаля.

Дистилляция аммиака. Дистилляцию аммиака и улавливание его в колбе приемнике проводят с точно отмеренным количеством титрованного раствора серной кислоты (кислота берется в избытке). Предварительно сернистый аммоний разлагается концентрированным раствором едкого натра, а выделяющийся аммиак отгоняется с водяным паром в колбу приемник, где он связывается с серной кислотой.

Титрование. Титрометрически определяется количество серной кислоты, не связавшееся с аммиаком, а по этому количеству – количество аммиака в анализируемом образце и соответствующее ему количество азота. Для пересчета на исходное содержание белка в образце результат умножается на 6,25.

Фотоколориметрические методы. Основаны на цветных реакциях с функциональными группами радикалов аминокислот или пептидной группировкой. Наибольшее распространение получили методы, использующие биуретовую реакцию и реакцию Фолина (на ароматические группы аминокислотных остатков).

Биуретовый метод. Принцип. Белки в щелочной среде реагируют с сернистой медью с образованием соединений, окрашенных в фиолетовый цвет. Метод позволяет определить содержание белка в биологических объектах с количеством от 1 до 10г/л (1-10мг в пробе).

Реактивы. 1. 0,9%-ный раствор хлористого натрия для приготовления стандартного раствора альбумина; 2. 0,2N раствор NaOH, свободный от углекислого

натрия (для этого его готовят на хорошо прокипяченной дист. воде); 3. Основной биуретовый реактив: 4,5г калия-натрия виннокислого (сегнетова соль) растворяют в 40мл 0,2N NaOH. После растворения прибавляют 1,5г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,5г йодистого калия. Раствор доливают до 100мл 0,2N NaOH. Реактив хранится в посуде темного стекла около месяца; 4. 0,5%-ный раствор KI в 0,2 N NaOH. Хранить в посуде темного стекла не более двух недель; 5. Рабочий раствор биуретового реактива: 20мл основного биуретового реактива (3) смешивают с 80 мл раствора йодистого калия (4). Хранится в темноте не больше двух недель; 6. Стандартный раствор альбумина 10г% в 0,9%-ном хлористом натрии. Перед приготовлением кристаллический или лиофилизированный альбумин хорошо растереть в фарфоровой ступке и растворить в теплом (40°C) хлористом натрии.

Построение калибровочного графика. Из 10%- стандартного раствора белка приготовить рабочие стандартные растворы для построения калибровочного графика по следующей схеме:

№ пробирки	Стандартный раствор белка, мл	0,9 %-ный Na Cl, мл	Концентрация белка, г%
1.	0,4	0,6	4
2.	0,6	0,4	6
3.	0,8	0,2	8
4.	1,0	-	10

В чистые сухие пробирки разлить по 5мл рабочего биуретового реактива и добавить в них по 0,1мл одного из разведений (в первую – из первого и т.д.). Для каждого из разведений рекомендуется сделать по три повторения. В одну из пробирок добавить 0,1мл 0,9%-ного хлористого натрия (контроль реактивов). Пробы перемешать.

Через 30 минут измерить оптическую плотность (ОП) при длине волны 540nm против контроля реактивов (длина оптического пути 1см).

Посчитать среднюю ОП для трех повторов по каждой концентрации и построить график зависимости ОП (E) от концентрации (C) на миллиметровой бумаге. График зависимости должен представлять собой прямую линию, выходящую из нуля. Если точки выходят из пределов прямой пропорциональной зависимости, линию необходимо провести между точками на равном расстоянии от них. Для быстроты вычислений целесообразно рассчитать коэффициент отношения E/C для 5-10 точек и определить его среднее значение:

$$A = \sum E/C/n,$$

где n – количество точек взятых для определения коэффициента.

Определение общего белка с помощью биуретового метода

Метод применяется для определения белка в биологических субстанциях, где его содержание достаточно высокое (не менее 1-2мг/мл). Например, для определения содержания белков в плазме или сыворотке крови.

Ход определения. Для определения белка в сыворотке крови добавить 0,1мл каждой из исследуемых сывороток в 5мл рабочего биуретового реактива. Контрольная проба – 0,1мл дист. воды и 5мл рабочего биуретового реактива. Через 30 минут проколориметрировать пробы против контроля, длина волны 540nm, кювета 1см.

Расчет: ОП опытных проб / A = X белка в г%

Нормальное содержание белка в сыворотке крови – 6,5-8,5г% или 65-85г/л.

Определение белка с помощью микробиуретового метода

Модификация биуретового метода позволяет увеличить его чувствительность до 0,1 мг/мл.

Реактивы: 1. Стандартный раствор белка в 0,9%-ном хлористом натрии – 2мг/мл (готовится так же как описано выше); 2. 6%-ный раствор NaOH; 3. Реактив Бенедикта: 17,3г цитрата натрия и 10г карбоната натрия растворяют в 50мл дист. воды при подогревании (нельзя доводить до кипения). Затем при перемешивании добавляют 1,73г сульфата меди (пятиводного), предварительно растворенного в 10мл дист. воды. Смесь доводят водой до 100мл.

Построение калибровочного графика. Для подготовки проб используйте схему, отраженную в таблице:

Стандартный раствор белка, мл	0,1	0,4	0,7	1,0	1,5	2,0
Дист. вода, мл	1,9	1,6	1,3	1,0	0,5	-
6%-ный раствор NaOH	2	2	2	2	2	2
Реактив Бенедикта, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Количество белка, мг/мл	0,1	0,4	0,7	1,0	1,5	2,0

Разлить не менее трех повторов для каждой концентрации белка. Через 30 минут проколориметрировать пробы при 330нм (спектрофотометр, дейтериевая лампа), длина оптического пути 1см. Контроль реактивов: 2мл дист. воды, 2мл 6%-ного NaOH и 0,2мл реактива Бенедикта.

Рассчитайте среднюю ОП для каждой концентрации белка и постройте калибровочный график (Е/С) на миллиметровой бумаге, определите коэффициент экстинкции. Используйте микробиуретовый метод для определения белка во фракциях белков, выделенных из животных и растительных тканей, а также из бактериальных клеток.

Ход определения белка микробиуретовым методом. В пробирки разлить по 1,9мл дист. воды, добавить по 0,1мл исследуемых фракций (в случае содержания белка от 1 до 0,1мг на мл). Если содержание меньше соотношение воды и исследуемой жидкости изменяется в сторону увеличения исследуемой жидкости. При малом содержании белка (менее 0,1мг/мл) берется 2мл исследуемой жидкости. Добавить 2мл 6%-ного NaOH и 0,2мл реактива Бенедикта. Контроль: 2мл дист. воды, 2мл 6%-ного NaOH и 0,2мл реактива Бенедикта. Через 30 минут промерить ОП при длине волны 330нм (спектрофотометр, дейтериевая лампа), кювета 1см.

Определение белка по методу Лоури

Принцип метода сочетает биуретовую реакцию и цветную реакцию на ароматические аминокислоты (тирозин и триптофан). Чувствительность метода высокая – 10-100мкг/мл.

Реактивы: 1. Стандартный раствор альбумина 0,25мг/мл; 2. 2%-ный раствор карбоната натрия в 0,1М растворе NaOH (реактив №1); 0,5%-ный раствор сернокислой меди в 1%-ном цитрате натрия (реактив №2); Непосредственно перед употреблением 1мл реактива №2 смешивают с 50мл реактива №1 (реактив №3).

Реактив Фолина-Чокальтеу: 50г вольфрамата натрия (двухводного) и 12,5г молибдата натрия (двухводного) растворяют в 350мл воды. К полученной смеси добавляют при перемешивании 25мл 85%-ного раствора фосфорной кислоты и 50мл

концентрированной соляной кислоты. Полученный раствор кипятят в колбе на 1л с обратным холодильником в течение 10 часов. Затем добавляют 75г сернокислого лития, 25мл воды, 3 капли брома и кипятят без холодильника 15 минут для удаления избытка брома. Охлажденный раствор доводят водой до 500мл и фильтруют. Перед употреблением реактива необходимо определить его кислотность, титруя небольшую часть (5-10мл) 1N NaOH. Затем раствор разбавляют водой до кислотности, соответствующей 1N соляной кислоте.

Ход определения. Исследуемый раствор, содержащий 10-100мкг белка довести водой (или буфером) до 0,4мл, добавить 2мл реактива №3 и спустя 10 минут прилить 0,2мл реактива Фолина-Чокальтеу. Через 40 минут промерить при длине волны 750nm против контроля: 0,4мл воды, 2мл реактива №3 и 0,2мл реактива Фолина-Чокальтеу.

Для построения калибровочного графика подготовьте серию разведений стандартного раствора от 10 до 100мкг/мл. Проведите все пробы по методике и постройте график, затем рассчитайте коэффициент экстинкции.

Метод Лоури имеет широкое распространение, поскольку он специфичен для белков и пептидов и очень чувствителен. Однако следует помнить, что он имеет некоторые особенности и недостатки: интенсивность окраски зависит от количества ароматических остатков в составе определяемых белков; присутствие ряда соединений искажает результаты (ТРИС; тритон X-100; ЭДТА; тиоловые реагенты; фенол; мочевины; сульфат аммония и др.).

Определение белка в хлоропластах по методу Лоури в модификации Харти

Особенностью данного метода является возможность определения содержания белка в суспензии хлоропластов без получения бесцветного раствора белка с помощью щелочи.

Реактивы: 1. Раствор А (2г К, Na-виннокислого и 100г Na_2CO_3 растворяют в 500мл 1N раствора NaOH и доводят дист. водой до 1000мл);

2. Раствор В (2г К, Na-виннокислого и 1г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 90мл дист. воды и добавляют 10мл 1N раствора NaOH);

3. Раствор С (концентрированный реактив Фолина-Чокальтеу разводят водой до 0,15-0,18N). Раствор готовят перед употреблением.

Растворы А и В хранят при комнатной температуре в полиэтиленовой таре в течение месяца.

Ход определения. К 1мл водной суспензии хлоропластов добавить 0,9мл раствора А. В контрольную (фоновую пробу) вместо 1мл суспензии хлоропластов добавляют 1мл дист. воды. Пробы необходимо поместить в пробирки с притертыми пробками и поместить на 10 минут в водяную баню при 50°C, затем охладить до комнатной температуры. При встряхивании добавить 0,1мл раствора В. Смесь выдержать при комнатной температуре 10 минут. К содержимому пробирок прибавить 3мл раствора С и энергично встряхнуть. Снова поместить в водяную баню при 50°C на 10 минут и охладить до комнатной температуры. Измерить ОП при 650nm, длина поглощающего слоя 1см. Концентрацию белка определяют по калибровочному графику, построенного с использованием растворов альбумина различной концентрации.

Определение белка с помощью красителя амидо-черного

Метод используется для определения водорастворимых белков растительных тканей.

Реактивы: 1. Осаждающий реагент (37,65г лимонной кислоты, 1,136г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,6г амидо-черного 10В растворяют в бидист. воде и доводят до 1000мл).

Ход определения. К 4мл гомогената растительных тканей приливают 0,5мл осаждающего реагента. Суспензию центрифугировать при 17500g, 10 минут. Определить ОП супернатанта на длине волны 615нм, толщина кюветы 1см. Количество белков определяют по калибровочному графику, построенному по альбумину.

При построении калибровочной кривой для определения водорастворимых белков растительных тканей целесообразно сначала выделить пул этих белков (осаждением с помощью трихлоруксусной кислоты), высушить и только затем строить кривую по выделенным белкам.

Спектрофотометрические методы определения белковых соединений по интенсивности УФ-поглощения. Методы основаны на способности белковых соединений и аминокислот поглощать лучи в области 200-280нм. Измерение поглощения в УФ-области один из наиболее простых и быстрых методов, характеризующийся высокой чувствительностью. Однако следует помнить, что нуклеиновые кислоты также поглощают лучи в этой области (максимум 260нм). Существует ряд формул расчета, учитывающих данный факт.

Однако, если заведомо известно, что в пробах нет нуклеиновых кислот, в расчетах по данным формулам нет необходимости, и проводят измерения при одной длине волны.

Спектрофотометрический метод применяют для детекции белков, пептидных соединений и аминокислот на выходе их с колонок гель-фильтрации, ионообменной и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Используют длины волн: 280нм – для белков; 254нм – для пептидов и аминокислот, имеющих в своем составе ароматические остатки; 206нм – для фракции гамма-глобулинов.

Содержание белка можно рассчитать по формуле Калькара на основе данных измерения оптической плотности при 260нм и 280нм:

$$X \text{ мг/мл} = 1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}$$

2.3. Методы фракционирования белков

Фракционирование белков можно осуществить с помощью осаждения их растворами солей различной концентрации (высаливание). Наиболее широко распространенным является высаливание с помощью различных концентраций сульфата аммония.

Определение белковых фракций сыворотки крови турбидиметрическим методом

Принцип метода. Фосфатные растворы определенной концентрации осаждают с образованием очень мелкой взвеси различные белковые фракции сыворотки крови. По степени мутности растворов судят о концентрации белков в исследуемом материале.

Реактивы: 1. Основной раствор фосфатов: 16,75г NaOH растворяют в 200мл дист. воды, добавляют 113,40г K_2HPO_4 , встряхивают и размешивают до полного растворения, охлаждают до комнатной температуры и доводят водой до 250мл; 2.

разведенные растворы фосфатов: а) 46,25мл осн.раствора и довести до 50мл водой; б) 37,45мл осн.раствора – до 50мл водой; в) 35,39мл осн.раствора – до 50мл; г) 29,40мл осн.раствора – до 50мл водой; д) 24,30мл осн.раствора – до 50мл водой.

Ход определения. В штатив поместить 7 пробирок: одна контрольная, обозначить ее нулевой; в нулевую пробирку внести 10мл дист.воды. В пробирки №1,2,3,4,5 внести соответственно по 5мл растворов а, б, в, г, д. В пробирку №6 внести 0,5мл сыворотки крови, 0,75мл дист.воды и 3,75мл основного фосфатного раствора. Содержимое пробирки №6 перемешать 5-6-кратным переворачиванием, избегая образования пузырьков воздуха. Затем в пробирки №1, 2, 3, 4, 5 добавить по 0,5мл смеси из 6-ой пробирки, в нулевую пробирку 1мл смеси. Содержимое каждой пробирки осторожно перемешать и через 15 минут измерить оптическую плотность против содержимого нулевой пробирки, начиная с 5-ой в обратном порядке при длине волны 670нм, кювета – 10мм.

Расчет: 1) альбумины: $E_1 - E_2$;

2) α_1 -глобулины: $E_3 - E_4$;

3) α_2 -глобулины: $E_4 - E_5$;

4) γ -глобулины: E_5

Вычислите содержание каждой фракции в процентах, для этого ОП E_1 принимается за 100%, ОП каждой фракции за X%.

Для выражения величин в г/л определите содержание общего белка в данной сыворотке биуретовым методом, тогда E_1 будет соответствовать содержанию общего белка в г/л, а ОП каждой фракции – X г/л.

Определение содержания фибриногена в плазме крови методом избирательного высаливания

Принцип метода. Белок плазмы крови – фибриноген – осаждается при добавлении сульфата аммония в определенной концентрации. Количество осажденного фибриногена определяется турбидиметрически – по степени помутнения раствора.

Реактивы: 1. Сульфат аммония, 21,35%-ный раствор; 2. Физиологический раствор, 0,9%-ный раствор хлористого натрия.

Ход определения. В опытные пробирки разлить по 5мл раствора сульфата аммония, а в контрольные по 5мл физиологического раствора. К каждой плазме крови ставится свой контроль. Добавить по 0,1мл исследуемой плазмы в опытную (с сульфатом аммония) и в контрольную (с физиологическим раствором) пробирки. Через 10 минут определите ОП опытной пробирки против контрольной, длина волны 540нм, кювета толщиной 10мм. При расчете используется коэффициент – 60 (учитывает коэффициент экстинкции и разведение плазмы).

Расчет: X фибриногена, г/л = $E \times 60$

2.4. Методы хроматографического и электрофоретического разделения белков

Эффективным методом разделения и очистки белков является *гель-хроматография*. Обычно различают гель-проникающую хроматографию (элюент органический растворитель) и гель-фильтрацию (элюент – вода). Скорость движения и выхода белков из хроматографической колонки определяется молекулярной массой, конформацией и химическими особенностями молекул белков. Элюирование компонентов белковой смеси происходит в порядке уменьшения их молекулярного веса, хотя процесс зависит от размера молекулярных сит.

В качестве молекулярных сит при гель-фильтрации широко используют сефадексы. Сефадексы – это сильно гидрофильные гели, состоящие из поперечно-сшитых полисахаридных цепочек декстрана. Сефадексы устойчивы к щелочам и слабым кислотам, но не устойчивы к сильным кислотам и сильным окислителям. При длительном хранении геля в набухшем состоянии в сефадекс необходимо вводить антисептик – 0,2%-ный азид натрия или 0,001%-ный мертиолат. Характеристику сефадексов см. в разделе «Справочные сведения», пункт 1.8.

Очистка и фракционирование белков и пептидов

Обессоливание, смена буфера, предварительная очистка. С помощью гель-фильтрации осуществляют очистку белков и пептидов от сульфата аммония и предварительную подготовку препарата смеси белков или пептидов для хроматографического разделения.

Если объем исходного раствора белка измеряется миллилитрами, то его очистку нередко ведут «вслепую». Необходимо откалибровать небольшую колонку с сефадексом G-25. Отбор фракций, содержащий высокомолекулярные компоненты, производят по объему элюата. Соотношение объемов исходного раствора и колонки может составлять 1:10. В препаративных вариантах обессоливания, когда необходимо избежать разбавления препарата, соотношение можно увеличить до 1:3. Выход хроматографических фракций контролируется по их УФ-поглощению в области 280нм. Скорость элюции обычно составляет 20мл/см²·час.

Колонки для обессоливания и предварительной очистки могут быть небольшие, диаметром 1,5-2,0см, высотой – 10-15см. Очистка проходит эффективнее и быстрее, чем при диализе.

Ход работы. Колонку заполнить набухшим в дисстилизованной воде сефадексом. После формирования и стабилизации колонки определяют её внешний и внутренний объемы. Затем на колонку наносят 1мл солевого раствора белка и элюирующий раствор порциями. Собирают элюат по 3мл, в каждой порции определяют содержание белка и соли. В первых порциях в основном выходят белки.

В настоящее время очистку и обессоливание белковых препаратов можно осуществить, используя обращенную твифазную хроматографию. Для этого применяются специальные картриджи, представляющие собой миниколонки C₁₈ (октадецил). Процесс очистки и сбор фракций осуществляют по инструкции, прилагаемой к картриджу. Обычно картридж реактивируют изопропиловым спиртом и отмывают элюирующим раствором, затем пропускают очищаемый препарат.

Концентрирование растворов белков

После очистки и обессоливания обычно необходимо концентрирование препаратов для дальнейшего разделения смеси. Для этого можно использовать сефадексы грубого помола марки G-25.

Ход работы. К 1мл концентрируемого раствора белков добавить сухой сефадекс в количестве 10мг. Сухой сефадекс всасывает воду, высокомолекулярные соединения остаются вне гранул. Суспензию центрифугируют в режиме 5000g, 5 минут. Концентрированный раствор белка используют для дальнейшего разделения.

Хроматографическое разделение смеси белков гель-фильтрацией

Разделение смеси белков можно осуществлять различными методами. Рассмотрим пример гель-хроматографии на сефадексах.

Объем столбика геля в колонке складывается из трех величин: объема между набухшими гранулами геля (V_n), объема растворителя внутри набухшего геля (V_b) и объема сухого сефадекса (V_c), т.е.

$$V_{\text{общий}} = V_h + V_b + V_c,$$

Общий объем можно рассчитать, зная высоту столбика сефадекса в колонке и внутренний диаметр колонки. V_h и V_b рассчитывают по формулам:

$$V_h = V_{\text{общий}} - [\alpha (l + M) / d];$$

$$V_b = \alpha M = (V_{\text{общий}} - V_h) \times (M \times d / l + M),$$

где: α – сухой вес сефадекса; M – степень набухания сефадекса; d – плотность набухшего геля.

Объем элюата, собранного с момента внесения образца на колонку, до момента выхода белка с колонки называют объемом выхода – V_d . Объем выхода не зависит от скорости элюирования, концентрации вещества, температуры и прямо пропорционален логарифму концентрации вещества. Это может быть использовано для определения молекулярного веса по объему выхода.

Эффективность разделения белков определяется размерами колонки и скоростью элюирования. Отношение диаметра колонки к её длине обычно составляет 1:10, 1:20.

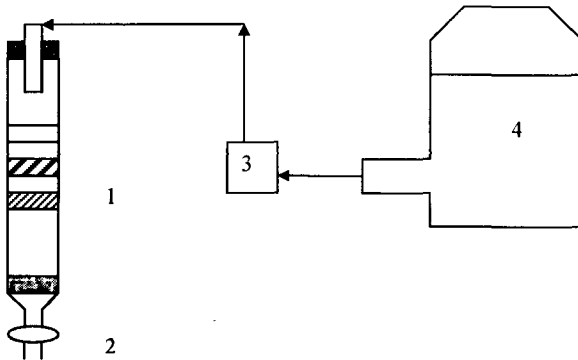


Рис. 1.1. Схема установки для гель-хроматографии. 1 – колонка; 2 – кран; 3- дозирующий насос; 4 – емкость с элюирующим буфером.

Реактивы: 1. Сефадекс G-150, зернение 40-120мм); 0,05М ТРИС-НСl буфер, рН 8,0, содержащий 0,5М NaCl; время набухания 2-3 суток.

2. Образец смеси белков

Ход работы. 16г сухого сефадекса поместить в химический стакан и залить буфером на 72 часа. Мелкие частицы удаляют декантацией до просветления жидкости над осадком (3-4 раза).

В работе можно использовать колонку с внутренним диаметром 1,5см. Перед заполнением колонки на стеклянный фильтр помещают кружок из фильтровальной бумаги и колонку заполняют буфером на 1/3 длины. Следует обратить внимание на отсутствие пузырьков воздуха под стеклянным фильтром. Затем в колонку залить суспензию геля. Когда сформируется слой геля высотой в 3-4см, кран открывают и

по мере вытекания растворителя в колонку добавляют гель. Заполнение колонки прекращают, когда высота сформировавшегося столбика геля достигает 45см. На поверхность геля помещают кружок фильтровальной бумаги.

Перед нанесением пробы слой буфера из колонки спускают почти полностью. На поверхность геля пипеткой наносят 3мл смеси белков. Кран открывают и дают возможность раствору белка полностью впитаться. Затем на поверхность геля наслаивают буфер толщиной несколько см и закрывают пробкой.

Эффективное гидростатическое давление должно составлять 15-20см. Скорость элюирования при этом будет 10-15мл/час. Фракции можно собирать в ручную или применяя автоматический коллектор объемом 2,5-3мл. В пробах определяется содержание белка спектрофотометрическим методом или по Лоури.

Для определения объема выхода V_d строят график зависимости содержания белка от объема элюата (рис.2).

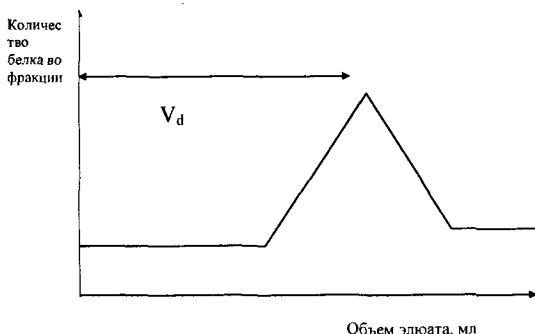


Рис. 1.2. Схема расчета объема выхода V_d на основании кривой элюирования

Молекулярный вес элюированных белков можно оценить по формуле:

$$\text{Lg MB} = 6,040 - 0,803 (V_d/V_h).$$

Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) – наиболее используемый в настоящее время вид аналитического и препаративного электрофореза для разделения смесей белков и пептидов. Этот метод использует в качестве поддерживающей среды сополимер акриламида и метилен-бисакриламида. Разделение белковых молекул происходит при движении под действием внешнего электрического поля и определяется величиной заряда, молекулярным весом и размерами.

Электрофорез в ПААГ с использованием додецилсульфата натрия. Электрофоретическая подвижность каждого белка зависит и от его суммарного заряда, и от молекулярной массы, и от конфигурации, и от плотности упаковки полипептидной цепи. Вклад каждого из этих факторов может существенно меняться в зависимости от условий электрофореза. Для установления строгой количественной корреляции между каким-либо одним из перечисленных параметров и электрофоретической подвижностью белков надо исключить влияние всех остальных.

Одним из наиболее популярных методов является электрофорез в ПААГ с использованием додецилсульфата натрия (ДСН), который позволяет фракционировать белки в зависимости от значения только одного параметра – их молекулярной массы. Основной принцип метода – снижение влияния заряда макромолекулы на ее электрофоретическую подвижность. В этом случае должна наблюдаться пропорциональность между молекулярной массой макромолекулы и ее сопротивлением трения (коэффициентом задержки). Для этого белки обрабатывают избытком ДСН, который примерно одинаково связывается с подавляющим большинством белков в соотношении 1,4мг ДСН с 1мг белка. Избыток остатков сульфокислоты делает несущественным собственный заряд белка, а постоянство соотношения детергент/белок делает практически одинаковым отношение отрицательного заряда к массе для любого белка. Кроме того, при обработке белка ДСН полипептидная цепочка распрямляется и приобретает форму жесткого эллипсоида вращения, размер большой оси вращения которого линейно связан с числом аминокислотных остатков, а следовательно, с молекулярной массой белка.

Электрофоретическая подвижность (u') жесткого комплекса белок-ДСН оказывается связанной с молекулярной массой белка (M_r) простым соотношением: $u' = A - B \cdot \lg M_r$, где A и B – коэффициенты, зависящие от пористости геля, температуры и других условий эксперимента. Величину u' удобнее представлять в относительных единицах, выражающих отношение путей миграции белка и лидирующего красителя за время электрофореза, т.е. в значениях введенной ранее величины R_f . Для определения коэффициентов A и B одновременно с фракционированием исследуемой смеси необходимо провести электрофорез набора белков-«маркеров», молекулярные массы которых точно известны. По окончании электрофореза, измерив пути миграции лидирующего красителя (бромфенолового синего) и каждого из маркеров, можно рассчитать значения R_f и, зная молекулярные массы маркеров, построить экспериментальную зависимость $\lg M_r$ от R_f . Если пористость геля выбрана удачно, то такая зависимость будет линейной. Определив теперь R_f для интересующего нас белка, из графика можно найти для него величину $\lg M_r$ и рассчитать M_r .

При данной пористости (концентрации) геля описанная выше линейная зависимость имеет место только для белков, молекулярные массы которых лежат в определенном интервале. Для ориентировки можно назвать примерное значение концентрации акриламида в зависимости от молекулярной массы белков.

Концентрация полиакриламидных гелей, используемых для разделения макромолекул с различными молекулярными массами

Концентрация геля T, %	Концентрация бисакриламида C, %	Пределы разделения, дальтоны
15-20	0,2	1×10^4 - 4×10^4
10-15	0,3	4×10^4 - 1×10^5
5-10	2 - 3	1×10^5 - 3×10^5
5	5	3×10^5 - 5×10^5
2-5	6	выше 5×10^5

Наиболее широко используемым вариантом электрофореза с добавлением ДСН является диск-электрофорез по Лэммли. Этот метод позволяет значительно улучшить разделение фракционируемых белков за счет введения дополнительного так называемого «формирующего» крупнопористого геля, в котором белки не фракционируются, а только концентрируются в виде очень узких полос перед

переходом в разделяющий гель. Система Лэммли позволяет хорошо разделять белки с $M_r = 15-200$ кДа. Для анализа низкомолекулярных белков и пептидов наиболее широко используется система предложенная Шаггером.

Для проведения электрофореза необходима вертикальная камера для электрофореза с комплектуемыми и источник питания с регулировкой силы тока или/и напряжения.

Электрофорез для разделения белков (15-200кДа) по Лэммли

Реактивы. Для всех растворов необходимо использовать либо бидистиллированную либо деионизированную (milliQ) воду.

Все растворы готовить только на ТРИС; pH доводить концентрированной соляной кислотой. Растворы, содержащие акриламид и бисакриламид необходимо растворять при постоянном перемешивании, после доведения объема обязательно профильтровать. Хранить при +4°C не более 3-х месяцев.

1. Концентрат геля (30,8% Т, 2,7% С): Акриламид – 30г; Бисакриламид – 0,8г
Растворить и довести объем до 100мл, обязательно профильтровать.
Хранить при +4°C не более 3-х месяцев.

2. Буфер для концентрирующего геля (4-х кратный): 0,5M Tris-HCl, 0,4%-ный SDS, pH 6,8. Объем: 200мл; pH доводить перед добавлением SDS. Хранить при +4°C.

3. Буфер для разделяющего геля (4-х кратный): 1,5M Tris-HCl, 0,4%-ный SDS, pH 8,8. Объем: 200мл; pH доводить перед добавлением SDS. Хранить при +4°C.

4. Буфер для электрофореза: 0,025M Tris-HCl (3 г), 0,192M глицин (24,4г); 0,1%-ный SDS (1г); pH –8,3. Объем: 1000мл; pH не доводить. Хранить при +4°C.

5. Буфер для образцов (2-х кратный): 0,02M Tris-HCl, 0,0021 M ЭДТА, 2%-ный SDS, 10%-ный 2-меркаптоэтанол; 20%-ный глицерин; 0,002%-ный раствор бромфенолового синего; pH 8,0. Хранить при -20°C не более 6 месяцев.

6. Персульфат аммония (10%-ный раствор): 30мг персульфата аммония + 270мл воды (каждый раз готовится свежий раствор или приготовленный 10%-ный раствор хранят при -20°C не более 1 месяца).

7. Раствор для фиксации и окрашивания геля: 125мл изопропанола; 50мл уксусной кислоты; 325мл воды; 1,25г Кумасси R-250. Объем: 500мл. Краску профильтровать. Хранить в плотно закрытой бутылке под тягой.

8. Раствор для отмывки: 50мл уксусной кислоты; 50мл изопропанола; 400мл воды. Объем: 500мл. Хранить в плотно закрытой бутылке под тягой.

Ход работы:

1. Приготовление необходимых растворов и буферов

- Приготовление раствора для заливки концентрирующего геля;
- Приготовление раствора для заливки разделяющего геля;
- Приготовление раствора персульфата аммония;
- Дегазация растворов для заливки концентрирующего и разделяющего геля.

2. *Проведение полимеризации полиакриламидных гелей*
 - a) Собрать систему для заливки гелей, отметить маркером; границы заливки разделяющего геля;
 - b) Добавить персульфат в раствор и залить разделяющий гель;
 - c) Осторожно наслоить примерно 100 мкл воды на гель для устранения пузырей;
 - d) Дождаться пока гель застынет и появится четкая граница между водой и гелем – удалить наслоенную ранее воду;
 - e) В раствор для концентрирующего геля добавить персульфат;
 - f) Вставить гребенку и залить концентрирующий гель.

Заливка геля:

Концентрирующий гель:

650мкл концентрата геля
 1250мкл концентрирующего буфера
 5мкл ТЕМЕД
 3мл воды
 дегазировать
 50мкл 10%-ного персульфата аммония
 Объем: 5мл

Разделяющий гель (10%):

3,3мл концентрата геля
 2,5мл разделяющего буфера
 10мкл ТЕМЕД
 4,09мл воды
 дегазировать
 100мкл 10%-ного персульфата аммония
 Объем: 10мл

3. *Сборка аппарата для проведения электрофореза:*
 - a) Собрать систему для проведения электрофореза (закрепить стекло с залитым гелем на камере, с другой стороны камеры поставить заглушку);
 - b) Вынуть гребенку из застывшего концентрирующего геля и залить катодный буфер в верхнюю часть камеры.
4. *Подготовка и нанесение образцов*
 - a) Подготовить образцы для электрофореза смешением анализируемых проб с буфером для образцов в соотношении 1:1 и кипятить 5 мин;
 - b) В полученные «карманы» геля осторожно нанести пробы, которые из-за разности в плотности с катодным буфером опускаются на дно кармашков;
 - c) В нижнюю часть камеры залить анодный буфер.
5. *Проведение электрофореза*
 - a) Полностью собрать систему для проведения электрофореза и подключить ее к источнику тока: сначала электрофорез ведется при токе 15мА, после перехода лидирующего красителя из концентрирующего в разделяющий гель силу тока увеличить до 30мА (в случае использования стабилизации по напряжению – 50В и 120В, соответственно);
 - b) Выключить систему, после того как полоса лидирующего красителя дойдет до нижней границы геля.
6. *Фиксация и окраска геля*
 - a) Гель снять со стекол и поместить в фиксирующий раствор;
 - b) Окрасить и отмыть от избыточного фона краски.
7. *Анализ результатов*
 - a) Сфотографировать гель, используя систему гель-документирования
 - b) Проанализировать полученные результаты, используя специальные программы.

Подготовка образцов: 20мкл белка +20мкл буфера для образцов, кипятить 5мин.

Электрофорез для разделения низкомолекулярных белков и пептидов (1-30кДа)

Реактивы:

1. Анодный буфер: 200мМ ТРИС-НСl, pH 8,9 (готовится из 10х раствора).

Приготовление 10-кратного раствора: 121,1г ТРИС растворить в 450мл воды MilliQ, довести pH до 8,9 концентрированной HCl. Довести объем раствора до 0,5л, профильтровать. Хранить при +4°C.

2. Катодный буфер: 100мМ ТРИС-НСl, 100мМ трицин (pH должен быть в районе 8,25). Готовится из 10х раствора. Перед использованием добавить SDS до 0,1%.

Приготовление 10-кратного раствора: Смешать 60,55г ТРИС и 89,59г трицина. Добавить воды MilliQ до 500мл (pH не доводить, однако результирующий pH должен быть в районе 8,25), профильтровать. Хранить при +4°C.

3. Буфер для геля: 3,0 М ТРИС-НСl, pH 8,45.

На 100мл буфера – 36,33г ТРИС, растворить до объема примерно 90мл, затем довести pH до 8,45 концентрированной HCl. После этого в мерном цилиндре довести объем до 100мл и профильтровать. Хранить при +4°C.

4. Раствор акриламида ААк (концентрирующий гель): 48% акриламида, 1,5% бис-акриламида (49.5%Т, 3%С): на 50мл раствора – 24г акриламида, 0,75г бис-акриламида.

5. Раствор акриламида ААр (разделяющий гель): 46.5% акриламида, 3.0% бис-акриламида (49.5%Т, 6%С): на 50мл стока – 23,25г акриламида, 1,5г бис-акриламида.

Заливка геля:

Разделяющий гель (16,5%)

2мл воды
3мл буфера для геля
3мл раствор АА_р
1,2г (0,95 мл) глицерина
90 мкл 10% SDS
45 мкл 10% персульфата аммония
4 мкл ТЕМЕД

Концентрирующий гель

4мл воды
1,5 мл буфера для геля
0,5 мл раствор АА_к

45мкл 10% SDS
50мкл 10% персульфата аммония
5мкл ТЕМЕД

6. Персульфат аммония (ПА 10%-ный раствор): 30мг персульфата аммония + 270мкл воды (каждый раз готовится свежий раствор или приготовленный 10%-ный раствор хранят при -20°C не более 1 месяца).

7. Буфер для образцов (2-х кратный): 0,1М ТРИС-НСl, pH 6,8; 24%-ный глицерин, 8%-ный SDS; 4%-ный 2-меркаптоэтанол; 4мМ ЭДТА; 3мМ азид натрия; 0,02%-ный Coomassie Blue G-250

Подготовка образцов: 20мкл белка +20мкл буфера для образцов, кипятить 5мин.

8. Раствор для фиксации геля: 200мл изопропанола; 50мл уксусной кислоты; 250мл воды. Объем: 500мл. Хранить в плотно закрытой бутылке под тягой.

9. Раствор для окрашивания геля: 50мл уксусной кислоты; 550мл воды; 125мг Кумасси G-250. Объем: 500мл.
Краску профильтровать. Хранить в плотно закрытой бутылке под тягой.

10. Раствор для отмывки: 50мл уксусной кислоты; 450мл воды. Объем: 500мл.
Хранить в плотно закрытой бутылке под тягой.

2.5. Методы определения свободных аминокислот

Определение свободного гистидина в почвенных вытяжках методом тонкослойной хроматографии

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) сочетает в себе достоинства бумажной и колоночной хроматографии, занимает мало времени, позволяет работать с малыми количествами пробы и проводить одновременное тестирование серии образцов.

Реактивы: 1. Н-бутанол; 2. Уксусная кислота, х.ч.; 3. Изопропанол, 10%-ный раствор, х.ч.; 4. Диэтиловый эфир, х.ч.; 5. Ацетон, ч.; 6. Нингидрин, 0,2%-ный в ацетоне; 7. Стандартные растворы гистидина от 7 до 280мкг/мл 8. Хроматографические пластинки Silufol UV-250.

Подготовка образца. 5мл водной почвенной вытяжки центрифугировать при 9000g и затем надосадочную жидкость через мембранный фильтр 0,2мкм. Фильтрат экстрагировать дважды по 5мл диэтилового эфира, 2мл водной фазы испарить в сушильном шкафу при температуре 60°C. Осадок перерастворить в 2мл 10%-ного изопропанола. Полученный образец использовать для хроматографии.

Ход определения. Для полуколичественного анализа гистидина ТСХ приготовить стандартные растворы гистидина в 10%-ном изопропаноле: 7; 28; 77; 154; 280мкг/мл. При полном извлечении гистидина из почвы его количество составляет 57-114мкг/мл.

Подготовленные образцы почвы и стандартные растворы гистидина нанести на пластинку в количестве 10мкл (пятно). Пластинки трижды прогнать в системе растворителей: н-бутанол-уксусная кислота-вода (30:6:14). Длина пробега растворителя: 12,5; 6,25 и 12,5см соответственно. После каждого прогона пластинку подсушить на воздухе. По окончании разделения пластинку сушить при 40°C и обработать 0,2%-ным раствором нингидрина в ацетоне. После чего нагреть 5 минут при 80°C. Гистидин проявляется в виде рыже-коричневых пятен на желтоватом фоне.

Оценку присутствия гистидина в почвенных вытяжках проводят по значению R_f полученных пятен, а также визуально – по площади пятна и характеру окраски.

2.6. Методы изучения свойств отдельных белков. Гемоглобин

Определение содержания гемоглобина циангемоглобиновым методом

Принцип метода: Окисление гемоглобина феррицианидом калия и присоединение цианида приводит к образованию соединений с максимумом поглощения в области 540нм, интенсивность поглощения измеряется.

Реактивы: 1. Реактив Драбкина. 1г кислого углекислого натрия; 0,2г феррицианида калия и 50мг цианистого калия развести на 1000мл дист. воды.

2. Калибровочный раствор гемоглобина, 120г/л*

*Примечание. В работе используются стандартные наборы для определения гемоглобина, содержащие составляющие реактива Драбкина и калибровочный раствор гемоглобина.

Ход определения. 20мкл свежезабранной крови или любого гемолизата поместить в 5мл раствора Драбкина. Приготовить также стандартную пробу: 20мкл калибровочного раствора гемоглобина на 5мл реактива Драбкина. В отдельную пробирку также налейте 5мл реактива Драбкина для настройки прибора. Через 15 минут пробы промерить при длине волны 540нм, кювета 1см, нуль настроить по реактиву Драбкина.

$$\text{Расчет: } X \text{ Hb г/л} = (E_{\text{оп}} / E_{\text{ст}}) \times 120$$

Определение содержания отдельных фракций гемоглобина

(Заводник И.Б., Лапшина Е.А., 1996)

Основной функцией гемоглобина является транспорт кислорода из легких к клеткам тканей организма. Эффективный транспорт непосредственно связан с изменением сродства гемоглобина к кислороду в зависимости от условий. Наибольшим сродством к кислороду гемоглобин обладает в условиях повышения содержания протонов (закисления), это сопровождается активацией производства в эритроцитах 2,3-дифосфоглицерата, снижающего сродство гемоглобина к кислороду за счет конформационных изменений глобул субъединиц белка. Такая ситуация наиболее характерна для тканей, где при недостатке кислорода накапливаются ионы водорода. Таким образом, гемоглобин в эритроцитах может находиться в оксигенированном и дезоксигенированном состоянии. В ходе отдачи кислорода часть гемоглобина может окисляться до метформы (железо в степени окисления +3), восстановление его осуществляется с помощью метгемоглобинредуктазных систем. Различные формы гемоглобина имеют различные максимумы поглощения, что лежит в основе определения их соотношения.

Принцип метода: Для определения фракций гемоглобина используют их максимумы поглощения и расчет в процентах по отношению к их сумме.

Реактив: 5мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,6

Ход определения. В 5мл 5мМ буфера внести 10-20мкл суспензии отмытых эритроцитов (можно использовать 20мкл цельной крови). Перемешать, эритроциты при этом должны полностью гемолизироваться. Сразу провести измерение оптической плотности при длинах волн: 630, 577, 554нм против буфера (настройка нуля). Максимум поглощения метгемоглобина – 630нм; оксигемоглобина – 577нм; дезоксигемоглобина – 554нм.

Расчет проводится по формулам:

$$\text{Окси Hb, \%} = \frac{E_{\lambda 577} \times 100}{\Sigma E_{\lambda 577} + \lambda 554 + E_{\lambda 630}}$$

$$\text{Дезокси Hb, \%} = \frac{E_{\lambda 554} \times 100}{\Sigma E_{\lambda 577} + \lambda 554 + E_{\lambda 630}}$$

$$\text{Мет Hb, \%} = \frac{E_{\lambda 630} \times 100}{\Sigma E_{\lambda 577} + \lambda 554 + E_{\lambda 630}}$$

Определение мембраносвязанного гемоглобина
(З.С. Токтамысова, Н.Х. Биржанова, 1990)

Принцип метода. После гемолиза мембраносвязанный гемоглобин оседает вместе с мембранной фракцией. По уменьшению оптической плотности гемолизата после осаждения мембран можно определить количество мембраносвязанного гемоглобина.

Реактив: 5ММ Na-фосфатный буфер, pH 7,6

Ход определения. В 5мл буферного раствора внести 20мкл суспензии чистых эритроцитов. Перемешать, должен произойти полный гемолиз, пробы прозрачны. Измерить начальную оптическую плотность, длина волны 540нм, кювета 1см (E₁). Пробы центрифугировать в режиме 3000-4500g в течение 15-10 минут (соответственно ускорению) и измерить конечную ОП (E₂), фоновая проба – буферный раствор.

Расчет:

$$\text{Мембраносвязанный гемоглобин, \%} = E_1 - E_2 \times 100 / E_1$$

Определение скорости химического окисления гемоглобина
(А.Е. Мышкин, Л.Д. Богданова, 1990)

Принцип метода. Измеряется скорость окисления оксигемоглобина феррицианидом калия по разнице ОП на максимуме поглощения оксигемоглобина 577нм.

Реактивы: 1. 5ММ натрий-фосфатный буфер, pH 7,2;

2. 0,03ММ раствор феррицианида калия.

Пробоподготовка. Используется гемолизат эритроцитов 1:20. Гемолиз вызывается добавлением холодной дист.воды.

Ход определения. 0,15мл гемолизата эритроцитов добавить в 4мл буфера. Окисление вызывается внесением 0,2мл феррицианида калия. Сразу же замеряется ОП на длине волны 577нм. Пробы целесообразно перед добавлением феррицианида поместить в кюветы (1см). Через 10 минут инкубации при 37°С измерить конечную ОП. Фоновая проба – буфер.

Расчет:

$$X \text{ мкМ оксиHb/мин на г Hb/л} = (E_1 - E_2) \times 4,35 \times 1000 / 15,37 \times 10 \times 0,15 \times \text{г Hb/л},$$

где 4,35 – объем пробы, в которой проводится измерение, мл;

1000 – пересчет в мкМ/л;

15,37 – мм коэффициент экстинкции;

10 – время, мин;

0,15мл – количество гемолизата, мл;

г Hb/л – содержание гемоглобина в гемолизате, г/л.

РАЗДЕЛ 3. ФЕРМЕНТЫ

Ферментами называются биокатализаторы белковой природы. Большинство ферментативных белков имеет глобулярную структурную организацию. Многие ферменты представляют собой олигомерные белки, состоящие из нескольких субъединиц или функциональных доменов. Различные домены выполняют обычно неодинаковые функции, домены одного и того же типа могут обнаруживаться в составе разных ферментов. Например, для многих дегидрогеназ характерно наличие НАД-связывающего домена (НАД-зависимые дегидрогеназы). Олигомерные ферменты могут состоять из идентичных субъединиц, выполняющих сходные функции. В таком случае каждая субъединица может обладать ферментативной активностью выраженной в меньшей степени, чем у олигомера. Некоторые ферменты содержат в составе молекулы каталитические и регуляторные субъединицы. У данных ферментов катализ осуществляют только каталитические субъединицы, а регуляторные модифицируют активность. Пример: протеинкиназы А (ЦАМФ-зависимые) состоят из двух каталитических и двух регуляторных субъединиц, связывающих ЦАМФ.

Каталитическая активность ферментов обусловлена наличием активного центра, имеющего внутреннее расположение в рыхло спирализованной части молекулы. Активный центр содержит химически реактивные группы атомов, участвующие в катализе. Часто в активном центре имеются небелковые компоненты – коферменты, облегчающие катализ.

Активность ферментов определяется как скорость превращения субстратов в продукты и выражается в единицах концентрации в единицу времени. Удельная активность фермента представляет собой отношение изменения концентрации субстрата (или продукта) в единицу времени к концентрации самого фермента.

Каталитическая способность ферментов строго регулируется. Существуют механизмы быстрой регуляции активности уже присутствующих в клетках ферментов: изменение концентрации субстратов, соотношения активаторов и ингибиторов, реакции среды. Ферменты могут активироваться или ингибироваться с помощью химической модификации белковой части молекулы (фосфорилирование, аденилирование, ацетилирование), частичного протеолиза, а также регуляция протекания биохимических реакций в клетках может осуществляться за счет увеличения или снижения активной концентрации различных ферментов через усиление или снижение экспрессии соответствующих генов (медленная регуляция).

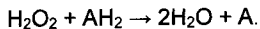
3.1. Приготовление ферментных препаратов. Определение удельной активности ферментов. Изучение кинетических характеристик ферментных препаратов

Для изучения каталитической активности часто используют методы частичного выделения ферментов из клеток путем экстрагирования и получения концентрированного раствора, содержащего данный фермент – ферментного препарата. Ферментный препарат получают с помощью экстрагирующих буферов, которые имеют различный состав и рН в зависимости от объекта, из которого выделяют фермент и особенностей самого фермента.

Получение ферментного препарата пероксидазы из растительных объектов (И.М. Савич, Т.Л. Тажибеева, 1988)

Пероксидазы – группа ферментов, осуществляющих реакции окисления с помощью перекиси водорода. Пероксидазы очень широко распространены в растительных тканях, где они локализируются в пероксисомах; в небольшом

количестве они встречаются в животных тканях и у аэробных бактерий. Катализируемая реакция:



Наиболее широко исследована пероксидаза, содержащаяся в корнеплодах хрена. Она содержит один гем с $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$ на молекулу белка с М.М. 40кДа.

Для выделения фермента можно использовать различные растительные ткани, однако главным принципом должно стать присутствие данного фермента в объекте в достаточном количестве. Удобно использовать корнеплоды хрена, редьки, кочерыжку кочана капусты, проростки и семена растений. Мешает выделению наличие большого количества пигментов и пектиновых соединений, обуславливающих соответственно цвет и вязкость гомогенатов.

Ход выделения препарата пероксидазы. *Реактив:* экстрагирующий буфер – 5мМ Трис-НСI, содержащий 3,8мМ глицина и 30% сахарозы, рН 8,3 (холодный).

Для получения препаратов пероксидазы (КФ 1.11.1.7. H_2O_2 -оксидоредуктаза) навеску растительной ткани (0,5-1г) растереть в ступке с добавлением очищенного песка и экстрагирующего буфера (отношение 1:5). Полученный гомогенат профильтровать через 2 слоя марли для удаления крупных остатков ткани и отцентрифугировать 750g, 10 минут. Белки гомогената осадить 4-мя объемами холодного (-18°C) ацетона. Осадок отделить центрифугированием – 750g, 10 минут и растворить в небольшом объеме 30%-ной сахарозы. Полученный ферментный препарат использовать для дальнейших работ.

Определение качества полученного препарата (О.В. Лебедева и соавт., 1977)

Реактив: сохраняющий буфер – 0,01М натрий фосфатный буфер, содержащий 0,1М нитрита калия, рН 7,0.

Ход определения. 0,5мл препарата развести в 50мл сохраняющего буфера. Измерить оптическую плотность (ОП) на двух длинах волн: 280нм (область максимального поглощения всех белков) и 403нм (область поглощения гемовых структур пероксидазы). Длина поглощающего слоя – 10мм. Рассчитать отношение поглощения гемовых структур пероксидазы к общему поглощению белковых соединений препарата. Препарат считается хорошим, если это отношение больше 0,5.

Значение ОП при длине волны 403нм определяет концентрацию пероксидазы в приготовленном препарате. Для расчета концентрации используется молярный коэффициент экстинкции $\epsilon = 9,5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Определение удельной активности препарата пероксидазы (А.Н. Бояркин)

Принцип метода заключается в измерении скорости реакции окисления бензидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы. Окисленная форма бензидина имеет голубую окраску. Этот субстрат окисления дает лучшую чувствительность и линейную зависимость интенсивности окраски от концентрации фермента в широком диапазоне.

Реактивы: 1. Ацетатный буфер 0,1М, рН 5,4; 2. Раствор перекиси водорода 0,01%-ный; 3. Раствор бензидина в ацетатном буфере 0,92г/л. Навеску бензидина растереть в фарфоровой ступке с добавлением небольшого количества буфера. Затем полученную смесь перенести в мерную посуду и довести до необходимого объема ацетатным буфером. Дать настояться минут 20-30, профильтровать. Иногда целесообразно оставить взвесь на сутки, а потом отфильтровать; 4. Полученный ферментный препарат, разведенный в сохраняющем буфере.

Ход определения. Приготовить ряд пробирок, в которые разлить по 2мл ацетатного буфера, по 2мл ферментного препарата, по 2мл раствора бензидина. Далее реакцию для каждой пробы провести отдельно, переливая содержимое пробирок в кювету ФЭКа с толщиной поглощающего слоя 2см. Поместив кювету в кюветодержатель, стартовать реакцию добавлением 2мл перекиси водорода. Включив секундомер, измерить время за которое ОП достигнет значения 0,2 ед., длина волны 590нм.

Пероксидазную активность вычисляют по найденной скорости реакции и выражают в условных единицах, на 1г сырой ткани (или на 1 единицу белка) по формуле:

$$A = Da\beta\epsilon / (c \cdot t), \text{ где}$$

A – активность фермента,

D – оптическая плотность, равная 0,125 или 0,250;

a – отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, к массе сырой ткани, см³/г;

β – степень дополнительного разведения вытяжки после центрифугирования;

ε – степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси в кювете;

c – толщина слоя (2см);

t – время, с.

В случае если реакция идет медленно или, наоборот, очень быстро, можно выбирать любое значение ОП и соответствующее ему время достижения и подставлять в формулу.

Получение фракций пероксидазы из растительных тканей (А.В. Гуськов, И.А. Тихомиров, Ф.Я. Поликарпова, 1988)

В основу выделения положена различная экстрагируемость фермента в зависимости от ионной силы применяемого буферного раствора и прочности связи фермента с клеточными структурами. Можно выделить три фракции пероксидазы: растворимую (цитоплазматический фермент); ионсвязанную и ковалентносвязанную.

1. *Получение растворимой фракции.* Первый элюирующий буфер: 0,02М К, Na-фосфатный буфер, pH 6,1.

Навески растительных тканей 1,0-2,0г растереть с 10мл охлажденного элюирующего буфера. Центрифугировать при 8000g 10 минут. Процедуру повторить 2-3 раза. Надосадочные жидкости соединить, они содержат растворимую фракцию пероксидазы.

2. *Получение ионсвязанной фракции.* Второй элюирующий буфер: 0,02М К, Na-фосфатный буфер. pH 6,1, содержащий 1М хлористого натрия.

Осадок растительной ткани растереть с 10мл элюирующего буфера, отцентрифугировать в том же режиме. Процедуру повторить 2-3 раза, надосадочные жидкости соединить, они содержат ионорастворимую пероксидазу.

3. *Получение ковалентносвязанной пероксидазы.* Реактивы: пектиназа; целлюлаза; первый элюирующий буфер.

Осадок, состоящий в основном из клеточных стенок развести в 10мл первого элюирующего буфера, инкубировать 20 часов при комнатной температуре в темноте с добавлением 0,5% пектиназы и 0,1% целлюлазы. После окончания инкубации суспензию профильтровать. Фильтрат содержит ковалентносвязанную пероксидазу.

В полученных фракциях определить концентрацию фермента и его активность.

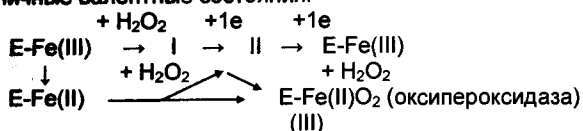
Изучение термостабильности препаратов пероксидазы (А.П. Ивакин, А.А. Грушин, 1988)

Реактивы: среда экстрагирования – 0,01М Трис-глициновый буфер, pH 8,3, концентрация глицина 3,8мМ, 15% сахарозы, 0,1% цистеина, 0,1% аскорбиновой кислоты.

Навеску листьев растений (например, томата) в количестве 3г растереть в фарфоровой ступке на льду с добавлением 3мл среды экстрагирования. Полученный гомогенат отжать через 2 слоя плотного полотна. В экстракте определить концентрацию фермента и затем разделить на три пробирки. Первую оставить при комнатной температуре, вторую поместить в водный термостат при 45°C, третью – при 65°C. Инкубацию проводить в течение 2 часов. Затем определить удельную активность фермента по методу Бояркина.

Изучение кинетических характеристик пероксидазы

Механизм действия пероксидаз и каталаз (катализируемая реакция – окисление-восстановление перекиси водорода) предполагает переход железа в различные валентные состояния:



Соединение I превращается в соединение II одноэлектронным восстановлением, а соединение II возвращается в свободную пероксидазу вторым одноэлектронным восстановлением (например, с использованием феррицианида). Фермент в состоянии Fe-III может быть восстановлен в форму Fe-II. Когда Fe-II-фермент взаимодействует с H₂O₂, он превращается в соединение II, которое представляет собой Fe-II-комплекс с перекисным анионом: E—Fe⁺(II)—OON. Присоединение H₂O₂ к соединению II приводит к образованию оксипероксидазы (соединение III), последняя восстанавливается, образуя две молекулы воды. Донором электронов в превращениях соединения I в II и, далее, исходный фермент, служат различные органические и неорганические субстраты. Примером органического субстрата может служить бензидин, неорганического – феррицианид калия.

Определение K_m для пероксидазной реакции с бензидином

K_m – константа Михаэлиса-Ментен, представляет собой концентрацию субстрата, при которой скорость ферментативной реакции составляет половину от максимальной. Определить K_m можно экспериментально, определив скорость ферментативной реакции при различных концентрациях субстрата, не достигающих насыщающей. По полученным экспериментальным данным строятся графики зависимости (V) от (S). Удобно пользоваться системой двух обратных величин 1/V и 1/S (график Лайнуивера-Берка).

Реактивы: 1. Ацетатный буфер 0,1М, pH 5,4; 2. Серия растворов перекиси водорода: 0,002%; 0,004; 0,008; 0,01%; 0,015%; 3. Раствор бензидина 0,92г/л в ацетатном буфере (см. приготовление выше); 4. Раствор фермента: 2мг пероксидазы из хрена развести в 50мл 0,01М фосфатного буфера, pH 7,0. Затем 1мл исходного раствора развести в 100 раз тем же буфером.

Ход определения. 1. Определите истинную концентрацию фермента в полученном препарате. Для этого измерить ОП раствора фермента при длине волны 403нм. Для расчета использовать молярный коэффициент экстинкции 9,5 × 10⁴М⁻¹см⁻¹.

2. Определите молярную концентрацию перекиси водорода, измерив ОП растворов перекиси на длине волны 230нм. Для расчета используйте молярный коэффициент экстинкции $72,7 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$. >П

Получение ферментного препарата фосфолипазы А эритроцитов и определение активности (Г.А. Безрукова, В.И. Рубин, 1989)

Фосфолипазы, ферменты относящиеся к классы гидролаз, подклассу эстераз, гидролизующих сложные эфирные связи. Ферменты осуществляют отщепление жирнокислотных остатков от фосфатидилглицеролов.

Активация внутриклеточных фосфолипаз приводит к разрушению цитомембран за счет отщепления жирнокислотных остатков от мембранных фосфолипидов. Различают несколько видов фосфолипаз, специфически расщепляющих определенные сложноэфирные связи в четырех группах фосфолипидов мембран (фосфатидилхолинах; фосфатидилэтаноламинах; фосфатидилинозитах; фосфатидилсеринах). Наиболее часто встречаемым ферментом является фосфолипаза A_2 , отщепляющая из 2-го положения остаток арахидоновой кислоты из фосфатидилинозита. При этом образуются лизофосфатиды, изменяется мембранная проницаемость, а также выделяются биологически активные вторичные посредники: арахидоновая кислота, диацилглицерол.

Фосфолипаза A_2 (как и многие другие фосфолипазы) – Ca^{2+} -зависимый фермент, активация фермента происходит при усилении входа катионов кальция в клетки или освобождения его из внутриклеточных депо. Так как эти процессы связаны с состоянием того или иного функционального напряжения жизнедеятельности клеток, увеличение активных концентраций данного фермента свидетельствует о степени данного напряжения со всеми вытекающими последствиями.

Реактивы: 1. Субстратная смесь – 10%-ный раствор лецитина в 95%-ном диэтиловом эфире, содержащим 5% метанола; 2. ТРИС-НСl буфер 0,05M, содержащий 0,02M хлористого кальция, pH 7,5; 3. 2M раствор хлористого натрия; 4. Абсолютный этиловый спирт; 5. 154мM раствор NaCl, pH 7,2. Реакцию среды доводят с помощью 2M Na_2HPO_4 ; 6. Раствор PBS: 0,02M Na_2HPO_4 в 0,1M NaCl.

Приготовление ферментного препарата. Для приготовления ферментного препарата используют свежую кровь, взятую с 3,8%-ным цитратом натрия в отношении 9:1. Эритроциты отделяют от других компонентов крови, трижды отмывая холодным 154мM хлористым натрием с pH 7,2 или раствором PBS (0,1M NaCl + 20мM Na_2HPO_4). Отмывку проводят в режиме центрифугирования – 600g, 10 минут.

После последнего центрифугирования надосадочная жидкость удаляется и готовится гемолизат с помощью добавления холодной дистиллированной воды в отношении 1:1.

К 0,4мл гемолизата добавить 0,2мл 2M раствора хлористого натрия и перемешать в течение 10 минут при 37°C для полного экстрагирования фосфолипазы. Затем полученный экстракт смешивают с равным объемом трис-буфера.

Ход определения активности фосфолипазы А. В пробирки вносят по 25мкл препарата фермента и 2мл субстратной смеси. В контрольные пробирки сразу вносят по 3мл этанола для ингибирования фермента. Пробирки инкубируют при 37°C , 10 минут. После окончания инкубации в опытные пробы также добавляют по 3мл этилового спирта. Все пробы центрифугируют в течение 5 минут, 300g (1000об/мин) и измеряют оптическую плотность (ОП) при длине волны 500 нм, кювета 1см. За единицу активности ферментного препарата принимают вызываемое при стандартных условиях уменьшение ОП на 0,01 за 1 минуту. Удельную активность рассчитывают, определяя содержание гемоглобина в гемолизате.

$$A (\text{y.e.}) = (\text{ОПконт.} - \text{ОП опыт}) \times 2 \times 5,6 / 0,01 \times 10 \times 0,4 \times \text{Hb, мг/мл;}$$

- 2 – первичное разведение гемолизата;
- 5,6 – объем проб, мл;
- 0,01 – пересчет на единицу изменения ОП;
- 10 – время инкубации, мин;
- 0,4 – количество гемолизата в пробе, мл.

Определение содержания гемоглобина. Определение проводят цианогемоглобиновым методом, используя стандартные наборы.

Реактивы: 1. Реактив Драбкина – 1г кислого углекислого натрия; 0,2г феррицианида калия (красная кровяная соль) и 50мг цианистого калия (или ацетонцианида) на 1000мл раствора в дист.воде. 2. Стандартный раствор гемоглобина – 120г/л (120мг/мл). В наборе присутствуют все компоненты для приготовления реактива Драбкина и стандартный раствор гемоглобина.

Ход определения. 20мл гемолизата (для других методов могут использоваться 20мл цельной крови, 20мл суспензии эритроцитов) добавить в 5мл реактива Драбкина. Стандартная проба – 20мл стандартного раствора и 5мл реактива Драбкина. Через 15 минут измерить ОП и опытных и стандартной пробы против фоновой пробы: 20мл дист. воды + 5мл реактива Драбкина. Длина волны 540нм, толщина кюветы – 1см.

Расчет:

$$\text{Hb, мг/мл (г/л)} = \text{ОП опыт} \times 120 / \text{ОП стандарт}$$

Получение ферментного препарата карбоксипептидазы А и определение его активности

Карбоксипептидазы – ферменты, осуществляющие гидролитическое отщепление аминокислот от молекул пептидов с конца свободной карбоксильной группы. Карбоксипептидазы содержатся в лизосомах эукариотических клеток, наибольшее количество их синтезируется в поджелудочной железе и поступает в панкреатический сок.

Реактивы: 1. 2%-ный раствор хлористого натрия; 2. Толуол; 3. 5Н-ный раствор уксусной кислоты; 4. Сульфат аммония, порошок.

Приготовление ферментного препарата. Замороженную поджелудочную железу коровы или свиньи измельчить и размешать с трехкратным по весу количеством 2%-го раствора хлористого натрия и добавить толуол в количестве 20% от веса взятой железы. Оставить на ночь при комнатной температуре в закрытой посуде. На следующий день снять пену, профильтровать через два слоя марли, прибавить 5Н раствор уксусной кислоты постепенно, с контролированием рН, до рН 4,0. Снова профильтровать, в фильтрат добавить сульфат аммония в расчете 39,0г на каждые 100мл. Фермент осаждается. Осадок отделить центрифугированием в режиме 700g, 15 минут. Для высушивания помещают в бюкс и высушивают при комнатной температуре. Высушенный осадок осторожно растереть в порошок. Полученный препарат карбоксипептидазы А перенести в сухой и чистый пузырек и промаркировать.

Получение субстрата для карбоксипептидазы А. В качестве субстрата используют гидролизат белка звестина, который в свою очередь может быть выделен из конопляного семени.

Реактивы: 1. 5%-ный раствор хлористого натрия; 2. 1Н-ный раствор соляной кислоты; 3. Препарат пепсина; 4. Формалин, 40%-ный; 5. Индикатор фенолфталеин, 1%-ный раствор; 6. 1Н-ный раствор едкого натрия.

50г конопляного семени тщательно растереть в ступке и поместить в стакан объемом 1000мл, прибавить 500мл 5%-ного раствора хлористого натрия и поместить на 1 час в термостат при 50°C, смесь периодически помешивать. Затем теплую смесь профильтровать через складчатый фильтр. Фильтрат поместить на ночь в холодильник для осаждения эдестина. На следующий день раствор декантировать (слить после отстаивания) и в жидкость добавить еще 500мл 5%-го раствора хлористого натрия для переосаждения белка. Полученный осадок дважды промыть водой, удаляя жидкость либо центрифугированием, либо фильтрованием. Режим центрифугирования выбирают, ориентируясь на характер осадка. Полученный промытый осадок перенести в бюкс или чашку Петри для высушивания при комнатной температуре. Высохший белок растирают в порошок и помещают в приготовленный сухой чистый пузырек, который обязательно маркируют.

Для приготовления гидролизата 2,5г эдестина внести в стакан и добавив 20мл 1N-ного раствора соляной кислоты, 12,5мл дист. воды и 100 г пепсина, настаивать в течение ночи при температуре 37°C. После окончания гидролиза смесь профильтровать. К каждому 10мл фильтрата прибавить 1мл формалина и нейтрализовать с внесением фенолфталеина для контроля 1N-ным раствором едкого натра. Объем доводят до 20мл дист.водой. Раствор оставляют еще на ночь в холодильнике, на следующий день он может быть использован для определения активности карбоксипептидазы А.

Определение активности карбоксипептидазы А. Реактивы: 1. Препарат карбоксипептидазы А; 2. Фосфатный буфер 0,1М, рН 8,0. 3. Раствор субстрата; 4. Водный раствор нингидрина 0,5%-ный; 5. 15%-ная трихлоруксусная кислота (ТХУ).

Ход определения. 10мг порошка карбоксипептидазы А растереть с 10мл фосфатного буфера. В пробирки разлить по 1 мл раствора препарата и 1,5мл раствора субстрата. Три пробирки (повторы) использовать в качестве контроля на начальное содержание α-аминогрупп, а остальные поместить в термостат (лучше водяной) 37°C и инкубировать 3 часа. В контрольные пробирки сразу добавить 1,5мл 15%-ной ТХУ. Определение содержания α-аминогрупп в контрольных пробирках можно провести во время инкубации опытных проб. Для этого пробы отцентрифугировать в режиме 700g, 15 минут. К 3,5мл центрифугата добавить 0,5мл 0,5%-ного раствора нингидрина, поместить на кипящую водяную баню на 10 минут. После охлаждения пробы колориметрировать при длине волны 570nm против контроля на реактивы: 3,5мл дист.воды + 0,5мл нингидрина (также помещается на водяную баню на 10 минут).

После окончания инкубации в опытные пробы также добавить 1,5мл 15%-ной ТХУ, центрифугировать и к 3,5мл надосадочной жидкости добавить 0,5мл 0,5%-ного нингидрина, поместить на 10 минут на кипящую водяную баню и после охлаждения проколориметрировать.

Расчет:

Активность карбоксипептидазы А в мг α-аминогрупп /час*мл = (ОП опыт – ОП конт.) × 4 / 3 × 1;

4 – количество пробы, мл;

3 – время инкубации, час;

1 – количество препарата, мл.

Определив количество белка в препарате методом Лоури или микробиуретовым методом, можно рассчитать удельную активность фермента. Количество белка в мг/мл помещают в знаменатель формулы расчета.

Выделение препарата липоксигеназы из плодов помидора и определение его активности (Регдел Д. и соавт., 1994)

Получение препарата липоксигеназы. Реактивы: 1. Буфер А: 50мМ фосфатный буфер, pH 6,8, содержащий 1мМ аскорбиновой кислоты и 1мМ ЭДТА; 2. Буфер Б: ТРИС-НСl, 10мМ, pH 6,8; 3. Порошок аммония сернокислого.

Плод помидора среднего размера (можно взять зеленые, желтые или красные) измельчить ножницами и растереть в ступке, перенести в стаканчик и экстрагировать растворимые соединения в течение 30 минут при комнатной температуре при постоянном помешивании. Стакан можно поместить на магнитную мешалку. Затем удалить нерастворимые остатки центрифугированием в режиме 10000g, 15 минут. Экстракт насытить порошком сульфата аммония до концентрации 0,25 (одну четвертую часть) и снова осадок удалить центрифугированием 15000g, 15 минут. Надосадочную жидкость насытить до 0,75 (три четвертых части) сульфатом аммония и снова центрифугировать в том же режиме. Осадок суспендировать в буфере А 1:1 и диализовать против 10-ти кратного объема буфера Б в течение 20 часов (оставить до следующего дня). Диализат проверить на содержание белка, он должен содержать от 5 до 40мг белка в полученном объеме.

Выделение субстрата для липоксигеназы. 1. **Выделение субмитохондриальных частиц. Реактив:** 0,25М раствор сахарозы. Материал: печень крысы или другого животного.

Ход выделения. Печень промыть холодным (2-4°C) раствором сахарозы, подсушить на фильтровальной бумаге и взвесить.

Ткань гомогенизировать с 0,25М раствором сахарозы из расчета 1:9 (вес/объем) в гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в течение 3 минут. Гомогенат профильтровать через два слоя марли для удаления не разрушенных частей соединительной ткани. 10мл гомогената центрифугировать в режиме 600g, 10 минут. Супернатант отделить в отдельную пробирку. Осадок дважды промыть, добавляя по 2,5мл сахарозы и центрифугируя в том же режиме, каждый раз собирая супернатант. Все три супернатанта объединить, а осадок (ядерная фракция) отбросить. Объединенный супернатант центрифугировать при 8500g, 10 минут. Супернатант отбросить, а осадок промыть 2,5мл сахарозы, центрифугируя в том же режиме. Промытый осадок митохондрий ресуспендировать в 2мл сахарозы.

2. Выделение суммарного липида их субмитохондриальных частиц. Реактивы: 1. Натрий-фосфатный буфер, 0,1М, pH 7,4; 2. Хлороформ; 3. Метанол; 4. 0,1М хлористый калий; 5. Ледяная баня.

Ход выделения. 0,5мл суспензии субмитохондриальных частиц разбавить до 2мл фосфатным буфером. Добавить 2,5мл хлороформа и 0,5мл метанола (нельзя применять пластиковые пробирки). Смесь встряхивать в течение 1 минуты и оставить в ледяной бане на 5 минут. Затем добавить 2,5мл хлороформа и 2,5мл 0,1М хлористого калия. Интенсивно перемешать в течение 1 минуты и снова помещают на ледяную баню на 5 минут. Затем для четкого разделения фаз смесь центрифугируют при 4000об/мин в течение 5 минут. Нижнюю фазу отобрать, водно-метанольную фазу обработать еще раз хлороформом (2,5мл). Хлороформные фазы объединить и растворитель выпарить при 70°C. Полученный осадок липидов растворить в 0,5мл метанола.

Определение активности липоксигеназы из плодов помидора. Реактивы: 1. Na-фосфатный буфер 50мМ, pH 6,8; 2. Детергент, Твин-20.

Ход определения: Инкубационная среда содержит 2,77мл фосфатного буфера, 30мкл препарата суммарных липидов, 0,1мл детергента, 100мкл препарата фермента. Реакция запускается добавлением ферментного препарата. Сразу же измеряется ОП (E₁), инкубируется 10 минут при комнатной температуре. Измеряется E₂. ОП должна увеличиваться.

Расчет:

А мМ/мин на мг белка в мл препарата = $(E_2 - E_1) \times 3 \times 1000 / 10 \times 0,03 \times 25000 \times$
белок в ферментном препарате, мг/мл

3 – объем пробы, мл;

1000 – пересчет в мМ;

10 – время инкубации, мин;

0,03 – объем ферментного препарата;

25000 – молярный коэффициент экстинкции, $M^{-1}cm^{-1}$.

3.2. Определение активностей ферментов в различных биологических объектах

А. Определение активностей оксидоредуктаз

Оксидоредуктазы – ферменты первого класса международной классификации ферментов, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции. Различают два основных подкласса оксидоредуктаз: дегидрогеназы, осуществляющие окисление с помощью отрыва электронов и протонов от одного субстрата с переносом его на другой; оксигеназы – при окислении отщепляемые электроны переносятся непосредственно на кислород.

Дегидрогеназы в свою очередь подразделяются в зависимости от небелкового кофермента и окисляемой группы в составе молекулы. НАД-зависимые дегидрогеназы действуют на –СН-ОН-группу (гидроксо-), превращая ее в –СО- (оксо-) группировку. ФАД-зависимые дегидрогеназы. Обычно осуществляют окисление –СН₂-СН₂- групп с превращением их в –СН=СН-группы.

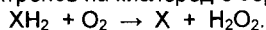
Оксигеназы. Состав данной группы очень разнообразен, обычно данные ферменты в активном центре имеют металлы переменной валентности (железо, медь, цинк, молибден, марганец, кобальт) или гемовые структуры. По строению активного центра и определяющему состоянию кислорода их делят на пять основных групп.

1. Определяющее состояние кислорода – O₂. Сюда входят гемопротеиды не являющиеся ферментами как таковыми: гемоглобин, миоглобин, гемозитрин, гемоцианин. Окисления металла при присоединении или отдаче кислорода в основном не происходит.

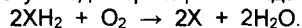
2. Определяющее состояние кислорода – O₂⁻ (супероксидрадикал). Ксантиноксидаза, НАДФН-оксидаза лейкоцитов. Реакция окисления субстрата происходит по схеме:

$XH_2 + O_2 \rightarrow X + O_2^- + 2H^+$. Такая реакция в отдельных случаях происходит и в условиях оксигенации→дезоксигенации гемоглобина, тогда образуется окисленный гемоглобин (метгемоглобин) и генерируется супероксидный радикал.

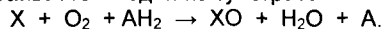
3. Преобладающее состояние кислорода – O₂²⁻ (перекись). Аминоксидазы, каталаза, пероксидазы, супероксиддисмутазы. Осуществляют перенос двух электронов на кислород с образованием перекиси водорода:



4. Перенос четырех электронов, разрыв связи –О-О- и образование двух молекул воды. Цитохромоксидазы, аскорбатоксидаза:



5. Преобладающее состояние кислорода – O₂³⁻, что также сопровождается разрывом связи –О-О- и образованию воды, а также радикала O[·], который встраивается в один из субстратов:

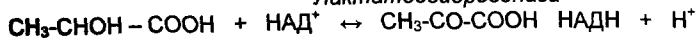


Определение активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ

Определение активности лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27)

Цитозольная, НАД-зависимая дегидрогеназа. Обратимо катализирует реакцию окисления молочной кислоты в пирувиноградную:

Лактатдегидрогеназа



Лактатдегидрогеназы – цитозольные ферменты, обычно локализованные вблизи гликолитического метаболона. Молярная масса – 135кДа. Присутствуют практически во всех клетках, не характерны только для растительных клеток. Тетрамер, состоит из субъединиц типа М, Н, X. Тип субъединиц определяет сродство к субстратам и формирует различные изоферменты. Например, изофермент, состоящий из 4-х субъединиц типа М, обладает наибольшим сродством к молочной кислоте и НАД⁺. По мере замены М-субъединиц на Н-субъединицы сродство к лактату падает, а к пирувату и НАДН – возрастает. Фермент, состоящий из 4-х Н-субъединиц, обладает наибольшим сродством к пирувиноградной кислоте и НАДН. Определить активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) можно в сыворотке крови, эритроцитах, гомогенатах различных животных тканей и у микроорганизмов.

Сывороточные НАД-зависимые дегидрогеназы в сыворотке крови отсутствуют. Обнаружение активностей некоторых из них свидетельствует о повреждении клеток, в которых они синтезируются. Небольшие фоновые значения активностей (норма) обнаруживаются за счет разрушения клеток крови и обновления ряда других клеток.

В эритроцитах активность ЛДГ высокая, изоферментный спектр предполагает наличие большего количества ферментов, обладающий большим сродством к пирувату и НАДН (то есть равновесие сдвинуто в сторону обратной реакции). В мышечной ткани и ткани печени аналогично, а в кардиомиоцитах – наоборот.

Реактивы: 1. Натрий-фосфатный буфер, pH 7,4; 2. 1мМ раствор пирувата натрия; 3. 6мМ раствор НАДН в буфере; 3. Исследуемая биологическая субстанция: сыворотка, гемолизат чистых эритроцитов; гомогенат ткани.

Подготовка биологических субстанций. 1. Сыворотка крови. Свежезабранная кровь оставляется на 15-20 минут для полного свертывания. Затем осторожно (опасаясь гемолиза), стеклянной палочкой кровь отделить от стенок пробирки и поместить в центрифугу, режим центрифугирования – 600g, 10 минут. Полученную верхнюю сывороточную фазу отсосать в отдельную пробирку (не задевать фракцию форменных элементов!).

2. Гемолизат эритроцитов. Свежезабранную кровь с цитратом натрия, 3,8%-ным в отношении 9:1 центрифугировать в режиме 600g, 10 минут. Верхнюю фазу – плазму отсосать. Фракция форменных элементов отмывается от лейкоцитов холодным 0,154М раствором хлористого натрия или раствором PBS трижды, соблюдая тот же режим центрифугирования. Полученная фракция чистых эритроцитов используется для приготовления гемолизата.

В 0,1мл суспензии эритроцитов добавить 0,2мл 0,2%-ного тритона X-100 и 3,7 мл дист. воды (1:40).

3. Гомогенат животной ткани. Ткань печени или скелетной (сердечной) мускулатуры освободить от соединительных пленок и сосудов, промыть от крови холодным 0,154М раствором хлористого натрия. Просушить на фильтровальной бумаге. Взвесить 0,5g, растереть в ступке с пестиком, охлажденными в ледяной бане. Затем поместить в гомогенизатор с тефлоновым пестиком, залить 5мл 0,1М

фосфатного буфера, pH 7,4. Гомогенизировать 3 минуты. Отфильтровать через крупнопористый фильтр.

Ход определения для сыворотки крови, гемолизата эритроцитов, тканей печени и скелетной мускулатуры. В пробирку разлить по 2,7мл фосфатного буфера (реактив 1), 0,1мл раствора НАДН (реактив 3), 0,1мл сыворотки (10мкг гемолизата эритроцитов или гомогената). В десять раз меньшее количество гомогената или гемолизата определяется тем, что в клетках активность (ν концентрация) фермента намного выше, чем в сыворотке. Затем определение активности фермента осуществляется в кюветах спектрофотометра (СФ), длина волны 340нм, кювета толщиной 10мм, фоновый раствор – фосфатный буфер. Содержимое пробирки перелить в кювету, добавить 0,1мл пирувата, быстро перемешать пластиковой палочкой, измерить ОП – E_1 . Через 3 минуты замерить ОП – E_2 . Малое время работы фермента позволяет оценить скорость в данном случае обратной реакции – восстановления пирувата в лактат. Если ОП измерить позже результаты будут занижены из-за возможности осуществления обратной реакции.

Расчет:

$$\text{мМ НАДН/мин на г белка или Нв в л} = (E_1 - E_2) \times \text{разведение} \times 3,0 (2,91) / 6,22 \times 0,1 (0,01) \times 3;$$

Разведение – для сыворотки – нет, для гемолизата эритроцитов – 40; для гомогената тканей – 5;

6,22 – миллимолярный коэффициент экстинкции НАДН;

3,0 (2,91) – объем пробы в мл сыворотки или гемолизата/гомогената;

0,1 (0,01) – объем исследуемой жидкости, мл сыворотки или гемолизата/гомогената;

3 – время, мин.

Ход определения для кардиомиоцитов. Реактивы: 1. Гидразин-глициновый буфер, содержащий на 500мл 26 г гидразинсульфата и 23,5г глицина, 81мг ЭДТА 94мг хлористого магния, pH 9,6; pH довести 2М раствором КОН; 2. НАД^+ , 27мМ раствор; 3. Лактат натрия, 1мМ раствор.

В пробирку разлить по 2,7 мл буфера, 0,1мл раствора НАД^+ , 10мкл гомогената. Содержимое пробирки перелить в кювету спектрофотометра (10мм), настроенного на длину волны 340нм, фоновый раствор – буфер. В кювету добавить 0,1мл лактата натрия перемешать и быстро измерить ОП (E_1). Через 3 минуты снова измерить ОП (E_2).

Для расчета использовать ту же формулу как и для гемолизата. Для определения удельной активности фермента определить содержание общего белка в гомогенате по методу Лоури или микробиуретовым методом, результат внести в знаменатель.

Изучение условий обратимости лактатдегидрогеназной реакции

Для протекания прямой реакции – окисления лактата в пируват – необходимо поддержание высокого значения pH, так как функционально важный аминокислотный остаток His-195 должен быть депротонирован. При значении pH более близком к нейтральному равновесие сдвигается в сторону обратной реакции – восстановления пирувата в лактат.

Реактивы: 1. Серия буферных растворов: натрий-фосфатный буфер 0,1М; pH 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8; 8,0. 2. Раствор лактата натрия, 1мМ. 3. Раствор пирувата натрия, 1мМ. 4. Раствор НАДН, 6мМ. 5. Раствор НАД^+ , 6мМ. 6. Раствор фермента ЛДГ: 0,05мл фирменного препарата фермента развести в 100 раз 0,01М фосфатным буфером, pH 7,2 (1мл раствора содержит 0,2мкг белка).

*Реактивы 2-6 готовят перед употреблением.

Ход определения. 1. Окисление лактата в пируват

Разлить по пробиркам по 3мл буферных растворов различных pH в двух-трех повторностях, добавить по 0,1мл раствора НАД⁺ и 0,1мл ферментного раствора. Перемешать и поместить в кюветы спектрофотометра, промерить начальную ОП (длина волны 340нм, кювета 1см)(E₁). Реакцию стартовать добавлением 0,1мл лактата натрия. Каждая проба делается отдельно, через три минуты измеряется конечная ОП (E₂).

Расчет.

$$X \text{ мМ/мин} = (E_2 - E_1) / 6,22 \times 3$$

2. Восстановление пирувата в лактат

Разлить по пробиркам по 3мл буферных растворов различных pH в двух-трех повторностях, добавить по 0,1мл раствора НАДН и 0,1мл ферментного раствора. Перемешать и поместив в кюветы спектрофотометра, промерив начальную ОП (длина волны 340нм, кювета 1 см)(E₁). Реакция стартуется добавлением 0,1мл пирувата натрия. Каждая проба делается отдельно, через три минуты измеряется конечная ОП (E₂).

Расчет.

$$X \text{ мМ/мин} = (E_1 - E_2) / 6,22 \times 3$$

Рассчитайте активность фермента для каждого значения pH в 1 и 2 случаях. Сделайте вывод об условиях обратимости ЛДГ-реакции в зависимости от pH.

Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (КФ 1.1.1.43) первый и лимитирующий скорость пути фермент пентозофосфатного окисления глюкозы. Катализирует реакцию окисления и дегидроксилирования глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконат. НАДФ-зависимый фермент, локализован в мембранах клеток. При нарушении целостности мембран легко диссоциирует на субъединицы и теряет активность. Активатором служат ионы Mg²⁺, ингибиторами – Zn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺. Присутствует во всех клетках, осуществляющих пентозофосфатное окисление глюкозы, однако при выходе из клеток и нарушении целостности мембран быстро инактивируется.

Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах.

Реактивы: 1. Триэтаноламиновый буфер, 50мМ с 5мМ ЭДТА, pH 7,6; 2. НАДФ⁺, 10мМ раствор в буфере; 3. Глюкозо-6-фосфат натрияевая соль, 31мМ раствор в буфере; 4. Дигитонин, 0,02%-ный раствор; 5. 0,154М хлористый натрий, pH 7,2 или раствор в PBS; 0,020М Na₂PO₄ в 0,1М NaCl, pH 7,2.

Ход определения. 0,2мл крови трижды отмыть холодным 0,154М хлористым натрием или PBS. Режим центрифугирования – 650g, 10 минут. Надосадочную жидкость отсосать и в полученную суспензию эритроцитов добавить 0,5мл раствора дигитонина для экстракции фермента, оставить на 15 минут при 4⁰С, отцентрифугировать в том же режиме. 0,1мл полученного супернатанта развести в 10 раз 0,154М раствором хлористого натрия или PBS. Полученный ферментный препарат нельзя хранить, необходимо как можно быстрее определить активность фермента.

В пробирки разлить по 3мл триэтаноламинового буфера, добавить 0,1мл раствора НАДФ⁺, 0,1мл препарата фермента, проинкубировать 5 минут при комнатной температуре (можно уже перелить в кювету СФ). Длина волны 340нм, толщина кюветы 10мм. В пробы, помещенные в кюветы СФ, добавить по 0,1мл раствора глюкозо-6-фосфата, перемешать пластиковой палочкой и быстро измерить ОП – E₁. Пробы перелить в пробирки и поместить в водяной термостат 37⁰С на 10 минут. Через 10 минут измерить ОП – E₂. Оптическая плотность должна возрастать, так как ОП НАДФН выше, чем НАДФ⁺

Для расчета удельной активности фермента необходимо определить количество гемоглобина в ферментном препарате.

Расчет: $X \text{ мМ НАДФ} / \text{мин на г/л} = (E_2 - E_1) \times 3,3 / 6,22 \times 10 \times \text{Hb, г/л}$

Определение активности глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. НАД-зависимая дегидрогеназа, катализирует реакцию обратимого окисления 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА) в процессе гликолитического окисления глюкозы в присутствии остатка фосфорной кислоты. Кроме окисления 3-ФГА фермент осуществляет фосфорилирование 3-фосфоглицерата в 1,3-дифосфоглицерат. Локализован в мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР) или плазматической мембране (при отсутствии ЭПР). Обычно служит местом прикрепления всех ферментов гликолитического метаболизма. Активность фермента можно определить в гемолизате эритроцитов и гомогенатах тканей, где протекает активный гликолиз (печень, мышцы).

Реактивы: 1. 0,1М глициновый или 40мМ триэтаноламиновый буфер, pH 8,3 (доведение pH на pH-метре 0,1М NaOH); 2. Na_2HPO_4 , 0,5М раствор; 3. 3-фосфоглицериновый альдегид, 10мМ раствор; 4. НАД^+ , 10мМ раствор; 5. ЭДТА, 50мМ раствор; 6. 0,2%-ный раствор тритона X-100.

Подготовка гемолизата. Осуществить отмывание эритроцитов так, как описано в методе определения активности ЛДГ. Можно использовать и цельную кровь, взятую с антикоагулянтом (3,8%-ным цитратом натрия). Отобрать 0,1мл суспензии эритроцитов (или цельной крови), добавить 0,2мл 0,2%-ного тритона X-100 и 0,7мл холодной дист. воды. Определить содержание гемоглобина для расчета удельной активности фермента, используя циангемоглобиновый метод Драмбина.

Ход определения. В пробирки разлить по 2,0мл буфера, 0,3мл НАД^+ (конечная концентрация 1мМ), 0,3мл ЭДТА (конечная концентрация 5мМ), 0,05мл гемолизата. Измерить начальную оптическую плотность, длина волны 340нм, кювета толщиной 10мм (E_1). Стартовать реакцию добавлением 0,05мл 3-фосфоглицеринового альдегида (конечная концентрация – около 0,02мМ). Провести инкубацию при 37°C в течение 5 минут. Измерить ОП в тех же условиях (E_2).

Расчет:

$$X \text{ мМ} / \text{мг Hb в л гемолизата} = \frac{(E_2 - E_1) \times 2,95 \times 1000}{6,22 \times 0,05 \times \text{г Hb} / \text{л гем.}}$$

Задание. Определите скорость и соотношение процессов окисления глюкозы в гликолизе и пентозофосфатном пути (ПФП) в эритроцитах свежей крови и крови, хранящейся в холодильнике в течение 1-2 суток.

Для этого выделите фракцию чистых эритроцитов из свежей и храненной крови, приготовьте гемолизаты. В приготовленных гемолизатах определите активность ферментов гликолиза: глицеральдегиддегидрогеназы и лактатдегидрогеназы и фермента ПФП – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Сравните активности ферментов в свежей и храненной крови.

Определение активности НАДФ-глутатион-редуктазы (В.В. Колина и соавт., 1976). Фермент катализирует обратимую реакцию окисления-восстановления глутатиона. Коферментом может служить НАД^+ или НАДФ^+ . Большое значение восстановленный глутатион имеет как донор восстановленных эквивалентов для сульфгидрильных групп белков. Значительное количество фермента содержится в клетках ткани печени, в эритроцитах, где восстановленный глутатион участвует в системе восстановления метгемоглобина.

Подготовка материала для исследований. Гомогенат ткани готовится как описано выше. Гемолизат эритроцитов готовится как для определения активности фермента. Полученный основной гемолизат перед определением разводится дист.водой 1:20. Гемоглобин целесообразно определить из основного гемолизата, а в формуле учесть разведение в 20 раз.

Реактивы: 1. ТРИС-НСl буфер, 0,1М, рН 8,0, содержащий 0,08М ЭДТА; 2. Окисленный глутатион, 7,5мМ (5мг в 1мл); 3. НАДФН, 2мМ (2мг в 1мл).

Ход определения. В пробирки разлить по 3мл буфера, 0,15мл гемолизата, 0,2мл НАДФН. В контрольную пробу вместо гемолизата добавить воды (в некоторых случаях контролем можно пренебречь, так как окисление НАФН в отсутствии фермента происходит очень медленно). Прогреть пробы 8-10 минут при 37°C. Добавить во все пробирки по 0,2мл окисленного глутатиона. Измерить ОП (E_1) при 340nm против буфера, кювета 10мм. Затем пробы снова поместить в водяной термостат на 10 минут при той же температуре для протекания ферментативной реакции. После измерения конечную ОП (E_2).

Для расчета удельной активности и стандартизации в основном гемолизате определяется содержание гемоглобина.

Расчет:

$$X \text{ мМ/мин на г Hb в л гемолизата} = (E_1 - E_2) \times 20 \times 3,55 / 6,22 \times 10 \times 0,15 \times \text{Hb},$$

г/л;

20 – разведение основного гемолизата;

3,55 – объем пробы, мл;

6,22 – миллимолярный коэффициент экстинкции, $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$;

10 – время инкубации, мин;

0,15 – объем гемолизата.

Определение активности НАДН-феррицианидредуктазы (НАДН-метгемоглобинредуктазы) (P.G. Board, 1981). Фермент катализирует одноэлектронное восстановление различных субстратов: феррицианида, гидроперекисей жирных кислот, метгемоглобина. В большом количестве присутствует в эритроцитах, обычно ассоциирован на гемоглобине, однако избыток гемоглобина ингибирует активность фермента. Часть фермента находится в мембраносвязанной форме.

Подготовка гемолизата для исследований. Отмыть и упаковать эритроциты в равном 600g, 10 минут холодным 0,154М NaCl, в 0,1мл упакованных эритроцитов добавить 0,2мл 0,2 %-ного тритона X-100 и 0,7мл дист.воды – основной гемолизат. Основной гемолизат перед определением разводят в 4 раза.

Реактивы: 1. 10мМ ТРИС-НСl с 5мМ ЭДТА, рН 8; 2. 0,2мМ раствор феррицианида калия; 3. 0,2мМ раствора НАДН.

Ход определения. В пробирки поместить по 3,0мл буфера, добавить по 0,1мл НАДН, 20мл гемолизата, 0,2мл феррицианида калия и быстро измерить ОП при 340nm, кювета 10мм (E_1). Пробы поместить в водяной термостат на 10 минут (37°C). Измерить ОП (E_2).

Для стандартизации необходимо определить содержание гемоглобина в основном гемолизате.

Расчет:

$$X \text{ мМ/мин на г Hb в л гемолизата} = (E_1 - E_2) \times 4 \times 3,32 / 6,22 \times 10 \times 0,02 \times \text{Hb},$$

г/л;

4 – разведение основного гемолизата;

3,32 – объем пробы, мл;

6,22 – миллимолярный коэффициент экстинкции, $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$;

10 – время инкубации, мин;

0,02 – объем гемолизата, мл.

Определение активности НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ и малатдегидрогеназ. Изоцитратдегидрогеназы – ферменты, катализирующие реакцию окислительного декарбоксилирования изоцитрата в 2-оксоглутарат. Считается, что НАД-зависимая форма фермента участвует в цикле трикарбонновых кислот (ЦТК), НАДФ-зависимая – в биосинтетических процессах. Изоферменты высоко специфичны по отношению к своим коферментам.

Прямая реакция окислительного декарбоксилирования изоцитрата в 2-оксоглутарат характеризуется высоким температурным оптимумом (42-75⁰С) и широким оптимумом рН 6,7-7,6. Обратная реакция становится более вероятной при 18⁰С и значении рН 6,0-6,7. НАД-зависимая форма локализована в митохондриях, НАДФ-зависимая в животных тканях имеет и митохондриальный и цитоплазматический изофермент; в растительных тканях – митохондриальный, хлоропластный и цитоплазматический.

Для НАД-зависимой формы нехарактерно подчинение кинетике Михаэлиса-Ментен из-за наличия кооперативных эффектов при связывании изоцитрата и коферментов. Активация осуществляется ионами магния, марганца, АМФ и АДФ. Ингибирование – двухвалентными ионами кальция, цинка, ртути, кадмия и меди. Аллостерически ингибируется АТФ. Конкурентные ингибиторы: сукцинат, цитрат.

Изоцитратдегидрогеназная реакция является лимитирующей скоростью первой половины ЦТК, активность фермента модифицируется специфической протеинкиназой, причем фосфорилирование по остаткам серина превращает его в неактивную форму.

Малатдегидрогеназы – НАД- и НАДФ-зависимые формы, ферменты катализирующие обратимую реакцию окисления малата в оксалоацетат. Различают митохондриальные и цитозольные изоферменты. Реакция окисления малата в оксалоацетат завершает цикл ЦТК, регенирируя оксалоацетат, вступивший в первую цитратсинтазную реакцию с ацетил-КоА. Малат обладает свойством проникать через митохондриальные мембраны и поэтому служит одним из основных переносчиков электронов между цитоплазмой и матриксом митохондрий (малатно-оксалоацетатное шунтирование).

НАД-зависимая малатдегидрогеназа широко распространенный фермент, имеет множество изоформ – хлоропластные, митохондриальные, пероксисомальные и цитоплазматические изоферменты.

НАДФ-зависимая малатдегидрогеназа чаще встречается в хлоропластах, обладает высоким сродством к оксалоацетату и относительно низким – к малату. Особенностью регуляции активности данного изофермента является светоактивация, связанная с восстановлением SH-групп и последующего активирующего протеолиза.

Для определения активности изоцитратдегидрогеназ и малатдегидрогеназ необходимо приготовление гомогенатов тканей, метод описан выше (активность цитоплазматического изофермента), митохондрий и хлоропластов.

Выделение митохондрий из скелетной и сердечной мышцы. Для выделения митохондрий из скелетных мышц используется среда выделения следующего состава:

0,1М KCl, 0,05M TRIS-HCl (pH 7,4), 0,001M MgCl₂.

Мышцы (около 2-4г) поместить в стакан с хорошо охлажденной средой выделения (15-20мл). Через 5 минут их вынуть и освободить от сопутствующих тканей, поместить в новый стакан также с охлажденной средой выделения (15-20мл). После промывания кусочки ткани высушить на фильтровальной бумаге и тщательно измельчить ножницами в чашке Петри, находящейся на льду. Измельченную ткань перенести в заранее взвешенный стакан и взвесить. Затем в стакан добавить среду выделения так, чтобы общий объем был в четыре раза больше объема ткани. Смесь количественно перенести в гомогенизатор и гомогенизировать 1 минуту при высоких

Полученный гомогенат перелить в центрифужные пробирки (или стаканы) и центрифугировать при $t = 0^{\circ}\text{C}$ 7 минут, 600g. Осадок, содержащий обломки клеток, промыть в 0,9% растворе физиологического раствора, отбросить. Надосадочную фракцию центрифугировать 2 минуты при 600g. Для более полного удаления миофибрилл. Полученный супернатант центрифугировать 10 минут при 9000g (все центрифугирования проводят в том же режиме). Осадок митохондрий развести в среде выделения в расчете 0,5 мл среды на каждые 2г ткани.

Для выделения митохондрий из кардиомиоцитов готовится другая среда выделения:

0,3M сахара, содержащая 0,02M ЭДТА, 0,9%-ный раствор хлористого калия для отмывания ткани. Свежевыделенное сердце быстро перенести в стакан с ледяным раствором 0,9%-ного KCl, хорошо перемешать и промывочный раствор слить. Процедуру отмывки повторить еще дважды. Отмытое от крови сердце поместить на толстый слой фильтровальной бумаги, обсушить и ножницами удалить соединительную ткань, сосуды и жир. Желудочек сердца вскрыть и оттуда удалить остатки крови. Ткань еще раз ополоснуть ледяным раствором хлористого калия, обсушить фильтровальной бумагой, поместить на чашку Петри, поставленную на ледяной наколотый лед.

Мякцу взвесить и измельчить ножницами до кашицеобразной массы, перенести в гомогенизатор. Добавить среду выделения из расчета 10 мл на 1г сырой ткани. Ткань гомогенизируют не более 1 минуты.

Гомогенат перенести в центрифужный стакан и центрифугировать в режиме 600g, 7 минут, 0°C . После центрифугирования с поверхности ватным тампоном удалить жир и супернатант перенести в другой стакан. Процедуру проводят осторожно, чтобы рыхлый осадок остался в первом стакане. Супернатант центрифугируют 15 минут при 11 000g. Надосадочную жидкость удалить, а осадок митохондрий осторожно перемешивают со средой выделения в объеме 2мл. К супернатанту добавляют до 40мл среды выделения и снова отцентрифугировать в том же режиме. Супернатант удалить, к осадку добавить 2мл среды, слегка встряхнуть и жидкость удалить. Плотный осадок митохондрий развести в 0,5мл среды выделения.

Для выделения митохондрий из ткани печени приготовить следующую среду выделения:

0,25M сахара, содержащая 0,001M ЭДТА, pH 7,4. Для промывки используется 0,25M раствор сахара без ЭДТА, pH 7,4.

Изолированную печень погрузить в 30мл ледяной среды для промывки и тщательно промыть. Процедуру повторить трижды. Затем ткань поместить в чашку Петри, находящуюся на льду и быстро измельчить ножницами. Измельченную ткань вновь промыть в стакане со свежей средой для отмывки. После оседания кусочков ткани, жидкость слить. При необходимости (наличие розовой окраски среды) промывание повторить.

Промытую ткань печени осушить на фильтровальной бумаге и взвесить, затем перенести в стакан гомогенизатора, добавить среду для выделения в расчете 10мл среды на 1г ткани. Гомогенизировать в течение 30-40 секунд. Полученный гомогенат центрифугировать в режиме 600g, 10 минут, 0°C . Осадок содержит обломки клеток и ядра. Супернатант слить в отдельный стакан и держать в ледяной бане. В осадок добавить половинное количество среды выделения и снова центрифугировать в том же режиме. Оба супернатанта объединить. Осадок отбросить. Супернатант для осаждения митохондрий центрифугировать при 1400g в течение 10 минут, 0°C . Надосадочную жидкость удалить, а осадок ресуспендировать в среде выделения в отношении 1:10 и снова центрифугировать в режиме 7000-8000g, 10 минут.

Полученный осадок митохондрий развести в 0,5мл среды выделения и до определения активности ферментов хранить на холоду.

Выделение хлоропластов и митохондрий из растительных тканей. Для выделения хлоропластов приготовить среду выделения следующего состава:

0,35М хлористый натрий, содержащий 0,02М ТРИС-НСl, и аскорбат натрия в количестве 2мг на мл, рН 7,8. Среда для разведения хлоропластов: 0,35М хлористый натрий содержащий, 0,015М ТРИС-НСl, 0,002М хлористый магний и 0,1%-ный ТВИН-80, рН 7,8.

Навеску растительной ткани тщательно растереть со средой выделения в отношении 1:5. Отфильтровать через 8 слоев марли. Фильтрат отцентрифугировать при 200g в течение 3 минут для удаления осколков клеток. Супернатант центрифугировать при 1000g, 15 минут, 0°C. Полученные хлоропласты ресуспендировать в среде для разведения хлоропластов в отношении 1:3.

Среда для выделения митохондрий: 0,4М сахараоза содержащая, 0,1%-ный сывороточный альбумин, 0,01М хлористый калий, 0,001М ЭДТА и 0,1М ТРИС-НСl, рН 7,5. Среда для разведения митохондрий: 0,1М ТРИС-НСl, рН 7,5, содержащий 0,1%-ный ТВИН-80.

Навеску растительной ткани (15г) растереть с 60мл среды выделения. Полученный гомогенат центрифугировать в режиме 3000g, 5 минут. Осадок, содержащий хлоропласты, отбросить. Супернатант центрифугировать при 15000g в течение 20 минут. Осадок митохондрий можно промыть, добавив среду выделения и центрифугируя в том же режиме. Полученный осадок ресуспендировать в небольшом количестве среды для разведения митохондрий.

Внимание! Полученные суспензии митохондрий и хлоропластов необходимо использовать в течение 2 часов от времени выделения или быстро заморозить. В суспензиях (до заморозки) целесообразно определить содержание белка для расчета удельной активности ферментов. Перед определением активностей ферментов митохондрий и хлоропластов необходимо быстро заморозить суспензии с помощью сухого льда, а затем оттаять для разрушения мембран и создания доступа для субстратов и коферментов.

Определение активности НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы митохондрий (Т.Н. Попова, 1993). Реактивы: 1. 0,1М ТРИС-НСl, рН 7,6; 2. Изоцитрат натрия, 2мМ раствор в буфере; 3. НАД, 0,5мМ раствор в буфере; 4. Хлористый марганец, 2,0мМ.

Ход определения. В пробирки разлить по 2,5мл буфера, 0,2мл хлористого марганца (активатор), 0,1мл суспензии митохондрий, 0,2мл раствора НАД и измерить начальную ОП (E_1) при 340нм, кювета толщиной 10мм. Реакцию запустить добавлением 0,1мл раствора изоцитрата. Пробы поместить в водяной термостат при 37°C на 10 минут. Через 10 минут измерить конечную ОП (E_2).

Расчет:

$$X \text{ мМ/мин на мг белка в мл суспензии митохондрий} = (E_2 - E_1) \times 3,1 / 0,1 \times 10 \times 6,22 \times \text{белок, мг/мл};$$

3,1 – объем пробы, мл; 0,1 – объем суспензии митохондрий, мл; 10 – время инкубации, мин; 6,22 $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ – миллимолярный коэффициент экстинкции НАД⁺.

Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы из растительных тканей. Реактивы: 1. 0,1М ТРИС-НСl, рН 8,0; 2. Изоцитрат, 1,5мМ в буфере; 3. НАДФ, 0,5мМ в буфере; 4. MnCl_2 , 2,0мМ.

Ход определения: 2,5мл буфера, 0,2мл хлористого марганца, 0,2мл НАДФ, 0,1мл суспензии хлоропластов. Перемешать, измерить E_1 (340нм, 10мм). Реакцию стартовать добавлением 0,1мл раствора изоцитрата. Пробы инкубировать при 25°C 10 минут. Измерить E_2 .

Расчет проводится по выше приведенной формуле.

Определение активности НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы. Прямая реакция: 1. Глицин-глициновый буфер, pH 7,4; 2. НАДФ, 2мМ; 3. Малат натрия, 5мМ раствор.

Обратная реакция: 1. Глицин-глициновый буфер, pH 7,4; 2. НАДФН, 2мМ; 3. Оксالات натрия, 2мМ раствор.

Активность можно определять в суспензии митохондрий, цитозоле и хлоропластах.

Ход определения: В пробирки поместить 2,6мл буфера, 0,1мл суспензии митохондрий (или митохондрий хлоропластов, цитозольной фракции), 0,1мл НАДФ⁺ (для прямой реакции) или 0,1мл НАДФН (для обратной реакции). Измерить начальную ОП (E_1), длина волны 340нм, толщина кюветы 10мм. Реакцию запустить добавлением 0,1мл малата натрия (прямая реакция) или оксалата натрия (обратная реакция). Пробы помещают на 10 минут в водяной термостат при 37°C для животных тканей и 25°C для растений. Замерить E_2 .

Расчет:

$$X \text{ мМ/мин на мг/мл белка} = (E_2 - E_1) \times 2,9 / 6,22 \times 0,1 \times 10 \times \text{белок, мг/мл};$$

для обратной реакции – ($E_1 - E_2$).

Задания. 1. Используйте для исследований митохондриальную и цитозольную фракции. Определите в них активность малатдегидрогеназы в сторону образования оксалоацетата и в сторону образования малата. Сравните и объясните полученные результаты.

2. Определите скорость образования малата и/или оксалоацетата в условиях избытка АТФ (в суспензию митохондрий или цитозоль добавьте АТФ в конечной концентрации 4мМ) или АДФ (добавьте АДФ в той же концентрации). Зависит ли смещение равновесия от избытка АТФ или АДФ и почему?

Определение сукцинатдегидрогеназной активности митохондрий

Сукцинатдегидрогеназа – фермент прочно локализованный на внутренней мембране митохондрий. Белок содержит в своем составе флавинадениннуклеотид (ФАД), ковалентно связанный с полипептидом, 8 г-атомов негемового железа и 8 г-моль сульфида, освобождающегося при подкислении среды. Сукцинатдегидрогеназа катализирует реакцию окисления сукцината в фумарат, при этом могут быть использованы искусственные акцепторы электронов: феррицианид, феназинметасульфат, тетраметил-п-фенилендиамин. Связанный с мембраной фермент стабилен, растворимая форма нестабильна в присутствии кислорода.

Реактивы: 1. 0,1М фосфатный буфер, содержащий альбумин в количестве 1мг/мл; 2. 2мМ раствор феррицианида калия; 3. 10мМ раствор сукцината натрия или янтарной кислоты в фосфатном буфере; 4. 0,1М раствор ЭДТА; 5. Суспензия митохондрий, подвергнутая замораживанию-оттаиванию.

Примечание. Для определения сукцинатдегидрогеназной активности митохондрий, выделенных из растительных тканей, использовать 30мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,8 (без альбумина).

Ход определения. В кювету (10мм) спектрофотометра поместить 2,0мл буфера, 0,5мл феррицианида калия, 0,2мл раствора сукцината, 0,1мл ЭДТА. Реакцию запустить добавлением 0,1мл суспензии митохондрий. Длина волны 420нм (область поглощения феррицианида). ОП регистрируют сразу после добавления, каждые 30 секунд в течение 2 минут. ОП должна падать, так как феррицианид восстанавливается в ферроцианид, не имеющий желтой окраски (не поглощающий в области 420нм).

Задания. 1. Вычертите кривые сукцинат:феррицианидредуктазной активности в относительных единицах (разность ОП/мг белка в мл) в течение 2-х минут для митохондрий, выделенных из различных тканей. Рассчитайте также среднюю скорость сукцинатдегидрогеназной реакции и сравните их в митохондриях клеток из различных тканей.

2. Ресуспандируйте полученный осадок митохондрий в фосфатно-боратном буфере, pH 7,4, который готовят смешиванием равных частей 0,15М борной кислоты и 0,15М натрия фосфорнокислого 2-х замещенного, до достижения содержания белка 10мг/мл и поместите на лед. Проведите измерение сукцинатдегидрогеназной активности митохондрий по выше описанной методике, используя различные концентрации сукцината: 0,3; 0,6; 1,25; 2,5 и 5,0мМ. Затем проведите измерения сукцинатдегидрогеназной активности с теми же концентрациями сукцината в присутствии 200мкМ малоната.

3. Постройте графики зависимости скорости окисления сукцината от его концентрации в присутствии малоната и без него. Определите тип ингибирования.

Определение активности оксигеназ

Определение активности каталазы ($H_2O_2:H_2O_2$ -оксидоредуктаза) (М.А. Королук, Л.И. Иванова, 1988). Каталаза – один из наиболее распространенных ферментов, встречающийся во всех клетках и организмах, способных синтезировать гемовые структуры. Осуществляет катализ окисления-восстановления перекиси водорода, при этом образуется вода и молекулярный кислород. В активном центре фермента присутствует гем с железом переменной валентности в центре. Фермент представляет собой обычно тетрамер с М.М. 250кДа. Каталаза отличается гетерогенностью, в клетках имеются множество изоферментных форм, отличающихся по кинетическим характеристикам и локализации. Основное количество фермента локализовано в пероксисомах, однако могут присутствовать формы адсорбированные на различных функциональных белках: гемоглобине, цитохромоксидазе, т.е. в тех местах, где происходит активная генерация перекиси водорода в супероксиддисмутазной и монооксидазных реакциях.

Активность каталазы высока в эритроцитах, а также во всех клетках, осуществляющих процессы дыхания. Не содержат каталазы, так как не имеют ферментов синтеза гемовых структур, только некоторые бактерии-анаэробы. Объектами определения каталазной активности могут служить гемолизат эритроцитов, гомогенаты животных и растительных тканей, а также аэробных и других каталазоположительных бактерий.

Для определения активности каталазы эритроцитов готовят гемолизат 1:40 или еще с большим разведением, гомогенаты – с разведением 1:10.

Принцип метода. Основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный в желтый цвет комплекс. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически.

Реактивы: 1. 4%-ный раствор молибдата аммония; 2. 0,03%-ный раствор перекиси водорода.

Ход определения. В пробирки разлить по 2мл 0,03-ной перекиси водорода и добавить по 0,1мл исследуемой жидкости (гомогената, гемолизата) в опытные

пробы. В одну из проб сразу добавить 1мл молибдата аммония (холостая проба). В опытные и контрольную пробу молибдат аммония добавить через 10 минут инкубации при комнатной температуре. Все пробы проколориметрировать при длине волны 410nm против контроля на реактивы: 2мл дист.воды, 0,1мл исследуемой жидкости, 1мл молибдата аммония.

Активность рассчитать по формуле:

$$X \text{ мкат / мг белка или мг Hb} = (E_{\text{хол.пр.}} - E_{\text{опыт.пр.}}) \times 22,2 \times 600 \times 0,1 / \text{белок} \\ (\text{Hb})(\text{мг/мл}), \text{ где}$$

3,1 – объем пробы, мл;

22,2 – миллимолярный коэффициент экстинкции, $\text{мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$;

600 – время, сек;

0,1 – количество исследуемой жидкости, мл.

Определение активности глутатионпероксидазы в эритроцитах (А.Р. Гаврилов, Н.Ф. Хмара, 1986). Фермент глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9) содержится во многих тканях и является компонентом системы защиты клеток от перекисей, в том числе гидроперекисей липидов.

Принцип метода. Метод основан на определении восстановленного глутатиона по цветной реакции с нитропруссидом натрия.

Подготовка гемолизата. Эритроциты отмывают 154мМ хлористым натрием, приготовленном на 5мМ фосфатном буфере, pH 7,2 или раствором PBS (0,02M Na_2HPO_4 в 0,1M NaCl, pH 7,2). Гемолизат готовят из 0,1мл суспензии эритроцитов с добавлением 0,9мл дист.воды. Основной гемолизат развести 50мМ фосфатным буфером, pH 7,4 в 20 раз.

Реактивы: 1. Натрий-фосфатный буфер, 50мМ, pH 7,4; 2. Восстановленный глутатион, 70мМ раствор в буфере; 3. ЭДТА, 5мМ раствор; 4. Гидроперекись трет-бутила, 20мМ; 5. 5 %-ный раствор ТХУ кислоты; 6. Насыщенный раствор NaCl; 7. 8 мМ нитропруссид натрия; 8. 1,8M Na_2CO_3 .

Ход определения. В пробирки внести по 0,1мл буфера, растворов ЭДТА, восстановленного глутатиона и гемолизата. В контрольную пробу вместо гемолизата добавить 0,1мл дист. воды. Прогреть при 37°C в течение 2 минут (водяной термостат). Реакцию запустить добавлением 0,1мл гидроперекиси трет-бутила. Инкубировать 10 минут при 37°C. Реакцию остановить добавив в каждую пробу по 1мл ТХУ кислоты.

Пробы отцентрифугировать в режиме 650g, 15 минут, в чистые пробирки отобрать по 0,2мл надосадочной жидкости и добавить по 3,8мл насыщенного раствора хлористого натрия. Поставить также стандартную и фоновую пробы: стандартная – 0,2мл раствора восстановленного глутатиона + 3,8мл хлористого натрия; фоновая – 0,2мл дист.воды + 3,8мл хлористого натрия. К каждой пробе добавить по 0,5мл нитропруссид натрия. Затем по 0,5мл Na_2CO_3 .

Внимание! Добавление карбоната натрия проводить постепенно, по одной пробе и сразу колориметрировать, так как окраска неустойчива. Длина волны 540nm, толщина кюветы 10мм, против воды или воздуха.

Расчет:

$$X \text{ мМ/мин на мл суспензии эритроцитов} = 14\text{мМ} \times (E_{\text{к}} - E_{\text{о}}) \times 200 / 10 \times (E_{\text{ст}} - E_{\text{ф}}),$$

где

14мМ – концентрация восст.глутатиона в стандартной пробе;

200 – разведение гемолизата;

10 – время инкубации, мин.

Определение активности супероксиддисмутазы (Е.Е. Дубинина и соавт., 1983). Супероксиддисмутаза – фермент антиоксидантной защиты «первого эшелона». Фермент катализирует реакцию дисмутации супероксидного радикала кислорода до 2-х молекул перекиси водорода, которая разрушается каталазой или пероксидазой. Фермент встречается в составе пероксисом в клетках. В эритроцитах адсорбирован на гемоглобине. В плазме крови находится неактивная форма фермента, активация осуществляется с помощью специфической протеазы, отщепляющей от неактивного белка крупный пептид.

Подготовка материала для исследований. Плазма крови: к 2мл плазмы крови добавить 0,6мл этилового спирта и 0,3мл хлороформа и 600мг кристаллического $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Перемешать, таким образом удаляются вещества, мешающие определению активности СОД. Осадок отделить центрифугированием 750g, 20 минут. Надосадочная жидкость, в которой определяется активность фермента, должна быть абсолютно прозрачной. Для расчета активности фермента в плазме определяется количество белка любым методом.

Для определения активности СОД в эритроцитах, отмытые и упакованные клетки предварительно разбавить в 5 раз 5мМ ТРИС-НСl, рН 7,4. Затем в 0,1мл полученного гемолизата добавить 0,25мл этанола и 0,15мл хлороформа. Центрифугировать в том же режиме, что и для плазмы. Супернатант используется для определения активности фермента. Для расчета активности фермента в гемолизате определяется количество гемоглобина циангемоглобиновым методом.

Принцип метода. Об активности СОД судят по способности конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся за счет азобного взаимодействия НАДН с феназинметасульфатом.

Реактивы: 1. Натрий-фосфатный буфер, 0,1М, рН 7,8; 2. ЭДТА, 1мМ раствор; 3. Нитросиний тетразолий, 2мМ раствор; 4. Феназинметасульфат. 8мМ раствор; 5. НАДН, 6мМ раствор*.

*Реактивы 3, 4, 5 готовятся перед употреблением.

Ход определения. Инкубационная смесь: 0,1мл раствора ЭДТА, 1,6мл буфера; 1мл нитросинего тетразолия, 0,2мл феназинметасульфата, супернатант (объект исследования активности фермента), 0,1мл НАДН. После добавления НАДН содержимое пробирок перемешать и поместить в темное место на 15-20 минут. Контрольная проба содержит все компоненты кроме супернатанта, в неё добавляется 1,7мл буфера. Фоновая проба содержит все компоненты кроме НАДН и также 1,7мл буфера.

Через 15-20 минут провести измерение ОП на длине волны 540нм против фоновой пробы. Наибольшая ОП – у контрольной пробы, так как в опытных пробах процесс восстановления нитросинего тетразолия подавляется активностью СОД, утилизирующей супероксидные радикалы в перекись водорода.

Активность выражается в условных единицах: процентах торможения реакции восстановления нитросинего тетразолия за 1 минуту на г гемоглобина в 1л гемолизата (или на белок, г/л в плазме):

$$A, \text{ в } \% \text{ торможения} = (E_k - E_{on}) \times 100 / E_k \text{ (в знаменатель также вносится гемоглобин гемолизата в г/л).}$$

Можно также использовать следующую модификацию определения активности фермента (С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей, 1985).

Реактивы: 1. Фосфатный буфер, 0,15М, рН 7,8 (8,96г Na_2HPO_4 , 0,5г KH_2PO_4 на 1л дист. воды, рН проверить на рН-метре). 2. ТРИС-ЭДТА буфер, рН 8,0 (37,3мг ЭДТА, 24,3мг гидрооксиметиламина метана растворить в 95мл дист. воды, рН установить добавлением нескольких капель концентрированной соляной кислоты на рН-метре и объем довести до 100мл). 3. Реагент 1: 6мг ЭДТА, 50,0мг нитросинего

тетразолия (НТС), 9мг феназинметасульфата (ФМС) растворяют в 100мл фосфатного буфера, pH 7,8 (можно хранить в холодильнике в течение недели) 4. Реагент 2: 8мг НАДН растворяют в 10мл ТРИС-ЭДТА буфера (готовят перед употреблением).

Ход определения. В кювету внести 3,5мл реагента 1, 0,1мл исследуемой жидкости, добавить 0,5мл реагента 2. Перемешать, измерить ОП – E₁, через 10 минут измерить E₂. Об активности судят по проценту блокирования нарастания ОП. Контрольная проба: 3,5мл реагента 1, 0,1мл дист. воды, 0,5мл реагента 2. Измерения провести также как в опытной пробе.

Расчет:

$$A, \text{ в } \% \text{ торможения} = 1 - (E_{2оп} - E_{1оп}) \times 100 / (E_{2к} - E_{1к}).$$

Определение цитохром-С-оксидоредуктазной активности митохондрий. Ферментативный комплекс является частью дыхательной цепи ферментов. Дыхательная цепь представляет собой липопротеидный комплекс, расположенный на внутренней мембране митохондрий и содержащий НАДН:убихинон-Q-редуктазный, сукцинил-КоА:убихинон-Q-редуктазный, цитохром-С-редуктазный и цитохром-С-оксидазные комплексы.

Для определения цитохром-С-оксидазной активности необходимо провести выделение митохондрий из любой ткани (растительной или животной) по описанному выше методикам. Разрушить целостность митохондрий быстрым замораживанием-оттаиванием. Приготовить необходимый субстрат (если нет готового реактива) – цитохром С.

Приготовление цитохрома С. Около 10г сердечной мышцы, очищенной от жира и соединительной ткани, отмытой от крови мелко измельчить ножницами и добавить 10мл 2,5%-го раствора ТХУ кислоты. Встряхивать в течение 2-х часов (рН экстракта около 4). Полученный экстракт центрифугировать при 600g 10 минут. Супернатант слить и к нему добавить в расчете на каждый мл объема по 0,5г сернокислого аммония (предварительно растереть в тонкий порошок). Оставить на ночь в холодильнике, на следующий день профильтровать. Далее фильтрат необходимо держать на холоде. В фильтрат добавить 20%-ную ТХУ кислоту в объеме, составляющем пятую часть фильтрата. Это приводит к осаждению цитохрома С в восстановленном состоянии. Осадок собрать центрифугированием в режиме 600g 15 минут. Надосадочную жидкость отсосать, осадок промыть насыщенным раствором сернокислого аммония и снова центрифугировать в течение 10 минут. Полученный осадок растворить в 2-х мл дист. воды и диализовать в течение 2-х дней против 1%-ного хлористого натрия. Концентрацию восстановленного цитохрома-С определить спектрофотометрически при длине волны 550нм.

Реактивы: 1. 0,16М фосфатный буфер, pH 7,4; 2. Раствор цитохрома-С (8мг в 1мл) или полученный выше описанным методом, если его ОП при 550нм достаточно высокая. Если используется кристаллический цитохром-С, его необходимо восстановить добавлением 20мл 10мМ раствора гипосульфита натрия (при этом ОП при 550нм должна возрасти в два раза).

Ход определения. В 180мкл раствора цитохрома С добавить 40мкл суспензии митохондрий. Измерить ОП при длине волны 550нм (микрокювета), зафиксировать начало реакции по секундомеру. Конечную ОП замерить через 3 минуты. Активность фермента выражают в единицах ОП в минуту на мг белка в мл суспензии митохондрий.

Необходим контроль на самопроизвольное окисление цитохрома С за три минуты, поэтому в 180мкл цитохрома С добавляют 40мкл дист. воды, измеряют начальную ОП и через 3 минуты.

Определение активности церулоплазмينا (орто-дифенилоксидазы, КО 1.16.3.1) в сыворотке крови (модификация метода Н.Равин). Церулоплазмин (ЦП) представляет собой белок плазмы крови – медьсодержащую оксидоредуктазу. Выполняет роль транспортирующего и аккумулирующего медь компонента фракции α-глобулинов, имеет в своем составе углеводные остатки (гликопротеин). Молекулярная масса 132кДа, полипептидная цепь содержит 1046 аминокислотных остатков. Большая часть ЦП синтезируется гепатоцитами печени и эпителиоцитами легких. При остром воспалительном процессе ЦП синтезируется и выделяется в кровь моноцитами. ЦП играет существенную роль в метаболизме меди и железа, транспортирует медь к медь содержащим ферментам, окисляет железо в трехвалентное состояние, обеспечивает транспорт железа трансферрином. Проявляет оксидазную активность в присутствии некоторых искусственных субстратов, например *p*-фенилендиамина. Церулоплазмин – неспецифическая оксидаза, способная окислять различные полиалкоголи, гидрохиноны, катехолы. Впервые был выделен К. Холмбергом и К. Лауреллом в 1947 году. Церулоплазмин обладает про- и антиоксидантной активностью. С наличием меди связана окислительная активность ЦП. Антиоксидантная активность проявляется его способностью инактивировать свободные радикалы кислорода, предотвращая окисление полиеновых жирных кислот. Противовоспалительная активность ЦП обусловлена инактивацией гистаминазы плазмы крови. ЦП усиливает окисление аскорбиновой кислоты, катехоламинов, серотонина и соединений, содержащих сульфгидрильные группы. Оптимум pH – 5,6-6,0, активируется ионами двухвалентного железа, ингибируется цианидами и азидами. Содержание в плазме составляет 3 мг/л.

Принцип метода. Метод основан на ферментативном окислении *p*-фенилендиамина церулоплазмином. Окисленный диамин, соединяясь с диметилпарафенилендиамином, дает окрашенное соединение, интенсивность которого пропорциональна ферментативной активности церулоплазмينا. Реакция останавливается добавлением фтористого натрия. По ОП образующихся окрашенных продуктов судят о активности ЦП.

Реактивы: 1. Ацетатный буфер 0,4М, pH 5,5; готовится смешиванием двух компонентов: а) ацетат натрия, 5,44г в 100мл дист.воды; б) 2,26мл ледяной уксусной кислоты на 100мл дист.воды. Растворы смешивают в отношении 9:1. 2. Водный раствор солянокислого *p*-фенилендиамина: 0,5г соединения растворяют в 100мл дист. воды. Раствор не стойкий, необходимо готовить быстро, в темной посуде (на свету меняет окраску). Готовится перед употреблением. 3. Раствор фтористого натрия, 3%-ный. Растворимость меньше, чем 3г на 100 мл, поэтому осадок отфильтровывают. Готовится в небольшом количестве перед употреблением (не стоек).

Ход определения. В химические пробирки внести 0,1мл сыворотки крови (можно использовать и плазму) без следов гемолиза. В контрольную пробирку сразу добавить 2мл фтористого натрия для ингибирования фермента. Затем во все пробирки внести по 8мл ацетатного буфера и по 1мл *p*-фенилендиамина (субстрата). Пробирки встряхнуть и поместить на 1 час в водяную баню при 37⁰С. После инкубации во все пробирки, кроме контрольной, добавить по 2мл фтористого натрия. Содержимое пробирок перемешать и поместить в холодильник на 30 минут при температуре 4⁰С. Развивается слабая розово-сиреневая окраска. Интенсивность окраски измеряется на ФЭКе, длина волны 530нм, кювета 10мм против контрольной пробы. Если экстинкция превышает 0,7, сыворотку следует развести и определение повторить.

Расчет активности (содержания активного) ЦП: $X \text{ мг/час} = \text{ОП} \times 875$

Чтобы выразить содержание ЦП в мкМ, умножают полученную величину на коэффициент 0,0074, рассчитанный из М.М. 135кДа.

Определение активности сукцинатдегидрогеназы в митохондриях (по А.А. Покровскому, А.И. Арчакову, А.М. Герасимову). Специфический тест, может быть использован для характеристики меры загрязнения митохондриями других клеточных фракций – ядерной, микросомальной.

Для определения сукцинатдегидрогеназной активности необходимо провести выделение митохондрий из любой ткани (растительной или животной) по описанным выше методикам. Разрушить целостность митохондрий быстрым замораживанием-оттаиванием.

Принцип метода. Измерение падения оптической плотности на длине волны 600нм раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, восстанавливающегося при окислении сукцината в сукцинатдегидрогеназной реакции.

Реактивы: 1. 0,15М фосфатный буфер, pH 7,4 2. 0,5М раствор сукцината натрия; 3. 1,5мМ раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (2,6-ДХФИФ); 4. 5мМ раствор цианистого натрия. Реактивы 2-4 разводят в 0,15М фосфатном буфере.

Ход определения. В пробирки помещают 0,6мл фосфатного буфера, 0,4мл раствора цианистого натрия, 0,4мл раствора 2,6-ДХФИФ и 0,4мл суспензии митохондрий. Смесь перемешать и инкубировать при комнатной температуре в течение трех минут, затем измерить ОП, длина волны 600нм, толщина кюветы 0,3см, внести 0,4мл сукцината натрия, замерить ОП каждые 60 сек в течение 3 минут.

Принцип расчета: Активность фермента определяется как тангенс угла наклона кривой, построенной по изменению ОП во времени.

Определение метгемоглобинредуктазной активности эритроцитов (НАДН-цитохром-b₅-редуктаза)(P.G. Board, 1981). Принцип метода. Фермент катализирует процесс окисления НАДН с одновременным восстановлением феррицианида калия. Для регистрации убыли НАДН используется тест О. Варбурга. О метгемоглобинредуктазной активности судят по скорости восстановления эритроцитарными гемолизатами феррицианида калия в присутствии НАДН.

Пробоподготовка. Эритроциты выделяются из цельной крови (забранной в пробирку с антикоагулянтом) с помощью трехкратной отмывки забуференным физиологическим раствором (PBS). Режим отмывки: 600g, 10 минут. Гемолизат из отмытых эритроцитов готовится добавлением в 0,1мл суспензии эритроцитов 0,2мл 0,2%-ного раствора тритона X-100 и 0,7мл дист. воды. Основной гемолизат развести дист. водой в 3 раза.

Реактивы: 1. 10мМ ТРИС-НСI-буфер, содержащий 5мМ ЭДТА, pH 8,0; 2. 0,2мМ раствор феррицианида калия – $K_3Fe(CN)_6$; 3. 0,2мМ раствор НАДН; 4. PBS для отмывки эритроцитов – 0,02М Na_2HPO_4 в 0,1М NaCl, pH 7,2.

Ход определения. В пробирку разлить по 3,5мл буфера, добавить по 20мкл гемолизата (в контрольную пробу гемолизат не добавляется), по 0,1мл раствора НАДН. Замерить начальную ОП – E_{10} , длина волны 340нм, кювета 1см. Добавить по 0,2мл раствора феррицианида калия. Инкубировать 10 минут при 37°C, измерить E_2 . Фоновый раствор – буфер.

Расчет:

$X \text{ мМ/мин на гНб/л} = (E_{10} - E_{20}) - (E_{1k} - E_{2k}) \times 1000 \times 3,8 / 6,22 \times 0,02 \times 10 \times \text{гНб/л}$,
где

1000 – коэффициент перевода в литры;

3,8 – объем кюветы, мл;

6,22 – коэффициент экстинкции, $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$;

0,02 – объем вносимого гемолизата, мл;

10 – время инкубации, мин;

гНб/л – содержание гемоглобина в гемолизате, г/л.

Определение активности аскорбинатоксидазы. Аскорбинатоксидаза (1.10.3.3) – фермент, катализирующий окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую. В состав этого фермента входит медь (0,24 %).

Активность аскорбинатоксидазы (АО) можно определить по интенсивности поглощения кислорода (в аппарате Варбурга), по измерению путём титрования остатка неокисленной аскорбиновой кислоты в среде и спектрофотометрически.

Ниже приводится описание метода, в котором использовано свойство аскорбиновой кислоты поглощать максимум света при длине волны 265 нм. Об активности фермента судят по уменьшению величины оптической плотности, учитывая, что степень окисления аскорбиновой кислоты пропорциональна количеству фермента.

Реактивы: фосфатный буфер, рН 7,3-7,4; раствор KCl, $5 \cdot 10^{-3}$ М; раствор $MgSO_4$, $5 \cdot 10^{-3}$ М; раствор аскорбиновой кислоты, $5 \cdot 10^{-5}$ М.

Ход работы: навеску листьев $1g \pm 0,001g$ тщательно растирают в фарфоровой ступке и переносят в мерную колбу на 50мл с помощью охлаждённого фосфатного буфера. Экстракт центрифугируют при 4000 об/мин или фильтруют на холоде в течение короткого времени. В опытную кювету вносят 0,1мл раствора $MgSO_4$, 2мл фосфатного буфера, 0,1мл ферментной вытяжки (центрифугата или фильтрата) и 0,7мл раствора аскорбиновой кислоты. Устанавливают нулевой положение на спектрофотометре по кювете, в которую вносят те же компоненты, что и в опыте, только вместо аскорбиновой кислоты приливают 0,7мл H_2O . С началом измерения опытного образца включают секундомер. Первое измерение проводят через 30сек, а затем повторно каждую минуту в течение 5-6мин или другой интервал времени в зависимости от активности фермента.

При длительной экспозиции делают контроль на самоокисление аскорбиновой кислоты. Для этого в кювету спектрофотометра вносят 2,3мл фосфатного буфера и 0,7мл аскорбиновой кислоты, определяют оптическую плотность контрольного раствора в те же промежутки времени, что и основного раствора.

Активность фермента A , выраженную в единицах оптической плотности, вычисляют по формуле:

$$A = \frac{\Delta DVV_2}{\Delta t m V_1} = \frac{(D_1 - D_2) VV_2}{(t_2 - t_1) V_1 m}, \text{ где}$$

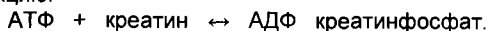
D_1 – оптическая плотность раствора в начале определения; D_2 – оптическая плотность раствора через определённый промежуток времени; V – общий объём экстракта, мл; V_1 – объём фильтрата в кювете, мл; V_2 – общий объём жидкости в кювете, мл; t – время, мин; m – масса навески, г.

Б. Определение активности трансфераз

Трансферазы – класс ферментов, катализирующих реакции переноса групп атомов (отличных от атомов водорода) с одного субстрата на другой. Трансферазы переносят одноуглеродные, альдегидные, кетонные группировки, а также ацильные, алкильные, гликозильные остатки и группы, содержащие фосфор и серу. Данный класс ферментов делят на подклассы по природе переносимых групп атомов: фосфотрансферазы (киназы), ацилтрансферазы, аминотрансферазы и другие.

Определение активности креатинфосфотрансферазы (Б.Ф. Коровкин)

Мышечные волокна, а также нейроны содержат в большом количестве фермент – креатинфосфотрансферазу (киназу), катализирующую следующую обратимую реакцию:



В условиях физиологического покоя прямая реакция обеспечивает запасание богатых энергией соединений в виде более устойчивого, чем АТФ, креатинфосфата. Креатинфосфат затем превращается в АТФ в обратной реакции по мере необходимости. Однако при рН близком к 7,0 (оптимум 6,8) равновесие смещено в сторону обратной реакции, скорость прямой реакции максимальна при рН 9,0. Активаторами служат ионы магния, марганца и кальция, ингибиторами – цинка, меди, ртути, а также ряд тиоловых соединений. Восстановители сульфгидрильных групп – глутатион, цистеин, дитиотрептол – активируют фермент, что свидетельствует о важности SH-групп в активном центре для катализа.

Креатинфосфокиназа (КФК) отличается множественностью форм. В клетках обнаруживаются изоферменты, конформеры, аллозимы (атипические, патологические формы) и макромолекулярные комплексы. Изоферменты представлены цитоплазматическими и одним митохондриальным изоформами. Цитоплазматических в клетках высших животных обычно встречается три вида: MM; MB и BB-изоферменты. Все формы способны к обмену субъединицами. Митохондриальный изофермент также состоит из 2-х субъединиц, но отличных от M и B. В мышечной ткани в основном в цитоплазме представлен изофермент MM, а в нейронах – BB. Кардиомиоциты отличаются разнообразием изоформ: 1/3 – MM; 1/3 – MB; 1/3 – митохондриальный изофермент. Конформеры характерны для BB-изоформы, макромолекулярные комплексы разнообразны – с гамма-глобулинами, белками внутренней мембраны митохондрий (митохондриальный изофермент), липопротеидами, с собственными субъединицами (полимеризация).

Есть предположение, что равновесие в реакции, катализируемой цитоплазматическими изоферментами смещено в обратную сторону, а митохондриальным – в прямую. Креатинфосфат при этом является той энергетической формой, которая переносится из митохондрий в цитоплазму.

Креатинфосфокиназа кроме упомянутых тканей содержится в небольших количествах в клетках щитовидной железы, легких.

Определить активность креатинфосфокиназы можно в гомогенатах скелетной и сердечной мускулатуры, препаратах митохондрий, а также сыворотке крови (в норме регистрируется небольшой фон активности в основном за счет присутствия фермента аденилаткиназы).

Принцип метода. Принцип метода заключается в измерении количества образующегося креатина по цветной реакции с α -нафтолом и диацетилом в качестве катализатора. Интенсивность окраски измеряется фотометрически.

Реактивы: 1. 0,1М Трис-НСI буфер, рН 7,2, содержащий 0,1М хлористого магния; 2. Креатин-фосфат. 6мМ раствор; 3. АДФ, 0,06% раствор; 4. Щелочной реактив: смесь, содержащая 16% Na_2CO_3 и 6% NaOH; 5. 1%-ный раствор α -нафтола в щелочном реактиве; 6. 5%-ный раствор гидроокиси бария; 7. 5%-ный раствор сернокислого цинка; 8. Диацетил, 0,4%-ный основной раствор. Рабочий раствор разводится десятикратно перед употреблением (*ex temporae*). 9. Стандартный раствор креатина, 0,01М основной раствор. Рабочий раствор разводится перед употреблением в 100 раз.

Ход определения. В пробирку поместить по 0,25мл буфера, 0,25мл дист. воды, 0,1мл креатин-фосфата, 0,1мл препарата митохондрий (гомогената ткани, сыворотки крови). В контрольную пробирку вместо исследуемой жидкости добавить еще 0,1мл дист. воды. Контрольная проба обрабатывается также, как опытные. Инкубировать пробы при 37°C в течение 3-5 минут. После предварительной инкубации в каждую пробу добавить по 0,2мл АДФ. Все пробы инкубировать еще 30 минут при 37°C для протекания ферментативной реакции. Реакцию остановить добавлением в каждую пробу по 0,2мл раствора хлористого цинка и 0,2мл гидроокиси бария. Образовавшийся

осадок отцентрифугировать при 600g в течение 15 минут. В надосадочной жидкости (она должна быть прозрачной) определяют количество образовавшегося креатина.

Для определения креатина из каждой пробирки отобрать в чистые сухие пробирки по 0,5мл надосадочной жидкости и добавить по 3мл дист. воды, 1мл щелочного раствора α -нафтола и 0,5мл раствора диацетила. Одновременно ставится стандартная проба: 0,5мл рабочего раствора креатина, 3мл воды, 1мл щелочного раствора α -нафтола и 0,5мл диацетила. Все пробы поместить на 7 минут в темноту. Затем проколориметрировать при длине волны 520nm против контрольной пробы. Стандартная проба (она интенсивнее окрашена) измеряется последней.

Для расчета удельной активности определяется содержание белка в суспензии митохондрий, гомогенате или сыворотке крови.

Расчет:

$$X \text{ мкМ креатина/мин на мг белка в мл} = E_{\text{оп.}} \times 5 \times 7 \times 5 / E_{\text{ст.}} \times 0,5 \times 30 \times \text{белок, мг/мл,}$$

где $E_{\text{оп}}$ – ОП опытной пробы; $E_{\text{ст.}}$ – ОП стандартной пробы;

5 – содержание креатина в пробе, мкМ; 7 – первичное разведение исследуемой жидкости; 5 – окончательное количество пробы, мл; 0,5 – количество надосадочной жидкости в пробе; 30 – время инкубации, мин.

Определение активности фосфофруктокиназы в мышечной ткани.

Фосфофруктокиназа – фермент гликолиза, катализирующий фосфорилирование фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-дифосфат с помощью переноса фосфатного остатка с АТФ. Реакция практически необратима. Фосфофруктокиназа – фермент, активность которого лимитирует скорость гликолитического процесса. Активная форма фермента – тетрамер, активность регулируется аллостерически. Аллостерические ингибиторы – субстраты: АТФ, и метаболиты: цитрат; аллостерические активаторы – субстраты и продукты: фруктозо-6-фосфат, АДФ; фруктозо-1,6-дифосфат; метаболиты – фруктозо-2,6-дифосфат, АМФ, цАМФ.

Определение активности фосфофруктокиназы можно проводить двумя методами: (1) по скорости образования фруктозо-1,6-дифосфата; (2) по скорости образования АДФ. В любом случае количество продукта фиксируется по степени окисления НАДН. Определять активность фосфофруктокиназы можно в гомогенатах животных тканей и гемолизатах эритроцитов.

Реактивы: 1. ТРИС-HCl, 75мМ раствор, pH 8,0; 2. ЭДТА, 3мМ раствор; 3. Mg (CH₃COO)₂ · 4H₂O, 180мМ раствор; 4. Сульфат аммония, 120мМ раствор; 5. Дитиотрентол, 30 мМ раствор; 6. Фруктозо-6-фосфат – 30мМ раствор, pH 7,0; 7. Хлористый калий, 1,5М раствор; 8. АТФ – 30мМ раствор, pH 7,0; 9. НАДН – 6мМ раствор, pH 8,0; 10. Фосфофенолпироват – 9мМ раствор, pH 7,7. 11. Ферментные препараты: альдолазы и триозофосфатизомеразы для метода №1 и пируваткиназы и лактатдегидрогеназы для метода №2.

Метод №1. В кювету спектрофотометра внести 2,5мл буфера, 0,1мл раствора ЭДТА, 0,1мл раствора дитиотриитола, 0,1мл раствора магния уксуснокислого, 0,1мл раствора аммония серноокислого, 0,1мл гомогената, 0,1мл АТФ, 0,1мл хлористого калия, 0,1мл раствора НАДН, 10мкл альдолазы (0,4 ед/мл), 10мкл триозофосфатизомеразы (2,5ед/мл), 10мкл α -глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (0,4ед/мл). Реакцию начать добавлением 0,1мл фруктозо-6-фосфата, быстро перемешать пластиковой палочкой и измерить начальную ОП. Через 5 минут измерить конечную ОП.

Метод №2. Разница заключается в добавляемых ферментах и одного субстрата (фосфоенолпировата). В кювету спектрофотометра внести 2,5мл буфера, 0,1мл раствора ЭДТА, 0,1мл раствора дитиотриитола, 0,1мл раствора магния уксуснокислого, 0,1мл раствора аммония серноокислого, 0,1мл гомогената, 0,1мл АТФ,

0,1мл хлористого калия, 0,1мл раствора НАДН, 0,1мл раствора фосфоенолпирувата, 10мкл пируваткиназы (2ед/мл), 10мкл лактатдегидрогеназы (2ед/мл). Реакцию начать добавлением 0,1мл фруктозо-6-фосфата, быстро перемешать пластиковой палочкой и измерить начальную ОП. Через 5 минут измерить конечную ОП.

Для расчета удельной активности определить количество белка в гомогенате методом Лоури.

Определение активности аминотрансфераз. Аминотрансферазы – ферменты, осуществляющие обратимый катализ переноса аминогрупп с аминокислоты на кетокислоты. Наиболее распространены аланин- и аспартатаминотрансферазы. Активность ферментов можно определять в гомогенатах печени и в сыворотке крови.

аланинаминотрансфераза
 α -Аланин + α -кетоглутарат \leftrightarrow пируват + глутамат

аспартатаминотрансфераза
 Аспартат + α -кетоглутарат \leftrightarrow оксалоацетат + глутамат

Реактивы. 1. Подготовка субстратных смесей. А. Для аланинаминотрансферазы: 29,2мг α -кетоглутаровой кислоты и 1,78г DL-аланина (или 0,89г L-аланина) растворить в 0,1Н растворе NaOH (осторожно, по каплям, до pH 7,4, применяя индикаторную бумагу). Раствор перелить в мерную колбу на 100мл и довести до метки 0,1М фосфатным буфером, pH 7,4. Б. Для аспартатаминотрансферазы: 29,2мг α -кетоглутаровой кислоты и 2,66г DL-аспарагиновой кислоты (или 1,33г L-аспарагиновой кислоты) осторожно растворить в 0,1Н растворе NaOH, до pH 7,4. Раствор перелить в мерную колбу на 100мл и довести до метки 0,1М фосфатным буфером, pH 7,4.

2. Стандартный раствор пирувиноградного натрия. 11мг кристаллического пирувата натрия (химически чистого) растворить в небольшом количестве дист. воды, перенести в мерную колбу и довести водой до 100мл.

3. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина. 19,8мг растворить в небольшом количестве 1Н раствора соляной кислоты при нагревании на водяной бане. После остывания раствора довести до 100мл 1Н соляной кислотой (в мерной колбе). На следующий день раствор отфильтровать и хранить в темной посуде. Раствор годен в течение года.

4. 0,4Н раствор NaOH, свободный от карбонатов. Дист. воду кипятить в течение 10 минут для удаления карбонатов, закрыть и дать остыть. Использовать для приготовления раствора едкого натрия.

Построение калибровочного графика по пирувиноградной кислоте для определения молярного коэффициента экстинкции. Для построения калибровочного графика приготовить серию стандартных разведений раствора пирувинограднокислого натрия как указано в таблице.

№	Стандартный раствор, мл	Концентрация пирувинограднокислого натрия, мкМ	Дист. вода, мл
1.	0,05	0,05	0,55
2.	0,10	0,10	0,50
3.	0,15	0,15	0,45
4.	0,20	0,20	0,40
5.	0,25	0,25	0,35
6.	0,30	0,30	0,30

Ход определения молярного коэффициента экстинкции. Приготовить 6 пробирок, в пробирки добавить по 0,6мл соответствующего раствора пировинограднокислого натрия (можно для каждого разведения использовать две-три пробы). Также необходима пробирка, содержащая 0,6мл дист.воды (контроль реактивов). В каждую пробирку добавить по 0,25мл раствора 2,4ДНФГ. Оставить пробы на 20 минут для прохождения реакции. Затем добавить по 2,5мл 0,4Н раствора едкого натра, оставить еще на 10 минут при комнатной температуре для развития окраски. Измерить ОП против контроля на реактивы, длина волны 540нм, толщина кюветы 5мм.

Результаты отложить на графике: по оси ординат – ОП; по оси абсцисс – концентрация пировинограднокислого натрия. Прочертить прямую по точкам из нуля. Затем найти по графику несколько значений ОП и соответствующую ей концентрацию и рассчитать среднее значение микромолярного коэффициента экстинкции.

Ход определения активности аминотрансфераз. В пробирки внести по 0,5мл субстратной смеси (либо для аланинаминотрансферазы, либо для аспаратаминотрансферазы) и прогреть 5 минут при 37⁰С. Затем в опытные пробы добавить по 0,1мл свежей сыворотки крови или по 10мкл гомогената ткани печени, в контрольные соответственно: 0,1мл или 10мкл дист.воды. Поместить пробирки в термостат при той же температуре и инкубировать для определения активности аланинаминотрансферазы в течение 30 минут, а для определения активности аспаратаминотрансферазы – 1-го часа. Затем в пробирку добавить по 0,5мл 2,4-динитрофенилгидразина и оставить еще на 20 минут. По окончании времени прилить по 5мл раствора 0,4Н едкого натра, перемешать и оставить еще на 10 минут для развития окраски при комнатной температуре. Затем измерить ОП на длине волны 540нм, кювета толщиной 10мм против контрольной пробы.

Расчет:

$$X \text{ мкМ/мин} = \Delta E \times 6,1 (6,01) / \epsilon \times 0,1(0,01) \times 30 (60), \text{ где} \\ \epsilon - \text{мкМ коэффициент экстинкции;}$$

В. Определение активности гидролаз

Ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление эфирных, сложнэфирных, пептидных, гликозидных и связей кислотных ангидридов. Классифицируются на подклассы по природе связи, которая подвергается гидролизу.

Липаза (триацилглицерол-ацилгидролаза, КФ 3.1.1.3) – фермент, входящий в группу эстераз, гидролизует триглицериды до жирных кислот и моноацилглицерола. Фермент поджелудочной железы человека представляет собой гликопротеид с М. М. 46-48кДа. Липаза способна гидролизовать субстрат только в эмульгированной форме.

Определение активности липазы в биологических жидкостях с использованием оливкового масла в качестве субстрата (И.Д. Ертанов и др., 1985). Метод основан на спектрометрическом определении изменения мутности эмульсии в результате ферментативного гидролиза субстрата под действием липазы.

Реактивы: 1. Окись алюминия; 2. Абсолютный спирт; 3. Основной раствор оливкового масла, 0,01195М/л. В коническую колбу с притертой пробкой налить 100 мл абсолютного спирта, добавить 1г или 1,1мл оливкового масла с плотностью 0,913г/см³, поставить на 1ч в аппарат для встряхивания; 4. ТРИС-НСl-буфер, 0,025М/л, содержащий 0,014М/л натриевой соли дезоксихолевой кислоты, рН 8,8. 5. Рабочий раствор оливкового масла, 170мкМ/л: 1,5мл основного раствора оливкового масла медленно добавить к 100мл трис-буфера с дезоксихолатом. При этом кончик пипетки держат под поверхность эмульсии. Образовавшуюся эмульсию встряхивать в течение 1 часа. Эмульсия стабильна в течение 2 недель при хранении в холодильнике.

Расчет концентрации оливкового масла в рабочей эмульсии:

$$X \text{ мкМ/л} = 0,01195 \times 1,5 \times 10^5 / 100 = 170 \text{ мкМ/л.}$$

Материал для исследования: сыворотка крови свободная от гемолиза, консервантов и антикоагулянтов.

Ход определения. Перед определением рабочую эмульсию взболтать в течение 5 минут на аппарате для встряхивания. В кювету или пробирку с крышкой внести 3мл эмульсии оливкового масла, крышку закрыть и поставить в термостат при 30°C. Затем добавить 0,1мл сыворотки крови, смешать без встряхивания и поставить в термостат, через 2,5 минуты измерить E_1 против воздуха на длине волны 340нм. Снова поставить в термостат на 3 минуты измерить E_2 . Проводят также измерение E_{CT} – исходной экстинкции рабочего раствора оливкового масла против воздуха.

Расчет активности липазы сыворотки крови проводят по формуле:

$$\text{Активность липазы (МЕ)} = (E_1 - E_2) \times 170 \times 3 \times 1000 / E_{CT} \times 3 \times 1000 \times 0,1 \\ \text{и после сокращений:} \\ (E_1 - E_2) \times 170 / E_{CT} \times 0,1.$$

Амилаза (α -1,4-эндогликозидгидролаза) – фермент, гидролизующий внутренние α -1,4 гликозидные связи. Активность амилазы можно определить по скорости гидролиза крахмала, остаточное количество крахмала обычно устанавливают, используя реакцию Сакса (образование синего окрашивания при реакции крахмала с йодом).

Выделение амилаз из зерновок злаковых. Реактивы: 1. Хлористый натрий, 1%-ный раствор; 2. Сульфат аммония (порошок); 3. Этанол; 4. Цитратный буфер, pH 5,6 (84мл лимонной кислоты 0,1М смешать с 116мл 0,2М натрия фосфорнокислого двузамещенного; 5. Соляная кислота 0,1Н; 6. 0,15М натрий фосфорнокислый двузамещенный.

Ход выделения. Большое количество амилаз содержат проросшие зерна. В связи с этим для получения ферментных препаратов лучше использовать солод. Для приготовления солода зерновок злаков (пшеницы, ржи, ячменя) проращивать до проростков размером с зерновку, высушить в термостате при температуре не выше 35°C и измельчить в тонкую муку.

100г молотого солода тщательно экстрагировать 400мл 1%-ного раствора хлорида натрия в течение 1-1,5 часов при температуре 30-35°C с периодическим встряхиванием. Экстракт отфильтровать на воронке Бухнера и на каждые 100мл экстракта добавить по 35г тонко измельченного сульфата аммония. При таком насыщении раствора сульфатом аммония α - и β -амилазы выпадают в осадок. Осадку нужно дать хорошо отстояться на холоду и затем отделить от раствора центрифугированием при 3000g в течение 15 минут. Осадок, содержащий ферменты растворить в 20мл дист. воды.

Используя термостойкость α -амилазы, 10мл раствора прогреть до 70°C в течение 15 минут (температуру необходимо держать не выше 70°C), охлажденный раствор можно использовать для определения активности α -амилазы. Так как оптимум pH α -амилазы зерновых равен 5,5-5,8, после охлаждения к раствору фермента добавить 14мл цитратного буфера, pH 5,6.

Бета-амилазу выделяют, инактивируя α -амилазу в кислой среде. Для этого к оставшемуся 10мл ферментного препарата прибавляют 2мл 0,1Н раствора соляной кислоты и 8мл дист. воды (общий объем 20мл, pH 3,3) и оставляют в ледяной бане на 15 минут. Затем к раствору добавляют 4мл 0,15М натрия фосфорнокислого двузамещенного для достижения pH 6,0.

Выявление и сравнение декстранизирующей способности α - и β -амилаз. Реактивы: 1. 2%-ный раствор крахмала; 2. 20%-ная соляная кислота; 3. раствор Люголя (1г йода и 2,5г йодистого калия растворить в 20мл воды; после растворения объем довести до 100мл).

Приготовить разведения ферментных препаратов (отдельно для α - и β -амилазы) как указано в таблице.

Содержимое пробирок	Количество растворов в пробирках, мл					
	1	2	3	4	5	6
1. Ферментный раствор	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	0
2. Дист. вода	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0	4,0

Затем в каждую пробирку налить по 5мл 2%-ного раствора крахмала, тщательно перемешать и поставить в водяную баню при 40°C на 15 минут. Охладить и в каждую пробирку добавить по 0,1мл 20%-ной соляной кислоты для остановки реакции. Затем в каждую пробирку добавить по 0, 25мл раствора Люголя и довести объем до 10мл дист.водой. Если окраска растворов слишком интенсивная можно добавить еще по 5-10мл дист. воды. Запишите окраску в каждой пробирке, измерьте ОП при длине волны 590нм в кювете толщиной 3-5мм (в зависимости от интенсивности окраски). Найдите разницу по отношению к контролю (6-я пробирка):

$$E = E_k - E_0 / E_k$$

Осахаривающая способность амилаз. Реактивы: 1. 2%-ный раствор крахмала; 2. Фелингова жидкость – готовят два раствора: А – 6,92г медного купороса в 100мл дист.воды; Б – 34,6г сегнетовой соли и 14г едкого натра в 100мл дист.воды; перед употреблением смешивают равные объемы растворов; 3. Реактив Барфедда: 13,3г ацетата меди растворить в 200мл горячей воды, фильтровать и к фильтрату добавить 1,9мл ледяной уксусной кислоты.

Ход определения. В две пробирки внести по 5мл 2%-ного раствора крахмала, прогреть в водяной бане при 40°C в течение 15 минут. Затем в первую пробирку прилить 1мл раствора ферментного препарата α -амилазы, во вторую 1мл раствора β -амилазы, содержимое пробирок хорошо перемешать и снова поместить в кипящую водяную баню на 5 минут. Растворы охладить до комнатной температуры и разделить на две части. С одной частью провести реакцию с фелинговой жидкостью, с другой – с реактивом Барфедда.

1. Реакция с фелинговой жидкостью. К исследуемому раствору приливают равный объем фелинговой жидкости и нагреть до начала кипения. В случае наличия восстанавливающих сахаров выпадает красный осадок закиси меди.

2. Реакция Барфедда. К 5мл Барфедда прибавить 1мл исследуемого раствора. Смесь нагреть в кипящей водяной бане 10 минут. Моносахариды восстанавливают реактив Барфедда до закиси меди, а дисахариды реакции не дают. Необходимо строго придерживаться указанного времени инкубации в водяной бане для предотвращения гидролиза дисахаридов до моносахаридов.

На основании полученных данных сделайте вывод о различии в действии α - и β -амилаз на крахмал.

Определение активности α -амилазы в сыворотке крови. Реактивы: 1. 0,24%-ный раствор на 0,9%-ном NaCl; 2. 0,15М фосфатный буфер, pH 7,15; 3. Раствор I₂ в KI (0,3г йода + 3г йодистого калия в 100мл дист. воды); 4. 0,5Н соляная кислота; 5. Сыворотка крови.

Ход определения. 0,5мл раствора крахмала, 0,5мл буфера и 0,1мл сыворотки крови инкубировать при 37°C в течение 30 минут. Одновременно поставить контрольную пробу: 0,5мл крахмала и 0,6 мл буфера. Добавить 0,2мл соляной кислоты и в опытные и в контрольную пробу для остановки реакции. Перемешать и добавить по 0,025мл реактива 3. Перемешать и измерить ОП при длине волны 590нм, кювета 0,5см.

Расчет:

$$E_k - E_0 / E_k \text{ (y.e.)}$$

Определение протеолитической активности. Процессы расщепления белков играют значительную роль в жизнедеятельности клеток. Как показали исследования последних лет, протеазы осуществляют не только расщепление старых, утративших свои функции белков, но и осуществляют регуляцию процессов, активируя ферменты с помощью ограниченного протеолиза неактивных форм, способствуют производству биологически активных тканеспецифических пептидных соединений, регулирующих основные процессы жизнедеятельности клеток. Основную деградацию старых белков осуществляют в клетках лизосомальные ферменты – катепсины. Регулируемый протеолиз в клетках происходит в убиквитин-протеосомной системе. Протеосомы (в отличие от лизосом) присутствуют в клетках всех организмов от археобактерий до высших эукариот, что свидетельствует об их абсолютной значимости для нормальной жизнедеятельности (Maupin-Furlow et al., 2006).

Протеазы (пептидгидролазы) – ферменты, гидролизующие белки и пептиды по пептидным связям. Они делятся по группы: сериновые протеиназы (ферменты имеют сериновые остатки в активном центре и гидролизуют внутренние пептидные связи в белках); металлопротеазы (в активном центре металлы переменной валентности и гидролизуют конечные связи); тиоловые (SH-группы в активном центре); кислые протеиназы (оптимум активность в интервале pH 1-5) и др.

Одной из наиболее изученных сериновых протеиназ является фермент *трипсин* – фермент сока поджелудочной железы млекопитающих. Трипсин проявляет относительную субстратную специфичность, расщепляя только те внутренние пептидные связи, которые образованы остатками лизина и аргинина, несущие в нейтральной среде положительный заряд.

Фотометрическое определение активности трипсина. Реактивы: 1. Паранитроанилин, 100мкМ раствор; 2. Бензоил-аргинин-пара-нитроанилида (БАПНА) в фосфатном буфере.

Приготовление раствора БАПНА. 43,5мг препарата суспендируют в 1мл ацетона, после этого прибавляют примерно 80мл 0,05М фосфатного буфера (pH 7,6). Смесь нагревают в водяной бане при температуре 75-80°C до полного растворения препарата, затем доводят объем до 100мл. Раствор можно хранить в течение месяца в темном месте.

3. Раствор трипсина (10мкг/мл); 4. 1N раствор HCl, 0,0025N HCl; 5. Ацетон

Приготовление раствора трипсина. 3мг фермента растворяют в 3мл 0,0025N HCl, получается маточный раствор. Рабочий раствор готовят путем стократного разведения маточного раствора дистиллированной водой (500мкл маточного раствора трипсина помещают в мерную колбу на 50мл, доводят дистиллированной водой до метки).

Для расчета удельной активности препарата фермента строят калибровочный график по паранитроанилину (p-NA). Для этого в 11 пробирках готовят растворы p-NA разных концентраций путем смешивания 100мкМ раствора p-NA и дистиллированной воды по следующей схеме.

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
100 мкМ p-NA	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Дист. вода	5	4,5	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0

В пробах определяют величину оптической плотности на фотозлектроколориметре КФК-3 при 364нм и строят график зависимости величины оптической плотности от концентрации р-НА.

Для определения активности препарата трипсина берут 6 пробирок – 3 опытных и 3 контрольных. Активность фермента определяют по следующей схеме.

Реакционную смесь переливают в кюветы и измеряют оптическую плотность при 364нм. Удельную активность фермента выражают в мкМ р-НА, отщепленного 1мкг трипсина за 1мин, по калибровочной кривой.

Опыт	Контроль
1,6мл раствора БАПНА	1,6мл раствора БАПНА
-----	0,7мл 1N HCl
Преинкубация в термостате при 37°С в течение 10 минут	
0,5мл раствора трипсина (10мкг/мл)	0,5мл раствора трипсина (10мкг/мл)
Инкубация в термостате при 37°С в течение 30 минут	
0,7N HCl	-----

Пепсин – эндопептидгидролаза желудочного сока. Данный фермент относится к группе кислых протеиназ. К этой же группе относятся кислые катепсины, лизоцим и другие ферменты.

Определение активности пепсина по Ансону и Мирскому. Данный метод основан на следующем принципе. Белок подвергается действию фермента, затем ТХУ-ной кислотой осаждается оставшийся белок, в супернатанте определяют остатки тирозина, что служит мерой активности фермента.

Реактивы: 1. 2%-ный раствор гемоглобина в 0,06N соляной кислоте; 2. 0,3N раствор ТХУ-ной кислоты; 3. 0,5N раствор едкого натрия; 4. Реактив Фолина, разведенный в три раза; 5. Стандартный раствор тирозина: 0,0008 миллиэквивалентов (мэкв) в 5мл 0,2 N раствора соляной кислоты (не хранится); 5. Раствор пепсина 10мг в 10мл 0,06N соляной кислоте.

Ход определения. В 5мл субстрата (раствор гемоглобина) прибавить 1мл раствора фермента, инкубировать 10 минут при комнатной температуре. Одновременно ставят холостую пробу: 5мл субстрата + 1мл 0,06N соляной кислоты. Опыт и холостую пробу обрабатывают одинаково. В каждую пробу добавить 10мл 0,3N раствора ТХУ-ной кислоты, перемешать и отфильтровать (или центрифугировать). По 5мл фильтрата (центрифугата) поместить в мерные колбы на 25мл. Сюда же прилить по 10мл 0,5N раствора едкого натрия и по 3мл разведенного реактива Фолина. Довести водой до метки. Стандартная проба: 5мл стандартного раствора поместить в колбу на 25мл, прилить 10мл 0,5N едкого натрия, 3мл разведенного реактива Фолина. Прокolorиметрировать при 750нм, кювета 10мм против холостой пробы.

Расчет, мэкв пепсина: $E_{оп} \times 0,0008 / E_{станд.}$

Протеолитическая активность бактерий и грибов

Выявление протеолитической активности по модифицированному методу Вильштеттера и Вальдшмидт-Лейтца. Данный метод основан на определении свободных карбоксильных групп в спиртовых растворах аминокислот и полипептидов.

Ряд бактерий (грам-положительные) и микроскопических грибов выделяют протеолитические ферменты в питательную среду (экзоферменты), активность которых можно оценить. Для этого проводят культивирование бактерий и/или грибов в жидкой питательной среде в течение от 6 до 24 часов. Затем необходимо отделить

клетки от культуральной жидкости центрифугированием или фильтрованием, а в культуральной жидкости определяется активность протеаз.

Активность протеаз выражают количеством миллиграммов аминного азота, которое образуется при гидролизе определенного количества 5%-ного раствора желатина с рН 7,3-7,5 одним мл (1мл) ферментного препарата (в данном случае культуральной жидкости) за 1 час инкубации при температуре 40°C. За единицу протеолитической активности принимают количество фермента, которое образует 1мг аминного азота за 1 час инкубации.

Ход определения. К 10мл 5%-ного раствора желатина нагретого до 40°C прилить 2мл культуральной жидкости и сразу же отобрать 1мл в коническую колбу на 50мл, в которую предварительно внести 20мл 96%-ного этилового спирта и 0,2мл 1%-ного раствора тимолфталейна. (контрольная проба). Оставшуюся смесь желатина с культуральной жидкостью поместить в термостат при 40°C для протекания протеолиза на 3 часа. Контрольную пробу титровать 0,1N раствором NaOH. После появления голубого окрашивания прибавить еще 4 капли щелочи и этот результат записать. Титрование проводят микробюреткой с ценой деления 0,02мл. Через 3 часа отобрать 1мл реакционной смеси и провести те же операции, что и с контрольной пробой.

Расчет протеолитической активности проводится по формуле:

$$\text{Пр.ак-ть (мг/мл в час)} = (a - a_k) \times 1,4K / t \times P,$$

где a – количество раствора едкого натра, пошедшего на титрование 1мл опытной пробы, мл; a_k – то же для контрольной пробы; 1,4 – коэффициент пересчета количества 0,1N раствора щелочи в мг азота аминокислот и пептидов; K – поправка к титру щелочи (обычно 1,06); t – время инкубации (3 часа); P – коэффициент разведения культуральной среды.

Определение активности пептидгидролаз с использованием субстратов, иммобилизованных в геле агарозы (Шприня и соавт., 2009). Для получения ферментативных препаратов навеску биологического материала (или определенный объем культуры бактериальных клеток) гомогенизировать в течение 5 минут в гомогенизаторе Поттера, затем растереть с песком в ступке. Полученный гомогенат развести дист.водой в отношении от 1:1 до 1:5 в соответствии с консистенцией и оставить в холодильнике на 2 часа для экстрагирования ферментов. Полученный экстракт отцентрифугировать в режиме 3500g, 10 минут. Надосадочная жидкость используется как ферментативный препарат для определения протеолитической активности.

Приготовление гелевой пластины из агарозы. 1,5г порошка агарозы растворить в 100мл горячего (90°C) 1%-ного раствора белка желатина (или казеина). При использовании термолабильных белков: яичного или сывороточного альбумина, гемоглобина, 1 г белка растворить в 1,5%-ном растворе агарозы 45°C. В полученную смесь агарозы и белкового субстрата добавить 10мг красителя бромфенолового синего, при этом раствор окрашивается в ярко-синий цвет. Раствор разлить в кюветы с высотой борта 0,5см (можно в чашки Петри). Кюветы оставить для застывания агарозы. Затем сформировать лунки диаметром 4мм на расстоянии не менее 2,5см друг от друга.

Ход определения. В каждую лунку внести по 20мкл ферментативного раствора. Кювету или чашку Петри закрыть листами фильтровальной бумаги (для убирания лишней влаги) и инкубировать при 37°C (или комнатной температуре) от 14 до 24 часов. Для остановки реакции гидролиза в чашку залить 30%-ный раствор уксусной кислоты на 2 минуты. Затем кислоту удалить и промыть дист.водой.

Во время инкубации молекулы фермента диффундировали в гель и гидролизовали субстрат вокруг лунки. При этом участки геля осветляются за счет разрушения комплекса субстрат-краситель.

Активность фермента рассчитывается за счет измерения площади участка геля с гидролизованным субстратом вокруг каждой лунки. За миллиединицу активности (МЕ) фермента принимается такая активность, которая обуславливает гидролиз субстрата на участке геля размером 1мм².

Микрометод определения активности ацетилхолинэстеразы эритроцитов (по Элману в модификации Hideki Jgusu and all., 1980) Ацетилхолинэстераза (АХЭ) – фермент, локализованный в поверхностной части цитоплазматической мембраны нервных клеток и мембраны саркоплазматического ретикулума. Катализирует реакцию гидролитического расщепления ацетилхолина на холин и остаток уксусной кислоты. Есть мнение, что АХЭ эритроцитов, подобно ферменту нервной ткани участвует в регуляции проницаемости плазматической мембраны клетки для ионов натрия и калия и связана с устойчивостью клеток к гемолизу.

Реактивы: 1. Фосфатный буфер, 0,1М, pH 7,4; 2. Реактив Элмана (5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота), 0,1мкМ раствор (3мг в 2мл 0,1М фосфатного буфера); 3. Ацетилтиохолин 0,015мМ раствор (5мг в 3мл фосфатного буфера).

Подготовка гемолизата, 0,1мл фракции чистых эритроцитов + 0,2мл 0,2%-ного тритона X-100 + 0,7мл дист. воды (основной гемолизат). Основной гемолизат развести дист.водой в 20 раз: 0,1мл осн.гем. + 1,9мл дист.воды.

Ход определения. В пробирки внести 2,7мл буфера, 0,1мл разведенного гемолизата, 0,1мл реактива Элмана, 0,1мл ацетилтиофолина. Промерить начальную ОП при длине волны 412нм против фосфатного буфера. Инкубировать при 37⁰С в течение 10 минут. Затем промерить конечную ОП. При расчете активности используется молярный коэффициент экстинкции для тионитрофенольного аниона (ТНФА) реактива Элмана, образующегося в ходе реакции – $\epsilon = 11400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Активность выражается в мкМ ТНФА /мин на грамм гемоглобина в литре гемолизата, поэтому определяется еще содержание гемоглобина в основном гемолизате, а при составлении формулы учитывается его разведение.

Определение активности 5-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5). (И.Д. Мансурова, Р.З. Стосман, 1973). Фермент является специфической фосфатазой, отщепляющей остаток фосфорной кислоты от нуклеозид-5-фосфатов. Локализован внутримембранно, имеет значение в производстве аденозина, который, в свою очередь, является регулятором многих процессов. Например, от уровня производства аденозина зависит способность нейтрофилов к «респираторному взрыву». Кроме того, активность фермента служит хорошим маркером состояния фосфолипидного бислоя мембран, так как 5-нуклеотидаза активируется при увеличении количества фосфолипидов в окружении фермента. Активность фермента можно определять в лизатах эритроцитов и лейкоцитов, а также в сыворотке крови, так как 5-нуклеотидаза быстро выходит из клеток при малейшем повреждении мембран (например, гепатоцитов).

Приготовление гемолизата: 0,1мл отмытых и упакованных эритроцитов + 0,2мл 0,2 %-ного тритона X-100 + 0,1мл 1%-ного раствора ЭДТА (для ингибирования щелочной фосфатазы) + 0,6мл дист.воды.

Реактивы: 1. 4,0мМ АМФ; 2. 50мМ ТРИС-НСl, pH 7,0, с 1,0мМ хлористого магния; 3. 10%-ная ТХУ-ная кислота.

Опытная проба. 0,4мл буфера, 0,1мл гемолизата, 0,1мл раствора АМФ.

Контрольная проба. 0,5мл буфера, 0,1мл гемолизата.

Холостая проба. 0,5мл буфера, 0,1мл АМФ.

Время инкубации 60 минут, температура 37°C. Инкубируются опытные и холостая проба. В контрольную сразу добавляют 1мл 10%-ного раствора ТХУ. Реакцию после инкубации останавливают, добавляя по 1мл 10%-ного холодного раствора ТХУ-ной кислоты. В пробах определить количество неорганического фосфата. Контрольная и холостая пробы: 1) содержание фосфора в исследуемом образце до инкубации (Ек); 2) в инкубационной среде без образца – контроль на спонтанный гидролиз АМФ(Ех).

*Определение содержания фосфора с малахитовым зеленым. (М.В.Гончар, В.А.Монастырский, 1982). Реактивы: 1. 0,045%-ный раствор малахитового зеленого (раствор А). Хранят в темной посуде при комнатной температуре (можно длительно); 2. 4,2 %-ный раствор молибдата аммония в 4Н соляной кислоте (раствор Б). 3. Рабочий реактив: смешать 3 объема раствора А с 1 объемом раствора Б. Смесь профильтровать. К полученному фильтрату добавить 0,2%-ный раствор тритона X-100 в расчете 1мл на 50мл реактива.

Ход определения. К 0,2мл исследуемого экстракта прилить 2мл рабочего реактива. Через 20 минут промерить ОП на длине волны 625нм против фонового раствора: 0,2мл воды + 2мл рабочего реактива.

Для расчета количества фосфата в пробах следует построить калибровочных график. В качестве стандартного раствора используют безводный $\text{KН}_2\text{P}_2\text{O}_7$: 10мг предварительно прокаленного калия фосфорнокислого однозамещенного взвешивают на торсионных весах и растворяют в бидист.воде в мерной колбе на 100мл.

Сделайте ряд разведений стандартного раствора бидист.водой, пересчитайте содержание на остаток фосфорной кислоты в мкМ PO_4 . Например, 10мг $\text{KН}_2\text{P}_2\text{O}_7$ в 100мл содержит 6,99мг PO_4 . Это составляет 73,58 мкМ PO_4 . Затем проведите определение фосфора по описанной методике для каждого разведения стандартного раствора. Постройте калибровочный график. Рассчитайте коэффициент молярной экстинкции.

Расчет активности фермента проведите по формуле:

$$X \text{ мкМ } \text{PO}_4/\text{мин} = (E_0 - E_k - E_x) \times$$

*Определение фосфора неорганического (А.Б. Пупышев, 1991). Реактивы: 1. 2,5%-ный раствор молибдата аммония на 10Н серной кислоте; 2. 10%-ный раствор ТВИН-80; 3. Красящий реактив: готовят смешиванием 1:1 реактивов 1 и 2; 4. Рабочий раствор красящего реактива: реактив 3 перед употреблением разводят бидист.водой в 25 раз. 5. Стандартный раствор фосфата готовят как в предыдущем методе.

Ход определения. Пробы, содержащие фосфат в объеме 0,2мл смешивают с 2мл рабочего раствора (также готовят стандартную пробу со стандартным раствором). Через 15 минут измеряют ОП при длине волны 350нм против контроля на реактивы 0,2мл бидист.воды и 2мл реактива. Расчет провести по стандарту.

*Примечание. Для определения фосфора неорганического необходимо использовать посуду, обработанную хромовой смесью, тщательно промытую и ополоснутую бидист. водой. Нельзя применять посуду, обработанную обычными моющими средствами, так как они содержат фосфаты. Все реактивы должны быть приготовлены на бидист.воде.

Определение активности Na,K АТФ-зы в мембранах эритроцитов. (Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д., 1984) Трансмембранный фермент, обеспечивающий гомеостаз калия и натрия. Энергия гидролиза АТФ используется для антипорта ионов натрия (из клетки) и ионов калия (внутрь клетки).

Подготовка мембран эритроцитов (тений). 1мл фракции чистых эритроцитов гемолизировать 10мл 10мМ раствора гистидина, pH 7,4. Центрифугировать 20 минут при 15 000g. Мембраны отмыть отмыть раствором, содержащим 1мМ ЭДТА, 5мМ

трис, 4мМ MgCl₂, рН 7,4 до получения белого осадка в том же режиме центрифугирования.

Инкубационная среда для определения активности АТФ-зы. В мМ: MgCl₂ – 3; АТФ – 2; NaCl – 42; KCl – 5,75; ЭДТА – 0,2; трис – 15, рН 7,0. Доводить HCl.

Ход определения. 0,2мл упакованных теней эритроцитов ввести в 0,6мл инкубационной среды. Инкубировать при 37⁰С в течение 30 минут. Реакцию остановить добавлением 0,4мл 5%-ной ТХУ-кислоты. Отцентрифугировать 750g, 15 минут. Контрольная проба на содержание фосфора в тенях – те же компоненты без инкубирования сразу добавить 0,4мл 5%-ной ТХУ-кислоты и отцентрифугировать. В пробах определить количество фосфора, а в тенях содержание белка по Лоури (для этого упакованные тени можно развести дист. водой, разведение учесть). Активность фермента выразить в мкМ фосфата / мин на мг белка*.

*Примечание. Все реактивы при определении АТФ-ной активности лучше приготовить на бидист.воде. Активность фермента получается завышенной на величину Mg⁺АТФ-зы, так как в инкубационной среде присутствует магний. Чтобы учесть активность магниевой АТФ-зы, необходимо ингибировать Na⁺,K⁺АТФ-зу убаином в концентрации 10⁻⁴ М и величину полученной активности отнять от общей активности. Фосфор можно определить выше описанным методом.

Определение АТФ-ной активности митохондрий. Выделите фракцию митохондрий из ткани печени, сердечной или скелетной мышцы, применяя методику, описанную выше. Полученные фракции ресуспендируйте в среде следующего состава: 0.1М KCl; 0,05М трис-HCl, рН 7,4. Осадок, полученный из 1г ткани печени ресуспендируйте в 0,5мл, а из одного 1г мышц – в 1мл среды. Суспензии митохондрий поместите на лед при температуре 0⁰С. В суспензиях митохондрий определите содержание белка методом Лоури.

Реактивы: 1. Среда инкубации содержит 0,3М KCl, 0,015М трис-HCl, рН 7,4; 2. раствор АТФ 0,025М, рН 7,4 (в буфере); 3. Раствор хлористого магния 0.1М; 4. Раствор ЭДТА 0,1М, рН 7,4; 5. 1М раствор хлорной кислоты; 6. 1%-ный раствор альбумина (для митохондрий из мышц); 7. 4×10⁻⁴М раствор 2,4-динитрофенола (ДНФ), рН 7,4; 8. Реактивы для определения фосфора неорганического; 9. Реактивы для определения общего белка по Лоури.

Ход определения активности АТФ-зы. Разлейте пробы согласно приведенной ниже схеме. Желательно все операции проводить на холоду.

Схема объемного содержания проб

№ пробирки	Ткань выделения	Раствор MgCl ₂ , мл	Раствор ДНФ, мл	Раствор ЭДТА, мл	Раствор альбумина, мл	Вода бидист., мл	Среда инкубации, мл
1.	Печень	0,2	-	-	-	0,6	0,6
2.	Печень	0,2	-	0,2	-	0,4	0,6
3.	Печень (контроль)	0,2	0,2	0,2	-	0,2	0,6
4.	Ск.мышца	0,2	-	-	0,2	0,4	0,6
5.	Ск.мышца	0,2	-	0,2	0,2	0,2	0,6
6.	Ск.мышца (контроль)	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,6
7.	Сер.мышца	0,2	-	-	0,2	0,4	0,6
8.	Сер.мышца	0,2	0,2	-	0,2	0,2	0,6
9.	Сер.мышца (контроль)	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,6

В пробы 3, 6, 9 (контрольные на исходное содержание фосфора неорганического) добавить по 1мл 1М раствора хлорной кислоты. Затем во все пробы (включая и контрольные) добавить по 0,4мл раствора АТФ. Пробы 3, 6, 9

поместить на лед или сразу определить в них содержание фосфора неорганического, используя один из изложенных выше методов. Остальные пробы поместить в термостат при 37°C на 15 минут. После окончания инкубации во все опытные пробы добавить по 1мл 1М раствора хлорной кислоты. Все пробы поместить на лед примерно на 15 минут. Отцентрифугировать при 3000g, 10 минут. Во всех пробах определить содержание фосфора неорганического.

Рассчитайте активность общей АТФ-зы как разницу в содержании фосфора неорганического в опытных пробах и контрольных, отнесенную к времени инкубации и содержанию белка в суспензии митохондрий. Также необходимо учесть разведение суспензии митохондрий.

Определение активности фосфолипазы А в сыворотке крови. (С.А. Тужилин. А.И. Салузья, 1975). Фосфолипаза А, точнее фосфолипаза А₂ – фермент-эстераза, расщепляющий сложнэфирную связь в фосфолипидах по положению 2, с освобождением арахидоной кислоты. Арахидоновая кислота затем превращается через ряд других ферментативных реакций в биологически активные соединения: простагландины, тромбоксаны, лейкотриены, эпоксиды и др. При отщеплении арахидоновой кислоты от фосфолипидов образуются фосфолизины и увеличивается проницаемость мембраны, поэтому имеет значение определение активности фосфолипазы А₂ в мембранах клеток. В момент значительного повреждения мембран фермент может вымываться из них и поступать в плазму крови. Кроме того, в плазме крови может обнаруживаться панкреатический фермент, расщепляющий фосфолипиды пищи.

Реактивы: 1. 0,1Н NaOH; 2. трис-NaCl буфер 50ммМ, рН 8,0. Концентрация NaCl – 148ммМ; 3. Яичный желток; 4. 1%-ный трипсин (для превращения профермента в активный фермент); 5. 6ммМ дезоксихолат натрия; 6. 60ммМ хлористый кальций.

Подготовка субстрата. 1. Яичный желток эмульгировать в 75мл трис-NaCl буфере (основной раствор). Рабочий раствор субстрата готовится непосредственно перед определением активности фермента: 10мл основного раствора смешать с 30мл 6ммМ раствора дезоксихолата натрия.

Ход определения. Сыворотку или панкреатический сок предварительно инкубировать 15 минут при 60°C для ингибирования липазы. Затем к 1мл исследуемой жидкости добавить 1мл 1%-ного раствора трипсина и выдержать 1 час при температуре 0°C. К 1мл данной смеси прилить 2мл рабочего раствора субстрата и инкубировать 1 час при температуре 37°C для развития ферментативной реакции. Реакцию остановить добавлением 1мл раствора хлористого кальция и титровать 0,1Н NaOH в присутствии фенолфталеина. Одновременно ставят холостую пробу: 2мл рабочего раствора субстрата + 1мл раствора хлористого кальция + 1мл сыворотки (панкреатического сока) титруют 0,1Н NaOH также, как и опытные.

Расчет: (V (мл) опыт – V (мл) холост.) x 2 = ед. активности фосфолипазы А₂.

3.3. Гистохимическое определение лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ), АТФ-азы (Писарева Е.В.)

Устройство и принцип работы микротом-криостата.

Материалы и оборудование: микротом-криостат, предметные и покровные стекла, ножи, держатели для ткани, скальпель, кисточка, лоток для срезов, планшетка для предметных стёкол, скелетная мышца крысы, паспорт на микротом-криостат, инструкция о правилах и порядке работы на микротом-криостате.

Основные этапы работы на криостате и правила приготовления гистохимических срезов

1. Установите на столик микротомом и закрепите его винтами и шайбами.
2. Внесите столик с микротомом в камеру, установите его на стойки и закрепите винтами.
3. Ребристый патрон датчика-реле установите в боковых пазах кронштейна.
4. В верхних пазах кронштейна установите термометр.
5. Подсоедините к штуцеру узла подачи углекислоты хвостик трубопровода.
6. Установите на микротом лоток.
7. Контейнер с объектодержателем и коробку с влагопоглотителем (защитная пленка должна быть снята), внесите в камеру и расположите с левой стороны. Контейнер подвесьте на трубе испарителя.
8. Подключите микротом-криостат к электрической сети. Люки для рук плотно закройте диафрагмами.
9. Установите на шкале датчика-реле температур (поворачивая маховичок датчика) температурный режим -25°C (температурный режим ниже -25°C устанавливать не рекомендуется, т.к. это может повлечь за собой выход из строя холодильного агрегата) и, нажатием на клавишу пульта управления, включите холодильный агрегат.
10. Проверьте работу освещения камеры.
11. После опробования работы холодильной системы и освещения можете приступить к работе на микротоме аппарата.
12. Микрогайку микротом установите в крайнее верхнее положение.
13. Лимб микротом установите в положение соответствующе для получения необходимой толщины срезов.
14. Подготовьте объектодержатели, которые будут использованы в работе, для примораживания объектов и установите их в контейнер, подвешенный на трубке испарителя.
15. Внесите в камеру (через люки для рук) все необходимые приспособления для получения срезов (кисточки, предметные стекла и др.).
16. Люки для рук плотно закройте диафрагмами.
17. Установите на датчике-реле температуры необходимый температурный режим и проследите за достижением заданной температуры воздуха в камере аппарата.
18. Кусочки ткани, подлежащие резанию на микротоме, приморозьте к объектодержателям (*Внимание!!! В зависимости от размера кусочка выбирайте объектодержатель с малой или большой площадью. Для удобства приготовления срезов лучше брать кусочки небольшого размера 5-7 мм.*)
19. Объектодержатель с исследуемой тканью установите на рычаге микротом.
20. Внесите в камеру нож, установите его в ножедержателе и зафиксируйте замком.
21. На свободный конец ножа оденьте защитную оправу и закрепите её.
22. Установленный на рычаге объектодержатель приблизьте к ножу так, чтобы кусочек ткани касался ножа, и зафиксируйте замком. Можно приступить к резанию ткани. Перед производством среза охлаждайте нож. *Внимание!!! Движения ножа должны быть плавными и быстрыми, чтобы получаемые срезы были одинаковой толщины и не крошились. В противном случае срезы будут некачественными (рваными, складчатыми, разной толщины), что негативно повлияет на процесс дальнейшего окрашивания, микроскопии и анализа полученных данных.*

23. Нанесите срез на охлажденное предметное стекло и расправьте охлажденной кисточкой. Для оттаивания среза прижмите палец к нижней стороне предметного стекла.

24. В случае применения углекислоты для охлаждения ножа, подсоедините баллон с углекислотой с помощью гибкого шланга к штуцеру, расположенному на правой боковой стенке камеры. Закройте кран узла подачи углекислоты на нож и приоткройте вентиль баллона.

25. После окончания работы снимите нож и вынесите его из камеры, закройте вентиль баллона с углекислотой, вынесите из камеры использованные объектодержатели и лоток с неиспользованными срезами.

Гистохимическое определение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ)

Принцип метода: Дегидрогеназы (ЛДГ и СДГ), катализируя окислительно-восстановительные реакции, отщепляют от субстрата H^+ , акцептором которого являются соли тетразолия (краситель нитро-СТ). Они превращаются в водонерастворимый окрашенный формазан, маркирующий места активности фермента.

Материалы и оборудование: микротом-криостат, воздушный термостат на $37^{\circ}C$, предметные и покровные стекла, ножи, держатели для ткани, скальпель, кисточка, лоток для срезов, планшетка для предметных стёкол, мышечная ткань крысы, световой микроскоп, реактивы.

Реактивы:

А) для ЛДГ:

1. $NAД^+$;
2. $NaOH$ (0,2M);
3. Молочная кислота (0,2M) – (4,5мл 40 % -ной к-ты довести дист. водой до 10 мл, раствор должен быть коричневатым!!!);
4. Фенолфталеин (1%-ный спиртовой раствор);
5. К-Na фосфатный буфер (0,2M, pH 7,2);
6. Нитросиний тетразолий (2,5мг/мл);
7. Глицерин-желатина;

Б) для СДГ:

1. Сукцинат Na (0,2M)
2. Формалин (10%-ный раствор)
3. К-Na фосфатный буфер (0,2M, pH 7,6)
4. Нитросиний тетразолий (1мг/мл)
5. Глицерин-желатина

Состав инкубационной среды(для ЛДГ): 6мг $NAД^+$; H_2O дистил. 0,5мл; К-Na фосфатного буфера (0,2M, pH 7,2) 0,4мл; нитросиний тетразолий 0,4мл; 0,5мл субстрата (лактат Na).

Состав инкубационной среды(для СДГ): 3мл К-Na фосфатного буфера (0,2M, pH 7,6), 3мл сукцината Na (0,2M), 6мл нитросиний тетразолий (1мг/мл).

Приготовление глицерин-желатины: К 41мл H_2O дистиллированной добавить 7г мелко нарезанной пищевой желатины и оставить набухать 3 часа. Затем добавить 50мл глицерина и 1г фенола, нагревать на плитке в течение 10-15 минут, постепенно помешивая, после чего профильтровать через вату. Хранить в термостате при $37^{\circ}C$, иначе быстро застывает. Застывшую глицерин-желатину растапливают в термостате при $60^{\circ}C$ (водяную баню лучше не использовать, так как при этом образуются пузырьки воздуха, которые мешают при микроскопировании препарата).

Приготовление лактата Na : К 0,2M $NaOH$ добавить 2 капли фенолфталеина и титровать по каплям 0,2M молочной кислотой до исчезновения розовой окраски (раствор должен быть светло-коричневым или прозрачным).

Ход работы.

1. Приготовить криостатные срезы толщиной 10-12мкм и подсушить их на воздухе.
2. Пипеткой нанести на срезы инкубационную смесь и инкубировать в термостате при 37°C от 10 - 30мин в зависимости от ткани.
3. Слить инкубационную среду, ополоснуть в буферном растворе.
4. Поместить на 10 мин в 10%-ный формалин.
5. Ополоснуть в буферном растворе.
6. Поместить на 5мин. в дистиллированную воду.
7. ЗаклЮчить в глицерин-желатину.

Результат: Места активности фермента маркируются кристаллами формазана тёмно-фиолетового цвета, красно-фиолетовый цвет зёрен на таком же фоне – артефакт, сплошное окрашивание препарата (отсутствие зёрен) – тоже артефакт.

Гистохимическое определение АТФ-азы

Принцип метода: высвобождающаяся под действием фермента фосфорнаф кислоты сначала осаждается находящимися в инкубационной среде ионами металла, затем образовавшаяся соль металла переводится в бурый осадок сульфида металла.

Материалы и оборудование: микротом-криостат, воздушный термостат на 37°C, предметные и покровные стекла, ножи, держатели для ткани, скальпель, кисточка, лоток для срезов, планшетка для предметных стёкол, мышечная ткань крысы, световой микроскоп.

Реактивы:

1. АТФ (натриевая соль)
2. Формалин (10%-ный раствор)
3. Трис-малеатный буфер (0,2М; рН 7,2)
6. Нитросиний тетразолий (1мг/мл)
7. MgSO₄ (0,1М)
8. Pb(NO₃)₂ (2%-ный раствор)
9. Глицерин-желатина

Состав инкубационной среды: Н₂О дист. 10мл; 12мг АТФ; 60мл трис-малеатного буфера (0,2М); 2,5 мл MgS (0,1М), 20мг Pb(NO₃)₂.

Приготовление глицерин-желатины: см. выше.

Ход работы:

1. Кусочки ткани предварительно фиксировать в 10% нейтральном формалине не больше суток в холодильнике.
2. Промыть проточной водой 30 мин.
3. Приготовить криостатные срезы толщиной 10-12 мкм и подсушить их на воздухе.
4. Пипеткой нанести на срезы инкубационную смесь и инкубировать 1 час в термостате при 37° С.
5. Слить инкубационную среду, быстро промыть в нескольких порциях дистиллированной воды.
6. Поместить в 0,5-1%-ный раствор сульфида аммония или сульфида натрия на 30 сек – 1 мин.
7. Промыть проточной водой.
8. ЗаклЮчить в глицерин-желатину.

Результат: осадок сульфида свинца маркирует места ферментативной активности.

РАЗДЕЛ 4. УГЛЕВОДЫ

Углеводы – производные многоатомных спиртов, имеющих в своем составе альдегидную или кетонную группу. По возможности гидролитического расщепления углеводы делят на моносахариды (гидролизу не подвергаются), олигосахариды (при гидролизе дают несколько моносахаридов) и полисахариды – гидролизуются с образованием множества моносахаридов.

Моносахариды представляют собой легкорастворимые в воде белые кристаллические соединения, имеющие сладкий вкус. Моносахариды делятся на альдозы и кетозы в зависимости от присутствия альдегидной или кетонной группы и на триозы, тетрозы, пентозы, гексозы и т.д. в зависимости от количества атомов углерода в составе молекулы. В клетке моносахариды выполняют функции энергоемких соединений, необходимы для синтеза нуклеотидов и других органических веществ. За счет наличия альдегидной или кетонной группы моносахариды достаточно реакционно способны, поэтому становятся возможными реакции гликирования (гликозилирования) – присоединения глюкозы по свободным аминогруппам белков. Реакции осуществляются как ферментативным, так и химическим путем.

Ди- олиго- и полисахариды синтезируются как с целью запаса энергоемких соединений, так и с другими целями: структурной, контактной (формируют антигенные структуры). Олигосахариды широко распространены, встречаются в животных, растительных и прокариотических клетках. Ряд олигосахаридов могут иметь специфические функции: например, олигосахариды молока, играющие важную роль в иммунных реакциях. Олигосахариды классифицируют по количеству моносахаридных звеньев, входящих в их состав, одинаковости и различию моносахаридных остатков, линейности или разветвленности их молекул. По мере увеличения количества моносахаридных звеньев в молекулах олигосахаридов они становятся менее растворимыми и теряют сладкий вкус.

Полисахариды в основном плохо растворимы в воде и, в связи с этим, не имеют вкуса. Обычно их называют гликанами. Они могут характеризоваться наличием одинаковых моносахаридных звеньев – гомополисахариды и состоят из различных остатков моносахаридов – гетеросахариды. Полисахариды синтезируются большинством организмов, они выполняют опорные, резервные и контактные функции.

4.1. Методы определения глюкозы в биологических жидкостях

Глюкоза и другие моносахариды в чистом виде встречаются только вне клеток. Внутри клеток все сахара находятся в фосфорилированном виде. Поэтому уровень свободной глюкозы обычно определяют в плазме или сыворотке крови, слюне, моче, межклеточной жидкости, но не в клетках. Применяют несколько различных принципов определения, из них в настоящее время наиболее распространен колориметрический глюкозоксидазный метод (фотоглюкоза).

1. Редуктометрические. Принцип основан на химическом свойстве сахаров восстанавливать соли тяжелых металлов в щелочной среде. Наибольшее распространение получил метод Хагедорна-Йенсена.

2. Рефрактометрические. Глюкоза и другие сахара изменяют коэффициент преломления света. Используется любой рефрактометр, строится калибровочный график значений коэффициента преломления для растворов глюкозы известных концентраций, который затем применяют для нахождения неизвестной концентрации в той или иной биологической жидкости.

3. Колориметрические. Из колориметрических методов применялся ортотолуидиновый метод, но он связан с использованием едких и вредных для здоровья реактивов. В настоящее время используется глюкозоксидазный метод, стандартные наборы для выполнения этого метода можно приобрести.

Определение глюкозы в крови глюкозоксидазным методом

Принцип метода. Метод основан на реакции, катализируемой ферментом глюкозоксидазой:



Образовавшаяся перекись водорода, выход которой пропорционален содержанию глюкозы, в присутствии пероксидазы из хрена окисляет ряд субстратов с образованием окрашенных в розовый цвет продуктов. Интенсивность окраски измеряется фотометрически.

Реактивы: 1. Ферментная смесь кристаллической глюкозоксидазы (3 тыс. единиц) и пероксидазы хрена (4 тыс. единиц). При использовании готовых наборов таблетированная ферментная смесь растворяется в 5мл дист. воды. 2. Антикоагуляционный раствор: 0,9%-ный хлористый натрий, содержащий 0,038% цитрата натрия. Либо две таблетки из набора растворяют в 200мл дист. воды. 3. Буферно-субстратная смесь: фосфатный буфер 0,05М, содержащий субстраты пероксидазы, рН 7,0. Две таблетки буферно-субстратной смеси растворяют в 200мл дист. воды при непрерывном перемешивании. 4. Рабочий реактив: 0,5мл ферментного раствора и 20мл буферно-субстратной смеси (1:40). Готовится перед употреблением. Может храниться при температуре 8-10°C в течение двух недель в темной посуде. 5. Стандартный раствор глюкозы, 10мМ. Водный раствор готовится перед употреблением, в 0,1%-ной бензойной кислоте он может храниться один месяц при 8-10°C.

Ход определения. Разлейте в пробирки по 0,9мл антикоагуляционного раствора. Количество пробирок: $n + 1$, где n – количество опытных проб крови. В опытные добавьте по 0,1мл крови или сыворотки крови (или плазмы), в оставшуюся пробирку добавьте 0,1мл стандартного раствора глюкозы (10мМ) (стандартная проба). Центрифугируйте опытные пробы в режиме 600g, 10 минут. Расставьте второй ряд чистых пробирок $n+2$ и разлейте в него по 2,5мл рабочего реактива. Перенесите из каждой опытной пробы по 0,25мл центрифугата (надосадочной жидкости) в пробирку с рабочим реактивом. В оставшиеся две пробирки: в первую добавьте 0,25мл из стандартной пробы, а во вторую 0,25мл дист. воды (холостая проба). Оставьте все пробы на 25 минут в темном месте. Прокolorиметрируйте на длине волны 500nm, кювета 0,5см против холостой пробы.

Расчет (по стандарту):

$$X \text{ глюкозы, мМ/л} = E_{\text{оп}} / E_{\text{ст}} \times 10 \text{ (содержание глюкозы в стандарте)}$$

Задание для самостоятельной работы студентов: Определите содержание глюкозы в цельной крови и плазме (сыворотке) одних и тех же проб крови. Сравните полученные результаты и объясните полученную разницу.

Определение глюкозы и гликогена с антроном

Принцип метода. Производные углеводов типа фурфуролов, образующиеся при нагревании глюкозы с концентрированной серной кислотой, дают с антроном

окрашенные соединения. По интенсивности окраски судят о их количестве. Чувствительность метода составляет от 10 до 100мкг в пробе.

Реактивы: 1. Антрон, 0,2%-ный раствор, приготовленный на 95%-ной серной кислоте. Раствор готовят перед употреблением и ставят на лед. 2. Глюкоза, стандартный раствор, 0,004% раствор в 0,1%-ной бензойной кислоте (1мл содержит 40мкг глюкозы). 3. КОН, 30%-ный раствор; 4. 96%-ный этиловый спирт.

Определение глюкозы. В широкие пробирки, стоящие на льду, поместить по 2,5мл исследуемых растворов, прилить при встряхивании по 5мл свежеприготовленного раствора антрона. Пробы тщательно перемешать и поместить в водяную баню при 90°C на 10 минут. Пробы охладить, при этом разливается зеленая со слабым синеватым оттенком окраска. Фотометрировать при длине волны 620нм (окраска стабильна при комнатной температуре в течение нескольких часов). Одновременно с опытными ставят контрольную и стандартную пробы. В контрольную (фоновую) добавить вместо исследуемой жидкости дист.воду, а в стандартную раствор глюкозы.

Расчет (по стандарту), мкг/мл = $(E_{оп.} / E_{ст.}) \times 40$ (содержание глюкозы в стандартном растворе, мкг/мл).

Определение гликогена. Предварительно пробы обрабатывают щелочью для разрушения моносахаридов. Если гликогена много (печень, мышцы), применяют «прямой» метод определения прямо из щелочного раствора, если мало – «непрямой» метод, включающий предварительное осаждение гликогена из раствора спиртом.

«Прямой» метод. В пробирки, содержащие 25-100мг ткани или 1мл гомогената добавить по 3мл 30%-ного раствора КОН. Закрывать пробками и поместить в кипящую водяную баню на 20 минут. Затем охладить до комнатной температуры, количественно перенести содержимое пробирок в мерные колбочки на 25-50мл (в зависимости от содержания гликогена в пробах) и объем довести дист.водой до метки. В чистые пробирки отобрать по 2,5мл, пробирки поместить на лед, добавить при встряхивании 5мл раствора антрона, тщательно перемешать, погрузить в водяную баню при 90°C, охладить и фотометрировать при длине волны 620нм. Параллельно ставят фоновую и стандартную пробы. При расчете по стандарту полученный результат умножить на 0,9, так как М.М. остатка глюкозы в гликогене 162, а М.М. глюкозы – 180 (162:180 = 0,9).

Расчет (по стандарту), мкг/мл = $(E_{оп.} / E_{ст.}) \times 40 \times 0,9$

«Непрямой» метод. В центрифужную пробирку поместить 25-100мг ткани или 1мл гомогената или безбелкового фильтрата, добавить 3мл 30%-ного КОН и нагреть в кипящей водяной бане в течение 20 минут. Затем пробы охладить, добавить 4мл этилового спирта, хорошо перемешать стеклянной палочкой и поместить в кипящую водяную баню. Когда спирт закипит, пробы вынуть и охладить. Осадок гликогена отделить центрифугированием в режиме 750g, 15 минут. Надосадочную жидкость осторожно слить, осадок гликогена растворить в 1мл дист.воды и снова осадить равным объемом спирта, доведя до кипения в кипящей водяной бане. Охладить и осадок гликогена отделить центрифугированием в течение 15 минут при 3000 об/мин. Осадок, растворить в 1мл дист.воды и снова осадить равным объемом спирта, нагревая пробу до кипения в кипящей водяной бане. Осадок отделить центрифугированием, подсушить на воздухе, растворить в 2,5мл дист. воды и провести определение так, как описано в «прямом» методе, начиная с соответствующего объема. Расчет проводят также.

Выделение гликогена из биологического материала

Выделение гликогена из печени крысы проводят экстрагированием 3%-ным раствором трихлоруксусной кислоты и последующим осаждением этиловым спиртом. Также выделение гликогена можно провести с помощью 30%-ного раствора КОН.

- Реактивы: 1. Трихлоруксусная кислота, 3%-ный раствор;
2. Этиловый спирт, 96%-ный.

Ход выделения. Печень тщательно растереть в ступке с 1,5 объемом 3%-ного раствора ТХУ-кислоты и небольшим количеством хорошо промытого и высушенного песка. Полученный гомогенат центрифугировать при 3000 об/мин в течение 20 минут. Если в ткани печени содержится много гликогена, надосадочная жидкость приобретает молочный вид. Её слить в стакан, а осадок снова растереть с равным объемом 3%-ной ТХУ-кислоты, центрифугировать и супернатант объединить с первым. Если первый супернатант имеет только опалесцирующий вид (гликогена мало), вторую экстракцию проводить не нужно.

К полученному экстракту гликогена прилить равный объем 96%-ного этилового спирта и тщательно перемешать. Осадок гликогена получить центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 минут. В осадок добавить 2-3 объема бидистиллированной воды. К полученной суспензии прилить равный объем этилового спирта, перемешать и снова центрифугировать. Обработку бидист.водой провести 3-4 раза, после чего два раза промыть осадок гликогена 96%-ным этанолом и высушить в эксикаторе над свежепрокаленным хлористым кальцием.

4.2. Методы определения карбоновых кислот в биологическом материале

Спектрофотометрическое определение α -кетокислот

Принцип метода. Метод основан на реакции α -кетокислот с семикарбазидом в слабокислом растворе, при этом образующиеся семикарбазоны определяют спектрофотометрически.

Реактивы: 1. 0,2М ацетатный буфер, рН 4,5, содержащий 0,1М солянокислого семикарбазиды (раствор готовится перед употреблением);

2. Стандартный раствор α -кетокислоты, содержащий от 50 до 200 мкг в 1мл, готовится на 0,1Н серной кислоте. Раствор стоек (в холодильнике).

Ход определения. В пробирки разлить по 2,9мл семикарбазидного раствора, реакцию начинают добавлением 0,1мл раствора α -кетокислоты. Через 5 минут проводят измерение при определенной (для каждой кислоты) длине волны. В качестве фонового раствора используют ацетат-семикарбазидный раствор (3мл).

Длины волн и коэффициенты молярной экстинкции соответствующих семикарбазонов указаны в таблице:

α -кетокислота	Молярный коэффициент	Длина волны, нм
Пировиноградная	$10,2 \times 10^3$	246-248
Альфа-кетоглутаровая	$10,0 \times 10^3$	247-248
Глиоксилевая	$12,4 \times 10^3$	252-253

Задание для самостоятельной работы студентов. Проведите определение различных карбоновых кетокислот в растворимой части гомогенатов животных и растительных тканей. Перед определением необходимо провести удаление

полимерных соединений, главным образом, растворимых белков и пигментов. Для правильного выполнения задания можно воспользоваться услугами интернета.

Определение содержания молочной кислоты Колориметрический метод с *p*-оксиdifенилом

Принцип метода. При нагревании молочной кислоты в присутствии минеральных кислот образуется ацетальдегид, дающий фиолетово окрашенный продукт в реакции с *p*-оксиdifенилом и серной кислотой.

Реактивы:

1. Стандартный раствор молочнокислого кальция или лития, 0,25мМ раствор
2. *p*-Оксиdifенил, 1,5%-ный раствор в 0,5%-ном NaOH. Навеску *p*-оксиdifенила 75мг поместить в коническую пробирку и растворить в 0,5%-ном NaOH, добавить 4,5мл прокипяченной теплой дист.воды. Раствор может храниться в темной посуде при комнатной температуре.
3. H₂SO₄ (х.ч.), удельный вес 1,84
4. CuSO₄×5H₂O, 20%-ный и 4%-ный раствор
5. СаО в порошке
6. Трихлоруксусная кислота, 5%-ный раствор

Ход определения. Для определения используется безбелковые экстракты тканей. Белки удаляют добавлением 5%-ного раствора ТХУ-ной кислоты в соотношении 1:2 (одна часть гомогената ткани 1:9 и две части ТХУ). После добавления ТХУ-ной кислоты гомогенаты центрифугируют или фильтруют до получения прозрачной жидкости.

В центрифужные пробирки внести 2-3мл безбелкового супернатанта (фильтрата) и добавить по 0,5мл 20%-ного раствора медного купороса для удаления углевода. Довести объем до 5мл дист.водой, добавить 0,5г СаО и тщательно перемешать. Оставить пробы на полчаса, затем отцентрифугировать 600g, 10 минут. Параллельно опытными ставят пробы со стандартными растворами, содержащими различные концентрации молочной кислоты (от 0,03 до 0,2мкМ). Стандартные пробы обрабатываются также как опытные.

В чистые сухие пробирки отобрать по 0,5мл прозрачного центрифугата и поместить в ледяную воду, добавить 1 каплю 4%-ного раствора медного купороса для уменьшения окислительного потенциала. Медленно, при постоянном помешивании добавить по 3мл концентрированной серной кислоты. Пробирки поместить в кипящую водяную баню на 5 минут (при этом происходит реакция превращения молочной кислоты в ацетальдегид), охладить до 20⁰С холодной водой. В каждую пробирку добавить по 0,05мл щелочного раствора *p*-оксиdifенила, осторожно перемешать, поставить в водяной термостат с температурой 30⁰С на 30 минут. Через 30 минут поместить пробирки в кипящую водяную баню точно на 90 секунд (1,5 минуты). Затем пробирки охладить до комнатной температуры и фотометрировать. Длина волны 574нм, толщина кюветы подбирается по интенсивности окраски (однако для всех проб она должна быть одинаковой!). По результатам измерения оптической плотности стандартных проб построить калибровочный график. Содержание в опытных пробах найти по калибровочному графику.

Энзиматический метод с применением фермента лактатдегидрогеназы

Принцип метода. При ферментативном окислении молочной кислоты в пировиноградную происходит одновременное восстановление НАД⁺ в НАДН, количество которого измеряется по возрастанию оптической плотности на длине волны 340нм (тест Варбурга).

Равновесие в реакции обычно сдвинуто в сторону образования молочной кислоты и НАД⁺, поэтому пировиноградную кислоту необходимо убирать из реакционной смеси связыванием гидразином или семикарбазидом и использовать щелочную среду, ускоряющей прямую реакцию.

Реактивы: 1. 0,1М Глицин-гидразиновый буфер, pH 9,0; 2. НАД⁺, 0,03М, pH 6,0; 3. 0,1М Калий-фосфатный буфер, pH 7,4; 4. Лактатдегидрогеназа. 2мг/мл или возможно применение мышечного экстракта 1:25 как источника фермента. Держать на холоду. 5. Раствор хлорной кислоты (HClO₄), 0,5Н раствор; 6. NAOH, 2Н раствор; 7. HCl, 2Н раствор; 8. KOH, 5Н раствор; 9. HClO₄, 0,5Н раствор; 10. Стандартный раствор молочнокислого кальция или лития, 0,1ммМ.

Приготовление глицин-гидразинового буфера. Навески глицина и гидразина растворяют в небольшом количестве дист. воды, pH доводят 2Н раствором NAOH на pH-метре. Затем раствор доводят до расчетного объема.

Получение экстракта мышц. Среда выделения: калий фосфатный буфер, 0,05М, pH 7,6. Свежие мышцы задних конечностей крысы поместить в стакан с охлажденной средой выделения на 10 минут. Затем обсушить на фильтровальной бумаге и сделать навеску 3-5г. Предварительно измельчают на холоду и добавляют по 5мл среды выделения на каждый 1г ткани. Гомогенизируют в течение 1-2 минут. Полученный гомогенат центрифугируют 10 минут при 12000-15000g и температуре 4°C. Супернатант свободный от ядер, митохондрий, обломков клеток, фильтровать через четыре слоя марли. Для определения молочной кислоты используют гомогенат в разведении 1:25 0,1М калий-фосфатным буфером, pH 7,4. Экстракт можно долго хранить в замороженном виде: разлить по 1мл и заморозить. При определении содержания молочной кислоты в биологическом материале используется свежая ткань, навеску растирают в ступке с добавлением 5-ти кратного объема охлажденного раствора 0,5М HClO₄. Экстракцию провести на холоду в течение 30 минут. Белки удаляются центрифугированием. Полученный центрифугат нейтрализуют 5Н KOH (разведение учитывается) и оставляют на льду не менее, чем на 1 час, можно до следующего дня. Осадок перхлората удалить центрифугированием.

Для проверки работы метода используется готовый раствор молочнокислого лития или кальция (стандартная проба)

Ход определения. Опытные и контрольные пробирки, а также пробирку, содержащую готовый раствор молочнокислого кальция или лития, заполняют согласно ниже приведенной схеме.

Схема заполнения проб для определения молочной кислоты

Состав проб	Объем, мл	
	контрольная	Опытная или стандартная
1. Глицин-гидразиновый буфер	2,6	2,6
2. Раствор НАД ⁺	0,2	0,2
3. Дист. вода	0,1	-
4. Исследуемая жидкость (нейтрализованная центрифугат или раствор молочнокислого кальция или лития)	-	0,1
5. Раствор фермента или мышечный экстракт	0,1	0,1

Содержимое пробирок тщательно перемешивают и помещают в термостат (или оставляют при комнатной температуре) 25°C на 60 минут. Затем пробы фотометрируют, обнуляя прибор по оптической плотности контрольной пробы.

Количество молочной кислоты в пробах можно рассчитать с использованием молярного коэффициента экстинкции, учитывая все разведения опытной пробы или по стандарту (содержанию молочной кислоты в стандартной пробе с солью молочной кислоты).

Формула расчета с использованием молярного коэффициента:

$$X \text{ мМ/г ткани} = \Delta E_{340} \times P \times V_1 / V_2 \times 6,22$$

P – разведение гомогената (начиная с навески); V₁ – объем пробы в кювете; V₂ – объем исследуемой жидкости; 6,22 – коэффициент экстинкции, мМ.

В данном случае можно рассчитать только содержание молочнокислых солей в нейтрализованном гомогенате, а затем, умножив на разведение, уже определить содержание молочной кислоты на грамм навески ткани.

$$X \text{ мМ/мл} = \Delta E \text{ оп.} \times C / \Delta E \text{ ст.}$$

C – концентрация молочнокислой соли в стандартной пробе (0,1мкМ).

Энзиматический метод определения содержания пировиноградной кислоты

Принцип метода. При энзиматическом восстановлении пировиноградной кислоты в молочную происходит превращение НАДН в НАД⁺, количество которого регистрируют по падению ОП на длине волны 340нм (тест Варбурга).

Реактивы: 1. Калий-фосфатный буфер, 0,1М, рН 7,4; 2. НАДН, 0,3мМ раствор в буфере; 3. Стандартный раствор пировинограднокислого натрия, 0,1мМ; 4. HClO₄, 0,5Н раствор; 5. КОН, 5Н раствор.

При определении содержания пировиноградной кислоты в биологическом материале используется свежая ткань, навеску растирают в ступке с добавлением 5-ти кратного объема охлажденного раствора 0,5М HClO₄. Экстракцию провести на холоду в течение 30 минут. Белки удаляются центрифугированием. Полученный центрифугат нейтрализуют 5Н КОН (разведение учитывается) и оставляют на льду не менее, чем на 1 час, можно до следующего дня. Осадок перхлората удалить центрифугированием.

Для проверки работы метода используется готовый раствор пировинограднокислого натрия (стандартная проба).

Расчет содержания пировиноградной кислоты производится как и в предыдущем случае с использованием либо коэффициента молярной экстинкции, либо по стандарту.

Схема заполнения проб для определения пировиноградной кислоты

Состав проб	Объем, мл	
	контрольная	Опытная или стандартная
1. Калий-фосфатный буфер	3,0	2,8
2. Раствор НАДН	-	0,1
4. Исследуемая жидкость (нейтрализованный центрифугат или раствор пировинограднокислого натрия)	-	0,1
5. Раствор фермента или мышечный экстракт	0,1	0,1

Примечание. Контрольная проба служит как фоновая для настройки щели спектрофотометра.

4.3. Методы изучения углеводсодержащих белков

Гликопротеиды – обширная группа белков, имеющая разнообразные функции в организмах. Гликопротеиды представляют собой рецепторные белки, принимают участие в формировании гликокаликса животных клеток, свертывании крови и многих других процессах. Выделяют две группы:

1. Собственно гликопротеиды. Характеризуются прочной связью с аминсахаридами, не содержащими урановых кислот и сульфатов. В состав аминсахаров входят гексозы, гексозамины, фукозы и сиаловые кислоты. Имеют слабо выраженные кислотные свойства. К гликопротеидам относятся ферменты – холинэстераза, церулоплазмин; гормоны – гонадотропин, эритропоэтин; белки плазмы крови – протромбин, фибриноген, гамма-глобулины, гаптоглобин, трансферрин. Отдельно выделяют группу серомукоидов: гликопротеинов, растворимых в хлорной кислоте.

2. Мукопротеиды. В состав мукопротеидов входят аминополисахариды – глюкозаминогликаны, которые состоят из аминсахаров, гексозурановых и серных кислот. Имеют сильно выраженные кислотные свойства за счет большого количества карбоксильных групп и остатков серной кислоты. Типичные представители: гиалурановые, хондроитинсульфаты, кератосульфаты, гепарин, гепариносульфат и сульфогиалурановая кислота. Связь с белками углеводного остатка не является прочной. Основные функции – входят в состав мембран (гликокаликс) и экстрацеллюлярного матрикса, служат регуляторами мембранной проницаемости.

Определение общего количества гликопротеидов в сыворотке крови с использованием триптофана

Принцип метода. Гликопротеиды сыворотки крови при нагревании с концентрированной серной кислотой подвергаются гидролитическому расщеплению, продукты которого в присутствии триптофана дают окрашенные в фиолетовый цвет соединения. Реакция проводится при участии борной кислоты, которая увеличивает интенсивность окраски и подавляет побочные окрашивания.

Реактивы: 1. Абсолютный этиловый спирт; 2. Борно-серный реактив, состоящий из 77мл конц. серной кислоты, 23мл дист. воды и 5г борной кислоты; 3. Раствор триптофана: 1г триптофана растворить в 100мл дист. воды. Лучше использовать L-триптофан, так как он лучше растворим в воде; 4. Стандартный раствор маннозы, 0,1г /100 мл дист. воды (0,1%-ный раствор). Готовится перед употреблением.

Ход определения. *Осаждение гликопротеидов.* В пробирки поместить по 0,05мл образцов исследуемых сывороток, добавить в каждую по 10мл абсолютного спирта, содержимое взболтать. Пробы оставить при комнатной температуре на 15 минут. Центрифугировать в режиме 2500об/мин (600g) в течение 10 минут. Спирт удалить осторожным отсасыванием, стараясь не потерять ни частицы осадка.

Гидролиз и цветная реакция. Полученный осадок растворить в 1мл дист. воды и прилить 7мл борно-серного реактива, пробирки сразу же поместить в ледяную воду или охладить холодной проточной водой. Параллельно ставят контрольную пробу: 1мл дист. воды + 7мл борно-серного реактива, которую обрабатывают также, как опытные. Через 5 минут в пробы прибавить 1мл раствора триптофана. Чтобы избежать появления побочного желтого окрашивания жидкости сразу же перемешать пипеткой. Пробирки еще раз охладить. Затем поместить в кипящую водяную баню на 20 минут, причем через 10 минут пробы снова необходимо перемешать пипеткой. После извлечения пробирок из бани их нужно

снова охладить в течение 5 минут, а затем оставить при комнатной температуре на 30 минут.

Фотометрирование. Оптическую плотность измерить при длине волны 520нм, ширина кюветы 0,5см.

Построение калибровочного графика. 2мл 0,1%-ного раствора маннозы довести водой до объема 20мл. 10мл полученного рабочего раствора маннозы содержит 1000мкг маннозы, то есть 100мкг/мл. Необходимо приготовить серию разведений рабочего раствора, содержащих 10, 20, 40, 60мкг/мл.

К 1мл каждого из разведений и неразведенного рабочего раствора (100мкг/мл) добавить 7мл борно-серного реактива. Пробы охладить проточной водой. Через 5 минут прибавить 1мл раствора триптофана, перемешать пипеткой и охладить проточной водой. Пробирки поместить в кипящую водяную баню на 20 минут, причем через 10 минут еще раз перемешать пипеткой. Вынув пробирки из бани, их необходимо охладить и через 30 минут колориметрировать, длина волны 520нм, кювета 0,5см. По калибровочному графику нужно найти коэффициент экстинкции.

Поскольку для определения используют 0,05мл сыворотки, а концентрацию гликопротеидов выражают в мг%, в формулу подставляют в числитель 2000, а в знаменатель 1000 (перевод мкг в мг и расчет на 100мл), окончательный вариант формулы расчета выглядит следующим образом:

$$X \text{ мг\%} = E_{\text{оп}} - E_{\text{конх}} \cdot 2 / K, \text{ где}$$

K – коэффициент экстинкции, найденный по калибровочному графику.

Определение количества серомукоидов в сыворотке крови

Принцип метода. При добавлении к сыворотке крови раствора хлорной кислоты белки выпадают в осадок, а серомукоиды остаются в растворе, из которого они могут быть осаждены фосфовольфрамовой кислотой. По степени помутнения раствора при вторичном осаждении судят о содержании серомукоидов.

Реактивы: 1. 0,85%-ный раствор хлористого натрия; 2. 1,8М раствор хлорной кислоты; 3. 5%-ный раствор фосфовольфрамовой кислоты, приготовленный на 2Н соляной кислоте.

Ход определения. 0,5мл сыворотки смешать с 4,5мл 0,85%-ного раствора хлористого натрия. Добавить по каплям 2,5мл 1,8М HClO_4 , перемешать стеклянной палочкой, оставить на 10 минут при комнатной температуре для полноты осаждения белков, затем профильтровать через мелко пористый фильтр или центрифугировать при 3000об/мин в течение 15 минут.

Отобрать 5мл фильтрата (или центрифугата) и добавить 1мл фосфовольфрамовой кислоты для осаждения серомукоидов. Через 15 минут измерить степень мутности, длина волны 620нм, кювета 1см против фоновой пробы: 3,3мл 0,85%-ного хлористого натрия; 1,7мл раствора HClO_4 , 1мл фосфорновольфрамовой кислоты.

Результат выражают в единицах оптической плотности. Нормальные величины для сыворотки крови человека составляют 0,130-0,140ед.ОП.

Определение степени гликозилированности белков эритроцитарных мембран (Фельдкорен Б.И., Осипова Е.И., Коцедуб Т.П., 1991)

Принцип метода. Основан на способности гликозилированных остатков белков восстанавливать нитросиний тетразолий в щелочной среде.

Реактивы: 1. Раствор нитросинего тетразолия, 0,75ммл/л в 0,1М карбонатном буфере. рН 10,35; 2. 0,9%-ный раствор хлористого натрия; 3. 0,09%-ный раствор хлористого натрия.

Пробоподготовка. 1мл цельной крови, забранной с антикоагулянтом отмыть 3-4-хкратно 0,9%-ным раствором хлористого натрия или раствором PBS (0,1М NaCl + 20мМ Na₂HPO₄). Режим отмывки: 600g, 10 минут.

Ход определения. 100 мкл суспензии отмытых эритроцитов гемолизировать в 20 мл холодной дист.воды. Пробу центрифугировать в режиме 6000 об/мин в течение 15 минут. Осадок мембран промыть 20мл холодного 0,09%-ного раствора хлористого натрия. Надосадочную жидкость удалить, осадок ресуспендировать в 0,2мл 0,9%-ного хлористого натрия.

К 0,1 мл суспензии отмытых мембран эритроцитов добавить 2мл раствора нитросинего тетразолия в карбонатном буфере. Инкубировать при 37⁰С в течение 10 минут. Затем измерить начальную ОП, длина волны 530нм, кювета 0,5см. Продолжать инкубацию еще 15 минут, измерить конечную ОП.

Степень гликозилированности мембранных белков эритроцитов выразить в ус.ед. ОП по её приросту за 15 минут.

Определение содержания гликозилированных форм гемоглобина (Данилова Л.А., Лопатина Н.И., 1986)

Принцип метода: Углеводные остатки, отщепленные с помощью гидролиза в присутствии щавелевой кислоты, в виде 5-гидрокси-метил-фурфузола при взаимодействии с тиобарбитуровой кислотой дают характерную окраску, степень которой измеряется фотометрически.

Реактивы: 1. 1М раствор щавелевой кислоты; 2. 40%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ); 3. 0,05М раствор тиобарбитуровой кислоты (ТБК).

Пробоподготовка. Кровь, забранную с антикоагулянтом, трижды отмыть 0,15М раствором хлористого натрия или раствором PBS. Режим отмывки: 600g, 10 минут. Гемолиз эритроцитов проводят добавлением равного объема холодной дист.воды и нескольких капель хлороформа. Пробу отставить на 15-18 часов в холодильнике. Опытные пробы должны содержать 10мг гемоглобина в 1мл. Ориентируясь на среднее содержание гемоглобина, составляющее около 130г/л, гемолizat должен содержать около 130мг/мл и его необходимо разбавить в 13 раз. Можно провести и точное определение, используя циангемоглобиновый метод для конкретного образца гемолизата.

Ход определения. В 1мл гемолизата добавить 1мл щавелевой кислоты. Гидролиз осуществляется в течение 5-ти часов при 100⁰С в кипящей водяной бане. После охлаждения пробы добавить в неё 1мл ТХУ-кислоты. Перемешать и центрифугировать 10 минут при 3000об/мин. Отобрать 2мл центрифугата и прибавить 0,5мл ТБК и инкубировать в термостате при 40⁰С в течение 40 минут. ОП измеряется при длине волны 443нм против контрольной пробы (вместо гемолизата в контрольной пробе добавляется 1мл дист.воды, проба проводится через все операции).

Содержание гликозилированных гемоглобинов рассчитывается в процентах к общему содержанию гемоглобина, учитывая то, что многочисленные исследования стандартных растворов гликозилированных гемоглобинов, показали – оптическая плотность равная 0,029 соответствует 1% их содержания.

РАЗДЕЛ 5. ЛИПИДЫ

Объединяющим признаком этой группы химически разнородных соединений является гидрофобность. Липиды подразделяют на простые липиды – эфиры многоатомных спиртов и жирных кислот. Простые липиды включают триглицеролы (триглицериды) и воска. Сложные липиды – эфиры многоатомных спиртов, жирных кислот, фосфорной кислоты и различных органических соединений, часто содержащих азотные группировки. К этой подгруппе относят фосфоглицеролипиды, сфингомиелины, гликолипиды. Кроме того, выделяют липоиды – жироподобные соединения. Липоиды имеют лишь одно общее с настоящими липидами свойство – гидрофобность. Липоидами называют стероиды, каротиноиды, ретиноиды.

Многообразие липидов обусловлено разнообразием входящих в их состав жирнокислотных остатков азотсодержащих соединений и спиртов. Из спиртов чаще встречаются трехатомный спирт глицерол и сфингозины (семейство аминоспиртов с длинной ненасыщенной углеводородной цепью), циклические и многоатомные спирты входят в состав восков. Спирты формируют эфиры с насыщенными жирными кислотами (стеариновой, пальмитиновой и др.) и ненасыщенными (арахидоновой, линолевой, линоленовой, олеиновой и др.). Содержание в составе жиров ненасыщенных жирнокислотных остатков влияет на их агрегатное состояние: чем больше ненасыщенность, тем ниже температура плавления и выше жидкость. Растительные жиры имеют более высокий процент содержания в своем составе ненасыщенных жирнокислотных остатков, чем животные, и имеют жидкое агрегатное состояние при комнатной температуре (масла). В состав фосфоглицеролипидов входят остаток фосфорной кислоты и азотсодержащие соединения (серин, этаноламин, инозитол, холин). Наиболее сложный состав характерен для сфингомиелинов и гликолипидов.

Разнообразны и функции липидов и липоидов. Триглицеролы выполняют функции запасных энергоемких соединений, у животных кроме того защищают внутренние органы от механических повреждений и участвуют в термоизоляции. Фосфоглицеролипиды входят в состав клеточных мембран у всех клеток и органоцизов без исключений. Сфингомиелины встречаются в составе изолирующих оболочек нервных волокон, а также мембран нейронов. Стероиды входят в состав мембран, выполняют гормональные функции. Каротиноиды выполняют пигментные функции, служат предшественниками ретиноидов, являющихся гормонами.

При экстракции липидов необходимо учесть, что они способны не только к гидрофобным взаимодействиям, но могут формировать водородные связи, осуществлять образование электростатические и ковалентные связи (сложноэфирные, амидные, гликозидные). Относительно неполярные растворители (хлороформ, диэтиловый эфир, бензол) разрушают гидрофобные взаимодействия. Полярные (этанол, метанол) разрушают водородные и электростатические связи. Поэтому экстракцию липидов обычно осуществляют смесями неполярных и слабополярных растворителей. Липиды, находящиеся в комплексах, образованных ковалентными связями, растворителями не экстрагируются. Их выделяют после гидролиза комплексов слабыми растворами кислот и щелочей в органических растворителях.

Наиболее распространенным способом экстракции липидов из тканей является метод Фолча. Для экстракции применяется смесь хлороформа с метанолом в соотношении 2:1 из расчета 20:1 (20 частей экстрагента и одна часть ткани). Данный метод позволяет экстрагировать до 90-95% тканевых липидов, но при промывке экстракта водой или слабыми солевыми растворами часть кислых липидов теряется. Очистку экстракта можно провести с помощью гель-фильтрации на сефадексе.

Жирнокислотные остатки, входящие в состав липидов, представляют собой легко окисляемые соединения, а также липиды легко гидролизуются. Инициатором окислительного процесса являются активные формы кислорода, свет, ионизирующие излучения. Процессу окисления подвергаются двойные связи, после разрушения которых, образуются радикалы, легко превращающиеся в перекисные соединения. Экстракты липидов следует хранить в плотно закрытой посуде при -20°C.

Все органические растворители, применяемые для экстрагирования липидов, должны быть очищены от примесей и перекисных соединений, стимулирующих окисление липидов. Кроме того, они в той или иной степени ядовиты и требуют соблюдения техники безопасности при работе.

5.1. Методы количественного определения липидов

Определение общего содержания липидов в тканях

Принцип метода. Липиды экстрагируют смесью Фолча, экстракт отмывают от нелипидных примесей солевым раствором. Количественное определение суммарных липидов проводят весовым методом.

Реактивы: 1. Хлороформ; 2. Метанол; 3. Смесь хлороформ-метанол 2:1 по объему (смесь №1); 4. 0,73%-ный водный раствор хлористого натрия (или 0,88%-ный раствор хлористого калия или 0,05%-ный раствор хлористого кальция); 5. Смесь растворителей, содержащая минеральные соли: хлороформ-метанол-водный раствор NaCl – 0,58% или KCl – 0,74% или CaCl₂ – 0,04% в соотношении 3 : 48 : 47 (смесь №2).

Ход определения. 300-500 мг ткани залить 5 объемами смеси №1 и гомогенизировать в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Экстракт слить и экстрагирование повторить еще 2-3 раза. Экстракт вместе с остатками ткани поместить в мерный цилиндр доводят смесью №1 до соотношения 1:20. Центрифугировать в режиме 1000g в течение 15-20 минут. Центрифугат отделить и добавить к нему 0,73%-ный водный раствор хлорида натрия в объеме, составляющем 20% от объема экстракта липидов. Экстракт перемешать и центрифугировать при 600g в течение 15-20 минут. После центрифугирования система разделяется на две фазы. Верхнюю фазу осторожно отделить с помощью шприца или пастеровской пипетки и отбросить, поверхность нижней фазы и внутренние стенки центрифужной пробирки ополоснуть 3 мл смеси №2, не перемешивая нижней фазы с промывной жидкостью. Промывную жидкость отсосать и повторить процедуру промывания еще два раза. После окончания промывки к нижней фазе (хлороформная фракция липидов) по каплям прибавить метанол до образования однофазной системы, перемешать.

Экстракт липидов упаривают на ротаторном испарителе. Перед этим взвешивают круглодонную колбу, в которую помещают экстракт. После выпаривания колбу снова взвешивают. Расчет проводят с учетом взятой навески ткани.

Определение содержания общих липидов турбидиметрическим методом

Принцип метода. После экстрагирования липидов смесью спирта и эфира и взаимодействия с серной кислотой образуется мутная эмульсия, интенсивность мутности измеряется.

Реактивы: 1. Смесь Блора (этиловый спирт и диэтиловый эфир в соотношении 3:1)

2. Серная кислота, 1%-ный раствор;

3. Стандартный раствор триглицеридов в смеси Блора, 1 г/л

Ход определения. 0,2мл биологической жидкости, содержащей липиды (например, сыворотки крови) смешать с 3,8мл смеси Блюра, встряхнуть и поместить в водяную баню 50-60⁰С, доведя содержимое до кипения (не более 80⁰С!). После охлаждения под струей воды, пробу профильтровать в мерную пробирку, объем довести до 4мл смесью Блюра.

Пробу разделить на две пробирки по 2мл и добавить по 10мл 1%-ной серной кислоты. Приготовить стандартную пробу: 2мл стандартного раствора + 10мл серной кислоты. Все пробирки опустить в кипящую водяную баню на 1 минуту, охладить и через 60 минут измерить ОП против контроля (2мл смеси Блюра + 10мл серной кислоты), длина волны 630нм, ширина кюветы 0,3см.

Расчет по стандарту:

$$X \text{ г/л} = E_{\text{оп}} \times 1 \text{ г/л} / E_{\text{ст}}$$

Определение содержания липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови турбидиметрическим методом (по Бурштейну и Самой)

Принцип метода. Гепарин образует с бета-липопротеидами комплекс, который осаждается хлористым кальцием. Степень помутнения измеряется.

Реактивы: 1. 0,274%-ный раствор хлористого кальция;

2. Гепарин, активность 1000ед/мл, 1 %-ный раствор.

Ход определения. К 2мл раствора хлористого кальция добавить 0,2мл сыворотки крови и 0,04мл (40мкл) раствора гепарина. Точно через 4 минуты измерить ОП на длине волны 630нм, кювета 0,5см.

В расчете используется экспериментально найденный коэффициент.

$$X \text{ \%} = E \times 11,65$$

Определение содержания общих фосфолипидов в плазме (или сыворотке) крови

Принцип метода. Общую концентрацию фосфолипидов определяют по содержанию липидного фосфора, на долю которого приходится 4% относительной молекулярной массы фосфолипидов. Умножая найденное количество фосфора на 25, рассчитывают содержание общих фосфолипидов. Осаждение фосфолипидов проводят трихлоруксусной кислотой вместе с белками.

Реактивы: 1. ТХУ-кислота, 10%-ный раствор; 2. Хлорная кислота, 42%-ный раствор; 3. Молибдат аммония, 2,5%-ный раствор; 4. Аскорбиновая кислота, 1%-ный раствор; 5. Стандартный раствор $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (высушенный до постоянного веса) – 439мг в 100мл дист.воды; 6. Рабочий стандартный раствор – разводится в 100 раз; 1мл раствора содержит 0,01мг P_2O_5 .

Ход определения. В пробирку внести по 3мл дист.воды и 0,2мл плазмы или сыворотки крови. Добавить по 3мл 10%-ной ТХУ-кислоты. Первые 1,5мл добавляют по каплям, встряхивая пробирку, остальные – более быстро. Оставляют стоять 2 минуты, затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 минут до образования осадка, надосадочную жидкость сливают и высушивают пробирку, переворачивая ее на фильтровальную бумагу. К осадку прибавляют 1мл 42%-ной хлорной кислоты и 1-2 стеклянные бусинки для равномерного кипения. Пробирку нагревают 20-30 минут на песчаной бане, пока смесь не станет бесцветной. Необходимо наблюдать за процессом, пока не пройдет образование пены (5 минут). Сразу после извлечения из бани и охлаждения раствора прибавить 5мл дист.воды. Подготовить контроль на реактивы и три стандарта: в 4 пробирки наливают по 0,8 мл 42%-ной хлорной кислоты; в три пробирки прилить по 2мл рабочего раствора фосфата калия. Контрольную и стандартные пробы довести дист.водой до объема 6мл.

В каждую пробирку добавить по 1мл 2,5%-ного раствора молибдата аммония и 0,5мл 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты, доводят объем до 10мл дист.водой, перемешивают и оставляют на 5 минут. Измерить ОП против контроля при длине волны 670нм, толщина кюветы 1см.

Расчет фосфата липидов, мг/мл = $E_{оп} \times 0,02 \times 100 / E_{ст} \times 0,2 = E_{оп} \times 10 / E_{ст}$

0,02мг фосфора в 2мл стандартного раствора; 0,2мл – количество исследуемой плазмы или сыворотки.

Для нахождения содержания фосфолипидов в мМ/л полученные данные умножают на 0,3229 и на 25:

ФЛ, мМ/л = $(E_{оп} \times 10 / E_{ст}) \times 0,3229 \times 25$

Простой метод определения фосфолипидов в биологических объектах

Реактивы: 1. 2%-ный раствор дезоксихолата натрия; 2. Смесь хлороформ-метанол 2:1; 3. Молибденовый реактив: 5г молибденового кислого аммония размешать в 60 мл воды, 15 мл конц.серной кислоты разбавить 25мл воды. Оба раствора смешать и профильтровать.

Ход определения. 10 мкл исследуемой жидкости прибавить к 0,3 мл раствора дезоксихолата натрия. Встряхнуть. Добавить 0,6мл молибденового реактива, перемешать, добавить от 1 до 3мл хлороформа (в зависимости от необходимого для спектрометрирования объема). Центрифугируют 5 минут, 3000об/мин и измеряют разность ОП при 710 и 500нм против холостой пробы. Одновременно ставиться стандартная проба с известным содержанием фосфата, которая обрабатывается как опытная. Можно использовать разведенный стандартный раствор из предыдущего метода.

Расчет проводится по стандарту.

Определение содержания холестерина

Реактивы: 1. Стандартный раствор холестерина в хлороформе, 0,1г/л; 2. Смесь Блюра (3 части этилового спирта и 1 часть диэтилового эфира); 3. Уксусный ангидрид; 4. Хлороформ; 5. Концентрированная серная кислота;

Экстракция холестерина. В пробирку внести 0,1мл гомогената печени или сыворотки крови и добавить 2мл смеси Блюра, пробирку встряхнуть и поместить в кипящую водяную баню. Когда жидкость в пробирке закипит, пробирку вынуть из бани и содержимое процитьровать через бумажный фильтр, смоченный смесью Блюра, в стаканчик диаметром 4-5см. В пробирку 3 раза добавляют по 2мл смеси Блюра, которую слить в тот же фильтрат. Фильтрат упарить досуха на кипящей водяной бане под тягой.

Определение содержания холестерина. Полученный осадок растворить в 2мл хлороформа, добавить 0,5мл уксусного ангидрида и 0,4мл конц. серной кислоты. Одновременно поставить стандартную пробу: 0,1мл стандартного раствора довести хлороформом до объема 2мл, добавить 0,5мл уксусного ангидрида и 0,4мл конц. серной кислоты. Пробы помещают на 20 минут в темное место для развития окраски. Измерить ОП, длина волны 670нм, кювета 0,5см против фоновой пробы (2мл хлороформа, 0,5мл уксусного ангидрида и 0,4мл конц.серной кислоты).

Расчет:

$$X, \text{ г/л} = E_{\text{оп}} \times 1 \text{ г/л} / E_{\text{ст}}$$

Определение содержания свободных жирных кислот в сыворотке крови

Принцип метода: Метод основан на способности медных солей жирных кислот образовывать окрашенные комплексные соединения с диэтилтиокарбаматом натрия, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации свободных жирных кислот.

Реактивы: 1. Стандартный раствор пальмитиновой кислоты (или другой жирной кислоты) 1мкг-экв./мл хлороформа; 2. Медный реактив: 10 объемов 6,45%-ного раствора $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 9 объемов 1М раствора триэтанолamina (М.М. 149) и 1 объем 1N уксусной кислоты; 3. 0,1%-ный раствор диэтилдитиокарбамата в бутаноле.

Ход определения. В пробирку с притертой пробкой внести 0,5мл сыворотки крови, 5мл хлороформа и 2,5мл медного реактива. Одновременно ставят стандартную пробу: в пробирку с притертой пробкой внести 1мл стандартного раствора жирной кислоты и 4,5 хлороформа и 2,5мл медного реактива. Закрыв пробирки, встряхивают 2-3 минуты. Содержимое пробирок переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 минут. Смесь в пробирке разделяется на три слоя: хлороформ, белок и вода. В стандартной пробе белковый слой отсутствует.

Верхнюю водную фазу, содержащую избыток медного реактива, удалить, белковую пленку сдвигают на стенку пробирки, хлороформный слой с жирными кислотами 2,5мл перенести в другие пробирки и добавляют по 0,5мл 0,1%-ного раствора диэтилдитиокарбамата натрия в бутаноле и перемешать содержимое пробирок.

ОП измерить при длине волны 430нм, кювета толщиной 0,5см против фоновой пробы: 2,5мл хлороформа + 0,5мл 0,1%-ного раствора диэтилдитиокарбамата натрия в бутаноле.

Расчет:

$$X \text{ мкг-экв/мл} = E_{\text{оп}} \times 2 / E_{\text{ст}}$$

5.2. Выделение и фракционирование липидов

Определение липидов мозговой ткани с помощью хроматографии в тонком слое

Реактивы: 1. Органические растворители: хлороформ; метанол; гексан; диэтиловый эфир; 2. Силикагель; 3. Холестерин, 1%-ный хлороформный раствор и 0,1мг/мл (стандартный раствор); 4. Фосфатидилэтанолamin, 1%-ный раствор в хлороформе; 5. Свиное сало; 6. Ледяная уксусная кислота; 7. Концентрированная серная кислота; 8. Фосфомолибденовая кислота, 10%-ный раствор; 9. Уксусный ангидрид; 10. Серноокислый кальций (гипс); **Приготовление:** 20%-ный раствор CaCl_2 прилить при энергичном помешивании к 20%-ному раствору H_2SO_4 . Выпавший осадок осадить и промыть водой до нейтральной реакции, высушить и прокалить при 180°C в течение 1-2 суток. Хранить в плотно закрытой банке. 11. Стеклопластинки с силикагелем КСК.

Экстракция липидов из мозговой ткани. В небольшую коническую колбочку с притертой пробкой помещают 300-400мг мозговой ткани. Ткань растереть

стеклянной палочкой и залить 25мл свежеприготовленной смеси хлороформ-метанол 2:1. Колбочку энергично встряхивать в течение 3-5 минут и оставить на 10 минут при комнатной температуре. Затем профильтровать через маленький складчатый фильтр в фарфоровую чашку и упарить досуха в бане с температурой не выше 80°C. Осадок растворить в 1мл хлороформа. Полученный раствор хранить в пробирке с притертой пробкой.

Подготовка хроматографической камеры. Разгонку проводят смесью гексантилиловый эфир-ледяная уксусная кислота в соотношении 78:25:2 в хроматографической камере с притертой крышкой. В камеру наливают смесь растворителей и оставляют на 2-3 часа для насыщения парами растворителей.

Нанесение экстракта на пластинку. Хлороформный экстракт липидов наносят на пластинку с помощью микропипеток или микродозатора. Линия старта должна быть на расстоянии 1,5см от края пластинки, расстояние между точками нанесения не менее 1-2см. Раствор наносят по 5-10мкл, не касаясь пластинки, узкой полоской (8мм). Общий объем наносимого экстракта 50-100мкл.

В качестве свидетелей используют 1%-ные растворы холестерина, фосфолипидов и триглицеридов (свиное сало) в хлороформе. Их наносят по 40-50мкл в отдельные точки.

Разделение и проявление. Пластинку с нанесенными и подсушенными пробами поместить в камеру, погружая её в растворитель на 5мм. Камеру герметически закрыть. Разгонку осуществлять в течение 1 часа при комнатной температуре. Пластинку высушивают на воздухе в течение 30 минут и можно для лучшего разделения повторить процедуру разгонки. Хроматограмму проявляют, осторожным опрыскиванием из пульверизатора 10%-ным спиртовым раствором фосфомолибденовой кислоты. Через 1 минуту пластинку помещают в сушильный шкаф при 80-100°C до проявления на желтом фоне синих пятен липидов. Необходимо избегать избытка проявителя, так как это сопровождается увеличением окраски фона.

Расположение липидов на хроматограмме: на старте или почти на старте – фосфолипиды; выше – неидентифицированные соединения; затем – холестерин; моно- ди- и триацилглицериды; между ди- и триацилглицеридами располагаются свободные жирные кислоты, но они не проявляются фосфомолибденовой кислотой.

Выделение фосфолипидов из яичных желтков

Фосфолипиды – единственная группа липидных соединений, которая не растворяется в ацетоне. Яичные желтки при обработке ацетоном освобождаются от всех липидов, кроме фосфолипидов, главным образом, лецитина.

Реактивы: 1. Яичные желтки, 2 шт.; 2. Этиловый и метиловый спирты; 3. Ацетон, хлороформ; 4. Петролейный эфир; 5. *n*-Бутиловый спирт; 6. Фосфомолибденовая кислота, 5%-ный спиртовой раствор; 7. Ледяная уксусная кислота; 8. Нингидрин, 0,3% на раствор *n*-бутаноле, содержащим 3% уксусной кислоты; 9. Окись алюминия, Al₂O₃, суспензия 170-190г в смеси хлороформ-метанол 1:1.

Фракционированное осаждение липидов. Яичные желтки гомогенизировать в течение 10 минут с 80мл ацетона. Гомогенат оставить в холодильнике на ночь. На следующий день осадок отделить центрифугированием при 3000об/мин в течение 20 минут и суспендировать в 80мл ацетона и снова отделить центрифугированием. Затем осадок тонким слоем распределить по фильтровальной бумаге и высушить в течение 1-2 часов до исчезновения запаха ацетона.

Из высушенного осадка провести экстракцию фосфолипидов 50мл смеси хлороформ-метанол 1:1 встряхиванием на механической мешалке в течение 30

минут (емкость объемом 200мл с притертой пробкой). Полученный экстракт центрифугировать в режиме 3000 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную жидкость отделить в отдельную емкость с притертой пробкой, осадок обработать повторно 50мл смеси хлороформ-метанол и центрифугируют. Центрифугаты объединить и выпарить на роторном испарителе.

После выпаривания смесь фосфолипидов растворить в 10мл петroleйного эфира и добавить 20-ти кратный объем ацетона – 250мл. Перемешать, оставить на сутки. Осадок отфильтровать на воронке Бюхнера. Снова растворяют в 10мл петroleйного эфира и процедуру повторяют. После повторного осаждения осадок промывают на фильтре 50мл ацетона. И перед разделением растворить в 5-10мл смеси хлороформ-этанол (1:1).

Хроматографическое разделение фосфолипидов на колонке с Al_2O_3

Подготовка колонки. Колонка диаметром 2,5см и высотой не менее 50см заполняется за 1-2 суток до разделения фосфолипидов. На дно помещают плотный слой стеклянной ваты толщиной 1см, затем наливают суспензию, слегка постукивая по ней деревянной палочкой для равномерного оседания и для получения равномерного слоя адсорбента. Сверху можно получить бумажный фильтр. Полученную смесь фосфолипидов нанести на колонку. Фосфатидилхолин с примесью лизофосфатидилхолина и сфингомиелина вымывается 500мл смеси метанол-хлороформ (1:1). Первые 150мл и последние 100мл отбрасываются. После выхода фосфатидилхолина колонку промывают 100мл той же смеси. Фосфатидилэтанолламин с примесью фосфатидилсерина вымывается 50мл смеси этанол-хлороформ-вода (5:2:2). Первые 20мл отбрасывают. Полученные элюаты выпаривают на роторном испарителе.

Анализ фосфолипидов с помощью тонкослойной хроматографии. Для тонкослойной хроматографии используют пластинки «Силуфол», размером 150×150мм и стандартные камеры. В качестве растворителя берут смесь хлороформ-метанол-вода (65:25:4).

На две пластинки на расстоянии 1,5см от их узкого края нанести микропипеткой хлороформные растворы фракций фосфатидилхолина (одно пятно) и фосфатидилэтанолламина (другое пятно) в количестве 5мкл. Пластинки поместить в камеру (предварительно за 2-3 часа для насыщения камеры парами в нее помещают растворитель). После разделения одну пластинку проявить 5%-ным спиртовым раствором фосфомolibденовой кислоты (с фосфатидилхолином образуются синие пятна на желтом фоне), другую – 3%-ным раствором нингидрина в *n*-бутаноле, содержащем 3% уксусной кислоты. В данном случае проявляются все фосфолипиды, содержащие аминогруппу – фосфатидилэтанолламин, лизофосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин) – в виде розовых пятен на белом фоне.

5.3. Перекисное окисление липидов

Стационарный уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) характерен для метаболизма всех клеток, являясь одним из механизмов обновления фосфолипидного бислоя мембран.

Известно два пути развития перекисного окисления липидов: ферментативный и неферментативный (Hochstein P., 1963). Ферментативный включает процессы окисления липидов в циклооксигеназной и липоксигеназной ферментативных системах, результатом становиться производство биологически активных соединений: простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов. Неферментативный представляет собой спонтанный процесс цепных реакций окисления, инициируемый активными кислородными метаболитами и свободными радикалами (супероксидный

радикал, ОН-радикал, перекисные радикалы и т.п.). Продуктами неферментативного перекисного окисления являются различные недоокисленные соединения: альдегиды, кетоны, кислоты.

Интенсивность ПОЛ определяется соотношением скорости производства свободных радикалов и активных кислородных метаболитов и скорости их утилизации с помощью систем антирадикальной защиты клеток и организмов.

Возрастание скорости производства свободных радикалов при недостаточности систем защиты может привести к развитию состояния окислительного стресса, накоплению в клетках и тканях токсичных соединений.

Ферменты – доноры супероксидного и перекисных радикалов в клетках: аминоксидазы, ксантиноксидаза, альдегидоксидаза, дегидрооротаноксидаза. В митохондриях источником супероксида и перекиси водорода становятся цитохром-С-редуктазная и цитохромоксидазная реакции, окисление-восстановление убихинона. В микросомах – система цитохрома P450.

Неферментативные инициаторы ПОЛ: автоокисление гидрохинонов, лейкофлавинов, катехоламинов, тиолов, тетрагидроптеринов, ферридоксина и других железосерных белков.

К активным кислородным метаболитам, инициирующим перекисное окисление липидов относят *супероксидный радикал, ОН-радикал, перекись водорода, гипохлориды и гипобромиды, генерируемые миелопероксидазой лейкоцитов.*

В органической гидрофобной среде агрессивность супероксидного радикала значительно выше, чем в водной среде. Супероксидный радикал может вступать в реакции с липидами и белками с образованием свободных радикалов (СР), реагировать с СР, обрывая цепные реакции, дисмутировать с образованием перекиси водорода.

Взаимодействие супероксидного радикала и перекиси водорода приводит к возникновению ОН'-радикала, который атакует соединения любой природы с генерацией воды и соответствующего свободного радикала. Образование ОН'-радикала активируется Fe^{2+} и аскорбиновой кислотой. Подобное развитие ПОЛ получило название аскорбатзависимого перекисного окисления липидов.

В процессе эволюции в клетках сформировались системы антиоксидантной защиты, к которым относят:

1. Ферментативную систему защиты, включающую ферменты супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатионпероксидазу (и другие виды пероксидаз у растений и бактерий);

2. Неферментативные защитные системы, включающие аскорбиновую кислоту, глутатион, токоферолы, каротиноиды и ряд других соединений, окисление которых способствует затуханию свободно-радикальных процессов.

Исследование скорости перекисного окисления липидов в гомогенатах печени

1. Приготовление гомогената печени.

Реактивы: 1. 0,9%-ный раствор хлористого натрия, охлажденный; 2. 0,025М ТРИС-буфер, содержащий 0,175М хлористого калия, рН 7,4.

Ткань печени крысы или другого животного отмыть от крови охлажденным физиологическим раствором и просушить на фильтровальной бумаге. Сделать навеску 1г и гомогенизировать в охлажденном буфере в соотношении 1:9. Полученный гомогенат отцентрифугировать для отделения ядерной фракции и неразрушенных клеток в режиме 3000об/мин (около 600g) в течение 10 минут. Надосадочная жидкость используется для развития ПОЛ.

2. Иницирование ПОЛ.

Реактивы А. Для аскорбатзависимого ПОЛ:

1. 8×10^{-4} М аскорбиновой кислоты; 2. 2×10^{-4} М АДФ; 3. 12×10^{-6} М FeSO₄

Реактивы Б. Для инициации цитохром-Р450-зависимого окисления в микросомах:

1. 5×10^{-4} М НАДФН; 2. 2×10^{-4} М АДФ; 3. 12×10^{-6} М FeSO₄

Разделите гомогенат на три равные части по 3мл и добавьте в первую пробирку по 0,1мл инициаторов аскорбатзависимого окисления, во вторую по 0,1мл инициаторов цитохром-Р450-зависимого окисления, а в третью – 0,3мл буфера (проба спонтанного развития ПОЛ).

Из пробирок сразу же отберите пробы на контрольное содержание продуктов перекисного окисления: по 0,5мл из каждой пробирки в 5мл смеси гептан-изопропан (1:1) (пробирки с притертыми пробками) и по 0,5мл в пробирки с 1мл 15%-ной ТХУ-кислоты.

Оставшиеся пробы по 2мл каждой поставьте на 30 минут в водяной термостат с 37°C для развития процесса ПОЛ.

3. Определение первичных продуктов ПОЛ – полиненасыщенных жирных кислот с сопряженными двойными связями (диеновых конъюгатов)(Костюк В.А., 1991)

Реактивы: 1. Смесь гептан-изопропанол, 1:1; 2. Этанол, 96%-ный.

Ход определения. 0,5мл исследуемой жидкости (гомогената печени) после 30-ти минутной инкубации (как и до инкубации, см. выше) поместить в пробирки с притертыми пробками и добавить 5мл смеси гептан-изопропанол. Встряхивать в течение 5-10 минут. Пробам дают хорошо отстояться. Жидкость без остатков гомогената перенести в градуированные пробирки для измерения количества и добавить 1/10 объема дистиллированной воды. Встряхнуть, оставить до расслоения фаз. Отобрать по 0,5мл каждой фазы (верхней гептановой и нижней изопропиловой) в разные пробирки, содержащие по 2,5мл этилового спирта. Измерить ОП при длине волны 232нм (диеновые конъюгаты) и 273нм (диеновые кетоны) против фоновой пробы – этилового спирта.

Если основным субстратом окисления являются фосфолипиды, то продукты обнаруживаются в изопропиловой фазе, если триглицериды или эфиры холестерина – в гептановой.

Расчет: $X \text{ мкМ} / \text{г ткани} = \Delta E \times 500 / 28$, где

500 – разведение, начиная с гомогената ($10 \times 10 \times 5$); Молярный коэффициент экстинкции – $28 \text{ 000M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Рассчитайте скорость образования первичных продуктов в мкМ/мин для всех условий инициации ПОЛ, используя разницу в содержании диеновых конъюгатов между пробками до инкубации и после инкубации.

2. Определение конечного продукта ПОЛ: малонового диальдегида (Стальная И.Д., Гаршвили Т.Г., 1977)

Принцип метода. При высокой температуре в кислой среде малоновый диальдегид реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой, образуя окрашенный триметиновый комплекс, с максимумом поглощения при 532 нм.

Реактивы: 1. ТХУ, 15%-ный раствор; 2. 0,8%-ный раствор тиобарбитуровой кислоты (ТБК) (готовится при нагревании и фильтруется).

Ход определения. К 0,5мл гомогената (после инкубации) добавить 1мл ТХУ-кислоты (также, как было сделано до инкубации, см. выше). Перемешать и центрифугировать в режиме 3000об/мин в течение 10 минут. Центрифугировать также и контрольные пробы, отобранные ранее до инкубации в термостате.

К 1мл надосадочной жидкости (центрифугат должен быть абсолютно прозрачным) добавить 2мл раствора тиобарбитуровой кислоты. Также приготовить пробу контроля на реактивы: 1мл ТХУ-кислоты + 2мл ТБК. Все пробирки поместить в кипящую водяную баню на 15 минут. После охлаждения пробы колориметрировать при длине волны 532нм против контроля на реактивы, толщина кюветы 1см.

$$\text{Расчет: } \text{мкМ/г ткани} = \Delta E \times P / 156$$

P – разведение: 10 (гомогенат) × 3 (с ТХУ) × 3 (с ТБК); $1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{см}^{-1}$ – молярный коэффициент экстинкции.

Рассчитайте скорость образования малонового диальдегида (МДА) для всех условий инициации ПОЛ в мкМ/мин, используя разницу между содержанием МДА до инкубации и после инкубации.

Модификация метода определения малонового диальдегида в сыворотке крови (Л.И. Андреева и соавторы, 1988)

Для анализа берут 0,3мл свежей сыворотки крови или плазма (в качестве антикоагулянта нельзя использовать ЭДТА) без следов гемолиза. Пробы можно замораживать и хранить в морозильнике, количество МДА при этом увеличивается незначительно.

Реактивы: 1. 1%-ный раствор ортофосфорной кислоты; 2. 0,6%-ный раствор ТБК; 3. Раствор $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 28мг на 10мл дист.воды;

Ход определения. К 0,3мл сыворотки крови или плазмы прилить 3мл 1%-ной ортофосфорной кислоты, 1мл 0,6%-ной ТБК и 0,1мл раствора сернокислого железа (это соответствует 1мкМ в пробе). Пробу поместить в кипящую водяную баню на 60 минут (1 час). Затем охладить холодной водой и добавить 4мл бутанола. Тщательно перемешать и центрифугировать в режиме 3000об/мин в течение 10 минут. Отсосать верхнюю бутаноловую фазу и измерить ОП при длине волны 535нм, толщина кюветы 1см против бутанола.

Расчет проводится с учетом молярного коэффициента экстинкции, равного $1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{см}^{-1}$.

$$X \text{ мкМ/л} = E \times 10^6 \times 4 / 1,56 \times 10^5 \times 0,3 = E \times 85,47$$

4 мл – объем бутанола; 0,3 – объем сыворотки; 10^6 – перевод в мкМ.

РАЗДЕЛ 6. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) являются полимерными органическими соединениями, входящими в состав живых клеток. Каждый из видов нуклеиновых кислот имеет определённую структуру, свойства и функции.

Химическая основа наследственности заключена в ДНК. Мономерными единицами, формирующими ДНК, являются дезоксиаденилат, дезоксицитидилат, дезоксигуанилат и тимидилат. Мономеры полимеризуются с образованием 3',5'-фосфодиаэфирных связей, формируя единичную цепь ДНК (рис. 6.1).

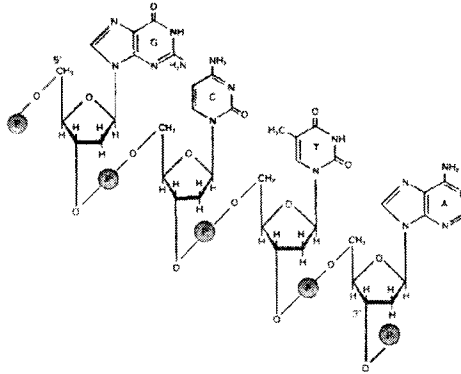


Рис. 6.1. Фрагмент структуры одной из цепей молекулы ДНК, в которой пуриновые и пиримидиновые основания аденин (А), тимин (Т), цитозин (С) и гуанин (G) удерживаются вместе фосфодиаэфирными связями, соединяющими 2'-деоксирибозильные остатки, связанные N-гликозидной связью с соответствующими азотистыми основаниями.

Полимерная молекула ДНК полярна. На одном конце расположена 5'-гидроксил- (либо фосфатная группа), на другом 3'-фосфат- (либо гидроксильная группа). Основываясь на данных рентгеноструктурного анализа ДНК и правиле Чаргаффа (в молекуле ДНК содержание остатков дезоксиаденозина равно содержанию тимидина, а содержание дезоксигуанозина равно содержанию дезоксицитозина), Уотсон, Крик и Уилкинс предложили в начале 50-х годов прошлого века модель двухспиральной структуры ДНК. Модель В-формы ДНК изображена на рис. 6.2.

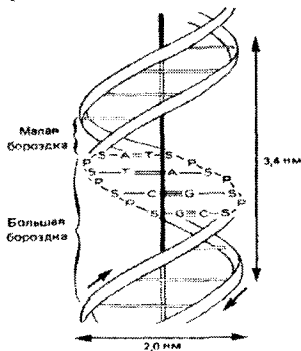


Рис. 6.2. Схематическое изображение двухспиральной структуры В-формы ДНК (по Уотсону и Крику). А – аденин, С – цитозин, G – гуанин, Т – тимин, P – фосфат, S – сахар – дезоксирибоза [Биохимия человека].

Две цепи этой правозакрученной, двухспиральной молекулы удерживаются друг возле друга за счет водородных связей, образующихся между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Образование комплементарных пар строго специфично. Так, А всегда спаривается с Т (образуется две водородные связи), а Г – с Ц (три водородные связи) (рис. 6.3).

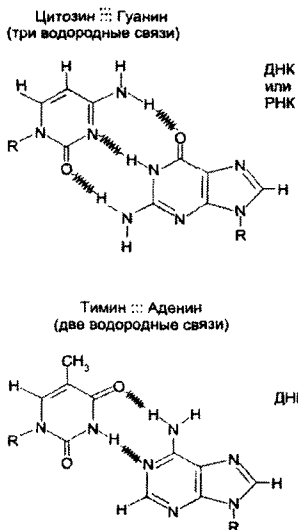


Рис. 6.3. Пурип-пиримидиновые пары нуклеотидов в молекуле ДНК.

Такое однозначное соответствие азотистых оснований антипараллельных цепей ДНК объясняется особенностью расположения группировок в нуклеозидах. Чёткое расположение азотистых оснований цепей ДНК друг относительно друга возможно благодаря следующим особенностям: в двухцепочечной молекуле возникают ограничения вращения относительно фосфодиэфирных связей, за счёт анти-конфигурации гликозидных связей, преваляирования таутомерных форм четырёх азотистых оснований (рис. 6.4, 6.5):

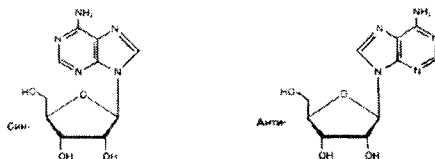


Рис. 6.4. Структура син- и анти- конфигураций аденозина.

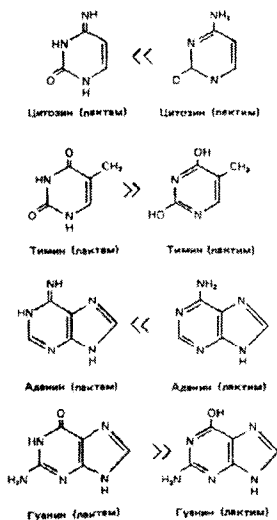


Рис. 6.5. Структура таутомеров азотистых оснований ДНК с указанием преобладающих форм.

6.1. Структура ДНК

Двойные спирали ДНК могут формировать различные типы. В настоящее время известно шесть форм (от А до Е и Z-форма). Большая часть структурных вариантов ДНК может существовать только в строго контролируемых условиях эксперимента. Эти варианты различаются 1) числом пар оснований, приходящихся на один виток двойной спирали; 2) расстоянием между плоскостями пар оснований; 3) углом, который плоскости пар оснований образуют с осью спирали; 4) диаметром спирали; 5) направленностью (правая, левая) двойной спирали (табл. 6.1).

Характеристика трёх типов структур ДНК

Таблица 6.1.

Тип	Число пар оснований	Расстояние между плоскостями оснований, нм	Диаметр спирали, нм	Закрученность спирали
A	11	0,256	2,3	Правая
B	10	0,338	1,9	Правая
Z	12	0,371	1,8	Левая

Преобладающим структурным типом ДНК является В-форма. Шаг спирали такой молекулы равен 3,4 нм. В условиях менее высокой гидратации и при более высоком содержании ионов Na^+ или K^+ возникает несколько иная структура – так называемая А-форма. Эта правоспиральная конформация имеет больший диаметр спирали, чем В-форма, и большее число пар оснований на виток. Z-форма ДНК представляет собой левозакрученную двойную спираль, в которой фосфодиэфирный остов расположен зигзагообразно вдоль оси молекулы. Отсюда и

название молекулы Z (zigzag)-ДНК. Z-ДНК – наименее скрученная (12 пар оснований на виток) и наиболее тонкая из известных в природе.

ДНК прокариотических клеток взаимодействует с белками, участвующими в репликации и транскрипции. У эукариотических организмов значительная часть ДНК взаимодействует со множеством различных белков. Эти белки вместе с ДНК образуют надмолекулярную структуру – хроматин.

Хроматин – это хромосомный материал, экстрагируемый из ядер эукариотических клеток. В его состав входят двухцепочечные молекулы ДНК, небольшие основные белки – гистоны, общая масса которых примерно равна массе ДНК, кислые белки с молекулярной массой, большей чем у гистонов, а также небольшое количество РНК. Электронная микроскопия хроматина выявила наличие в нем сферических частиц (нуклеосом) размером около 10 нм, соединенных друг с другом нитями ДНК (рис. 6.6).

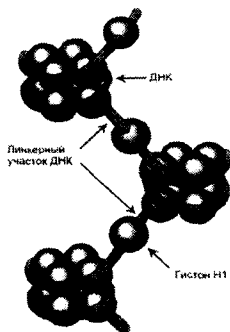


Рис. 6.6. Модель структуры нуклеосомы. Основу (кор) нуклеосомы составляют гистоны H2A, H2, H3 и H4 (по 2 молекулы каждого белка). ДНК закручена вокруг кора, делая 1,75 витка.

Тетрамер $H3_2-H4_2$ играет центральную роль в формировании нуклеосомы, поскольку придаёт ДНК нуклеосомоподобную структуру. Гистон H1 связывается с нуклеосомным кором на участке входа и выхода ДНК, «склеивая» 2 оборота, т.е. 166 пар оснований суперспирали ДНК. Так формируется зрелая нуклеосома. В сборке нуклеосомы, вероятно, участвует ядерный белок анионного характера – нуклеоплазмин.

Далее происходит более компактная укладка ДНК – формируются фибриллы, волокна, конденсированная хромосома и метафазная хромосома (рис. 6.7). В метафазе хромосомы млекопитающих обладают двулучевой симметрией второго порядка и состоят из идентичных сестринских хроматид, соединенных в центромере, положение которой характерно для каждой хромосомы. Каждая сестринская хроматида содержит одну двухцепочечную молекулу ДНК. В интерфазе упаковка молекулы ДНК менее плотная, чем в метафазе. Метафазные хромосомы транскрипционно-неактивны.

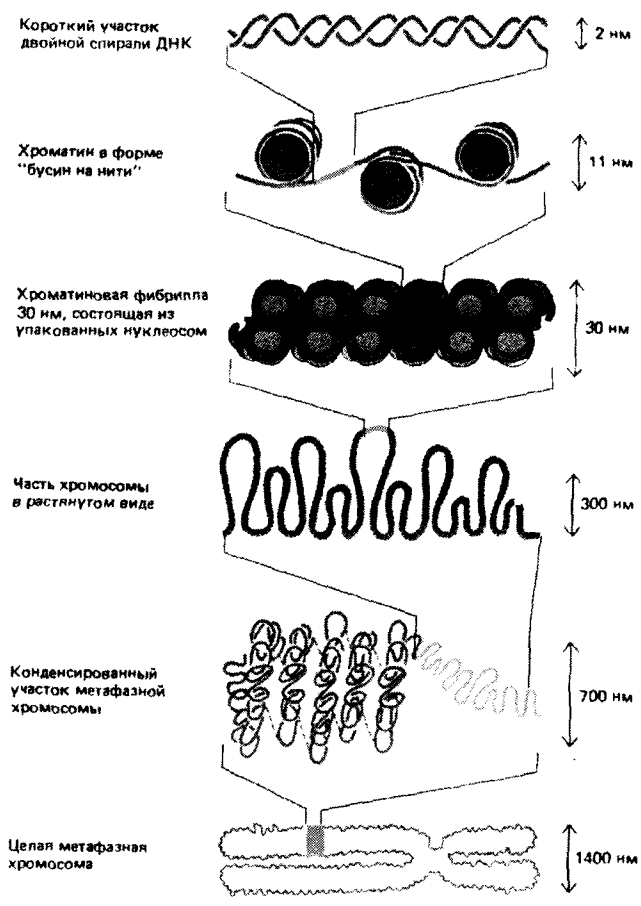


Рис. 6.7. Схема, иллюстрирующая различные уровни упаковки хроматина, отражающие последовательные этапы формирования высококонденсированной метафазной хромосомы.

6.2. Химическая природа РНК

Рибонуклеиновая кислота представляет собой сополимер пуриновых и пиримидиновых рибонуклеотидов, соединенных друг с другом, как и в ДНК, 3'-5'-фосфодизфирными мостиками (рис. 6.8).

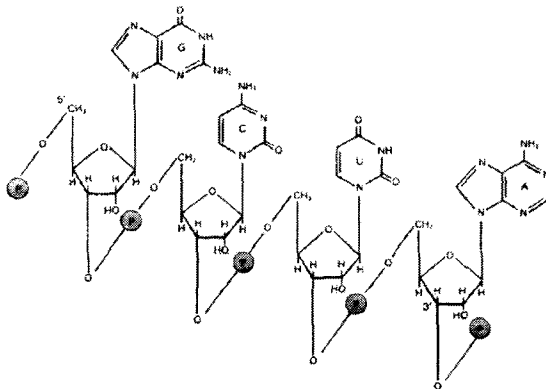


Рис. 6.8. Фрагмент молекулы РНК, в котором пуриновые и пиримидиновые основания – аденин (А), урацил (U), цитозин (С), гуанин (G) – удерживаются фосфодизфирным остовом, соединяющим рибозильные остатки, связанные N-гликозидной связью с соответствующими нуклеиновыми основаниями.

Хотя эти два вида нуклеиновых кислот имеют много общего, по ряду признаков они отличаются друг от друга. Так, у РНК углеводным остатком, к которому присоединены пуриновые или пиримидиновые основания и фосфатные группы, является рибоза, а не дезоксирибоза (как у ДНК). Пиримидиновые компоненты РНК отличаются от таковых у ДНК. В состав РНК, как и в состав ДНК, входят нуклеотиды аденина, гуанина и цитозина. В то же время РНК не содержит тимина, его место в молекуле РНК занимает урацил. РНК – это одноцепочечная молекула (в отличие от ДНК, имеющей двухцепочечную структуру), однако, при наличии в цепи РНК участков с комплементарной последовательностью (противоположной полярности) единичная цепь РНК способна сворачиваться с образованием так называемых «шпилек», структур, имеющих двухспиральные характеристики.

Известно несколько видов РНК. Почти все они непосредственно вовлечены в процесс биосинтеза белка. Молекулы цитоплазматической РНК, выполняющие функции матриц белкового синтеза, называются матричными РНК (мРНК). Другой вид цитоплазматической РНК – рибосомная РНК (рРНК) – выполняет роль структурных компонентов рибосом. Адапторные молекулы транспортных РНК (тРНК) участвуют в трансляции информации мРНК в последовательность аминокислот в белках. Малые ядерные РНК (мяРНК) непосредственно не участвуют в синтезе белка, но могут оказывать влияние на процессинг РНК и общую «архитектуру» клетки. Размеры этих относительно небольших молекул варьируют, последние содержат от 90 до 300.

6.3. Получение препаратов ДНК и РНК

Выделение ДНК и РНК по методу Тсубол и Стоуэл

Реактивы: 1. 0,14M раствор хлористого натрия; 2. Этиловый спирт; 3. 10%-ый хлористый натрий; 4. Хлороформ; 5. Насыщенный раствор хлористого натрия.

Ход определения. Ткань печени растирают в холодном состоянии с кварцевым песком, затем добавляют 4 объема 0,14M хлористого натрия. Гомогенат центрифугируют в течение 4 минут при 6000об/мин. Полученный осадок содержит всё количество ДНК, присутствующее в данном количестве ткани печени, надосадочная жидкость содержит наибольшую часть РНК.

Выделение ДНК. Осадок подвергают механическому растиранию и 2-3-кратной вытяжке в холодном состоянии насыщенным раствором NaCl. Экстракт центрифугируют, а белковый осадок удаляют. К надосадочной жидкости добавляют 2 объема этилового спирта, образовавшийся волокнистый осадок ДНК очищают промыванием и взбалтыванием с хлороформом.

Выделение РНК. Надосадочную жидкость исходного гомогената экстрагируют при нагревании 10%-ым раствором NaCl, добавляемого в равном объеме. Затем экстракт просветляют фильтрованием. К просветленному экстракту добавляют двойной объем этилового спирта. Образуется осадок РНК, который очищают встряхиванием с хлороформом.

Оценка чистоты и нативности выделенного препарата ДНК

1. Для оценки чистоты и наличия примесей в препаратах нуклеиновых кислот существует несколько тестов.

Одним из простейших критериев чистоты выделенных препаратов нуклеиновых кислот является определение спектральной кривой поглощения в ультрафиолете и измерения величин отношений E_{260} / E_{230} и отношения E_{260} / E_{280} . Для препаратов, достаточно хорошо очищенных от примесей белков и полисахаридов, эти показатели должны быть в пределах 2,1-2,4.

Ход определения. 2-4 мг выделенного препарата ДНК растворите в 100 мл 0,2 M хлорной кислоты. Постройте спектральную кривую в области ОП от 230 до 280нм. Определите отношение ОП при указанных выше длинах волн (против хлорной кислоты). Сделайте вывод о чистоте полученного вами препарата.

2. Для того, чтобы решить вопрос о нативности образца ДНК, необходимо убедиться в его полимерности, наличии у него так называемого гипохромного эффекта, фазового перехода в области температуры плавления и эффекта «сжатия».

1) Гипохромный эффект. Известно, что в ультрафиолетовой области спектра ДНК поглощает ультрафиолетовые лучи с максимумом при 260нм примерно на 40% меньше, чем смесь нуклеотидов, характерная для данного образца ДНК. Этот эффект, называемый гипохромным, обусловлен упорядоченным (параллельным) расположением азотистых оснований в цепи ДНК, допускающим специальные виды взаимодействия между основаниями. При денатурации ДНК водородные связи, стабилизирующие азотистые основания в определенном положении, разрушаются, что приводит к увеличению поглощения в ультрафиолетовой области спектра, равному при максимальном нарушении структуры ДНК 40% по сравнению с нативными образцами ДНК. Таким образом, молярный коэффициент экстинкции – величина поглощения $E(p)$ на 1 M фосфора ДНК при стандартной ширине кюветы (1см) может служить одним из критериев нативности ДНК. Нативные образцы ДНК

имеют значение $E(p)=6200-6600$. Более высокие значения $E(p)$ характеризуют определённые денатурационные сдвиги в структуре ДНК.

Реактивы: NaCl, 0,2М раствор.

Ход определения. Измерение поглощения производят на спектрофотометрах в 0,2М растворе хлорида натрия. Концентрация ДНК не должна превышать 0,003%. Температура 25°C. Расчёт $E(p)$ производят по формуле:

$$E(p) = \frac{E}{CpL}, \text{ где}$$

E – показания поглощения по прибору;

Cp – молярная концентрация фосфора в растворе, рассчитанная на основании процентного содержания фосфора в ДНК;

L – ширина кюветы.

Измерение проводят при 258-260мкм

2) Проба на Pb^{2+}

Реактивы: ацетат свинца, 2%-ый раствор.

Ход определения. Другим простым способом для проверки нативности препарата является проба на содержание с Pb^{2+} . Денатурированная ДНК осаждается, если к ней прилить равный объём 1%-го ацетата свинца. Нативная ДНК в этих условиях не осаждается.

Спектрофотометрический метод количественного определения нуклеиновых кислот по А.С. Спирину

Реактивы: 1. Хлорная кислота, 1М раствор; 2. Серная кислота, 5%-ый раствор.

Оборудование: штатив с пробирками и капельницами; пипетки вместимостью 2мл; водяная баня; спектрофотометр; круглодонная колба с обратным холодильником.

Материалы: 1) гидролизат дезоксирибонуклеопротеидов ткани селезёнки или печени; 2) РНК дрожжевая, свежеприготовленный раствор.

Получение гидролизата ДНК.Осадок дезоксирибонуклеопротеидов, полученный из 1г ткани селезёнки или печени, помещают в колбочку для гидролиза, добавляют 30-40мл 5%-го раствора серной кислоты.

Закрывают колбочку пробкой с обратным холодильником и осторожно кипятят содержимое на медленном огне в течение 30-40мин. Полученный гидролизат охлаждают.

Метод основан на измерении светопоглощения нуклеиновых кислот при 270 и 290нм, интенсивность которого пропорциональна их количеству в пробах.

Ход определения. В одну пробирку вносят 1,0мл гидролизата ДНК, в другую – тот же объём раствора РНК и доводят дистиллированной водой до 1,5мл.

Добавляют в каждую пробу по 1,5мл раствора хлорной кислоты, закрывают пробирки капельницами и ставят на гидролиз в кипящую водяную баню на 20мин. Гидролизаты охлаждают, определяют экстинкцию содержимого каждой пробы на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1см при 270 и 290нм.

Расчёт. Содержание ДНК рассчитывают по формуле:

$$X_1 = \frac{E_{270} - E_{290} \cdot 10,1}{0,19}$$

а РНК по формуле:

$$X_2 = \frac{E_{270} - E_{290} \cdot 10,5}{0,19}, \text{ где}$$

X_1 и X_2 – концентрация ДНК и РНК, мг/л

E_{270} – экстинкция исследуемого гидролизата при 270нм

E_{290} – экстинкция исследуемого гидролизата при 290нм

0,19 – удельная экстинкция фосфора нуклеиновых кислот в концентрации 1 мг/л

10,1 и 10,5 – коэффициенты пересчёта содержания фосфора на концентрацию нуклеиновых кислот, исходя из теоретического содержания фосфора в ДНК 9,9% и в РНК 9,5%

Определение содержания ДНК (по Дише)

Реактивы: Хлорная кислота, 1М раствор; дифениламинового реактив.

Оборудование: Штатив с пробирками; пипетки вместимостью 1 и 2мл; водяная баня; спектрофотометр или КФК.

Материалы: 1. Гидролизат ДНК ткани селезёнки. 2. ДНК, стандартный свежеприготовленный раствор концентрации 1г/л. 3. РНК дрожжевая, опытный раствор.

Метод основан на образовании окрашенного комплекса дезоксирибозы с дефениламином, интенсивность которого пропорциональна концентрации этой пентозы в гидролизатах ДНК.

Ход определения. В пробирку наливают 0,5мл стандартного раствора ДНК и равный объём раствора хлорной кислоты. Ставят пробирку в кипящую водяную баню на 10мин. Затем охлаждают содержимое.

Во вторую пробирку вносят 1мл гидролизата ДНК ткани селезёнки (опытная проба), затем прибавляют в обе пробирки по 2мл дифениламинового реактива Дише. Пробы перемешивают стеклянной палочкой и ставят пробирки в кипящую водяную баню на 10мин для развития окраски. Затем содержимое пробирок охлаждают.

Опытную и стандартные пробы фотометрируют против контрольной пробы на ФЭКе при красном светофильтре (длина волны 595нм) в кювете с толщиной слоя 0,5см.

Контрольную пробу готовят перед фотометрией. Она содержит 0,5мл дистиллированной воды, 0,5мл раствора хлорной кислоты, 2мл реактива Дише. Кипятят содержимое пробирки в течение 10 мин на водяной бане. Охлаждают.

Расчёт. Содержание ДНК в опытной пробирке x (г/л) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{E_{оп}}{E_{ст}}, \text{ где}$$

$E_{оп}$ – экстинкция опытной пробы против контрольной; $E_{ст}$ – экстинкция стандартной пробы против контрольной.

Оформление работы. По экстинкции рассчитать концентрацию опытного образца ДНК, указать в выводе возможность использования дифениламинового реакции для количественного определения ДНК.

Количественное определение ДНК по Броди

Принцип метода заключается в том, что интенсивность окраски дезоксирибозы ДНК с солянокислым цистеином зависит от количества ДНК в растворе. Этим методом можно определить ДНК в растворах, содержащих от 1 до 10мкг ДНК.

Материалы и реактивы. Раствор ДНК (1-10 мкг вещества), 1%-ый раствор солянокислого цистеина, концентрированная H_2SO_4 .

Оборудование. Пробирки, пипетки, водяная баня, спектрофотометр.

Ход работы. К 0,5мл раствора ДНК добавляют 0,05мл раствора солянокислого цистеина и смесь охлаждают в течение 10 мин в холодной воде. Затем добавляют 5мл охлажденной концентрированной серной кислоты и после перемешивания помещают на водяную баню при $25^{\circ}C$ на 20мин. Окрашенный раствор спектрофотометрируют при длине волны 474nm.

Определение содержания РНК

Реактивы: Хлорная кислота, 1М раствор; орциновый реактив.

Оборудование: Штатив с пробирками; пипетки вместимостью 1 и 2мл; водяная баня; спектрофотометр или КФК.

Материалы: РНК стандартный, свежеприготовленный раствор концентрации 1г/л.

Метод основан на образовании окрашенного комплекса рибозы, входящей в состав РНК, с орцином. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации РНК в растворе.

Ход определения. В две пробирки добавляют по 2мл соответственно исследуемого (опытного) и стандартного растворов РНК, приливают по 2мл орцинового реактива и нагревают на кипящей водяной бане 20 мин. Пробы охлаждают.

Фотометрию опытной и стандартной проб проводят против контрольной на ФЭКе при красном светофильтре (длина волны 670nm) в кювете с толщиной слоя 0,5см.

Контрольная проба обрабатывается так же, только вместо раствора РНК используется такое же количество дистиллированной воды.

Расчёт. Концентрацию РНК в опытном образце x (г/л) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{E_{оп}}{E_{ст}}, \text{ где}$$

$E_{оп}$ – экстинкция опытной пробы против контрольной; $E_{ст}$ – экстинкция стандартной пробы против контрольной.

Оформление работы. По экстинкции рассчитать концентрацию опытного образца РНК, указать в выводе возможность количественного определения РНК по орциновой реакции на пентозы.

6.4. Основы метода полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция – это метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул. Открытие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии в конце XX века.

Суть метода заключается в многократном копировании (амплификации) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. Благодаря этому происходит увеличение в миллиарды раз количества специфических фрагментов ДНК, что значительно упрощает дальнейший анализ (рис. 6.9).

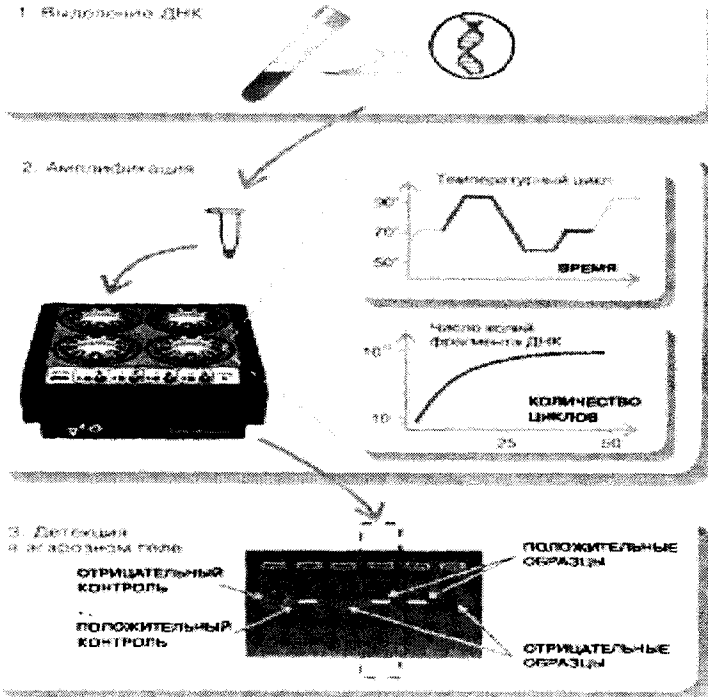


Рис. 6.9. Этапы проведения полимеразной цепной реакции

Комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы носит название репликации ДНК.

Естественная репликация ДНК включает в себя несколько стадий: 1) денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК); 2) образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок, необходимых для

инициации синтеза ДНК); 3) синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих нитей).

Методика проведения анализа с использованием метода ПЦР включает три этапа (рис. 2):

- выделение ДНК (РНК) из клинического образца,
- амплификация специфических фрагментов ДНК,
- детекция продуктов амплификации.

Выделение ДНК (РНК). На данной стадии проведения анализа клиническая проба подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций, и получение раствора ДНК или РНК, свободной от ингибиторов и готовой для дальнейшей амплификации. Выбор методики выделения ДНК (РНК) в основном определяется характером обрабатываемого клинического материала.

Амплификация специфических фрагментов ДНК. На данной стадии происходит накопление коротких специфических фрагментов ДНК в количестве, необходимом для их дальнейшей детекции.

Для проведения амплификации необходимы следующие компоненты: ДНК-матрица (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент); праймеры (синтетические олигонуклеотиды, 20-30 нуклеотидных пар). Выбор специфического фрагмента и подбор праймеров играет важнейшую роль в специфичности проведения амплификации, что сказывается на качестве проведения анализа; смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) (смесь четырех дНТФ, являющихся материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК); фермент Taq-полимераза (термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК); буферный раствор (реакционная среда, содержащая ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания активности фермента) (рис 6.10).



Рис. 6.10. Исходные компоненты ПЦР

Детекция продуктов амплификации. В большинстве методик на данном этапе проводится разделение смеси продуктов амплификации, полученной на 2-ой стадии, методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. До проведения электрофоретического разделения, к амплификационной смеси добавляется раствор бромистого этидия, образующий с двухцепочечными фрагментами ДНК прочные соединения внедрения. Эти соединения под действием УФ облучения

способны флуоресцировать, что регистрируется в виде оранжево-красных светящихся полос после электрофоретического разделения амплификационной смеси в агарозном геле. В качестве альтернативы электрофоретическому методу детекции, имеющему некоторые недостатки: субъективность чтения результатов, ограничения по определению ДНК различных микроорганизмов в одной реакции, могут быть предложены гибридизационные схемы детекции. В этих схемах образующийся в результате амплификации фрагмент ДНК гибридизуется (образует двухцепочечные комплексы - "гибриды") со специфическим олигонуклеотидным зондом. Регистрация таких комплексов может быть проведена колориметрически или флуориметрически.

В настоящее время наиболее быстро развиваются пять основных направлений генодиагностики: диагностика инфекционных заболеваний; диагностика онкологических заболеваний (диагностика лейкозий и лимфом; диагностика рака молочной железы; диагностика других злокачественных заболеваний); диагностика генетических заболеваний; идентификация личности (судебная медицина, криминалистика; трансплантация органов и тканей; определение отцовства); диагностика патогенов в пище.

РАЗДЕЛ 7. ГОРМОНЫ И ВИТАМИНЫ

7.1. Определение гормонов флуориметрическим методом

Определение глюкокортикоидов

Глюкокортикоиды - гормоны, образующиеся в корковом веществе надпочечников. По химической природе являются производными циклопентанопергидрофенантрена. Оказывают регулирующее влияние на углеводный обмен. Содержание глюкокортикоидов в крови повышается при экстремальных, стрессовых ситуациях, физических воздействиях. Концентрация подвержена суточным и сезонным колебаниям.

Метод определения кортикостероидов включает следующие этапы: сбор и хранение материала, выделение из него кортикостероидов (экстракция, очистка экстракта), количественное исследование.

Во время взятия крови необходимо соблюдать следующие условия: устранить все факторы, вызывающие напряжение (стресс); для предотвращения влияния липидов на процесс очистки и экстракции производить взятие крови натощак; ввиду имеющегося суточного ритма содержания кортикостероидов в крови следует стандартизировать время забора крови. Плазму следует отделить от эритроцитов как можно быстрее, после чего ее можно хранить в замороженном состоянии несколько дней.

Стероиды выделяют из крови экстракцией хлороформом. Однако хлороформный экстракт содержит наряду с кортикостероидами значительные количества различных примесей - липидов, пигментов. Поэтому перед проведением количественного определения гормонов требуется очистка экстракта. Для этого экстракцией часть примесей удаляют из биологического материала с помощью гексана. Затем хлороформный экстракт промывают слабым раствором щелочи (2% карбонат натрия).

Определение 11-оксикортикостероидов в плазме

Принцип метода. Флуориметрическое определение базируется на свойстве стероидов флуоресцировать в растворах крепкой серной кислоты и этилового спирта. Причем 95% всей флуоресценции анализируемой плазмы приходится на долю кортизола и кортикостерона.

Реактивы и оборудование: 1. Гексан, дважды перегнанный в колбе с дефлегматором; 2. Хлороформ; 3. 2%-ный раствор карбоната натрия; 4. Серная кислота концентрированная химически чистая, выдерживающая пробу Савалля; 5. 96%-ный этиловый спирт, дважды перегнанный; 6. Смесь спирта и серной кислоты 3:7 по объему (готовится перед использованием: налить в колбу спирт, затем кислоту, перемешать, охладить в воде); 7. Стандартный раствор - 0,1мл гидрокортизона из флакона (концентрация 25мг/мл) развести в 2,5мл спирта; 8) рабочий раствор - 0,1мл стандартного раствора развести в 10мл спирта (10мкг/мл).

Ход работы. В центрифужные пробирки, помещенные в специальный штатив, налить 0,7мл воды и по 0,3мл плазмы. Прилить 3мл гексана. Встряхивать 1 минуту. Тщательно отсосать гексан (верхний слой). К водной фазе добавить 5мл хлороформа. Встряхивать энергично 3 минуты. Удалить водную фазу (верхний слой). Добавить 1мл раствора карбоната натрия. Встряхивать энергично 1 минуту. Удалить водную фазу. Прилить 1мл дистиллированной воды. Встряхивать 1 минуту.

Центрифугировать 10 минут, 1500об/мин. Перенести 4мл хлороформа (нижний слой) в другие центрифужные пробирки. Добавить 5мл смеси спирта с серной кислотой. Встряхивать 1 минуту путем переворачивания штатива. Затем удалить весь хлороформ (верхний слой). Флуориметрировать через час после встряхивания. Светофильтры 436нм (первичный) и 510нм (вторичный).

При выполнении анализов обрабатываются следующие пробы:

1. Стандарт. К 5мл смеси спирта и серной кислоты добавить 0,1мл рабочего раствора гидрокортизона за 1 час до измерения. Тщательно перемешать. Встряхивать с 4мл хлороформа. Хлороформ удалить.

2. Контроль. 5мл смеси спирта и серной кислоты встряхивать с 4мл хлороформа. Хлороформ удалить

3. О п ы т.

Расчет производят по формуле:

$$x = 4,2 \cdot \frac{E_{оп} - K}{E_{Ст} - K},$$

где x - определяемая концентрация кортикостероидов в плазме, мкг/мл; $E_{оп}$ - флуоресценция опытной пробы, K - флуоресценция контроля, $E_{Ст}$ - флуоресценция стандартной пробы.

Надпочечник взвешивают и гомогенизируют в 2мл 15%-ного этилового спирта.

Печень (500мг) гомогенизируют в 5мл 15%-ного этилового спирта.

При расчетах учитывают разведение.

Определение катехоламинов

Катехоламинами называют адреналин, норадреналин и дофамин, поскольку их можно рассматривать как производные катехола или 1,2-дигидроксибензола. Исследование катехоламинов включает следующие этапы: сбор и хранение материала, выделение из него изучаемых веществ и их количественное определение. Катехоламины быстро разрушаются в щелочной и нейтральной среде и относительно долго сохраняются в кислой среде, особенно при замораживании. Поэтому мочу для анализа собирают в сосуд с серной кислотой, кровь - с хлорной или трихлоруксусной кислотами, органы и ткани гомогенизируют с теми же кислотами. Выделяют катехоламины путем адсорбции на окиси алюминия.

Исследование спектра флуоресценции катехоламинов

Принцип метода: Окисленные производные катехоламинов превращаются в флуоресцирующие соединения в щелочной среде. С целью предотвращения их быстрого разрушения добавляется аскорбиновая кислота. Для раздельного определения концентрации адреналина, норадреналина и ДОФА используются различия в интенсивности их флуоресценции при разных длинах волн.

Реактивы: 1. 5Н раствор уксусной кислоты (165мл ледяной уксусной кислоты довести до 500мл водой, оттитровать); 2. 0,25Н раствор уксусной кислоты (25мл 5Н уксусной кислоты довести до 500мл водой); 3. 0,33М раствор фосфата натрия (64г 12-водной соли растворить в воде, довести до 500мл); 4. 0,1Н йод - готовить из фиксанала (1 ампулу - до 500мл); 5. Сульфит натрия безводный; 6. 5Н раствор гидроксида натрия (200г растворить в воде, довести до 1л); 7. Щелочной сульфит (500мг щелочного сульфита растворить в 2мл воды, добавить 18мл 5Н раствора

гидроксида натрия, перемешать, прилить 20мл 5%-ного раствора ЭДТА, перемешать, готовить перед использованием); 8. Адреналин - 0,2мл 0,1%-ного раствора (из ампулы) растворить в 10мл 1Н соляной кислоты (готовится из фиксанала), концентрация - 20мкг/мл - стандартный раствор, хранить 2-3 недели плотно закрытым; 9. Норадреналин - 0,1мл 0,2%-ного раствора (из ампулы) растворить в 10мл 1Н соляной кислоты, концентрация - 20мкг/мл - стандартный раствор, хранить 2-3 недели плотно закрытым; 10. Дофамин - 1мг дофамина растворить в 1мл воды, 0,2мл этого раствора в 10мл 1Н соляной кислоты - стандартный раствор, концентрация - 20мкг/мл, хранить 2-3 недели плотно закрытым; 11. Диоксифенилаланин (ДОФА) - 1мг ДОФА растворяют в 1мл концентрированной соляной кислоты, 0,2мл этого раствора в 10мл 1Н соляной кислоты - стандартный раствор, концентрация - 20мкг/мл, хранить 2-3 недели плотно закрытым.

Ход работы. К 1мл стандартных растворов добавить по 4мл дистиллированной воды, перемешать. 1мл полученного раствора прилить к 9мл 0,25Н. уксусной кислоты, перемешать. Разлить этот раствор по 3мл в 3 пробирки - 2 опытных и 1 контрольную. В опытные пробирки добавить по 1,2мл раствора фосфата натрия, перемешать. Приготовить щелочной сульфит в нужном количестве. Прилить 0,1мл раствора йода, перемешать. Если проб много, последний этап методики (пункт 10) выполнять с 5-7 пробирками в несколько приемов. Добавить 1мл щелочного сульфита, перемешать. Немедленно, не позднее, чем через 2 минуты прилить 0,5мл 5Н уксусной кислоты, тщательно перемешать. Для приготовления контрольных проб (5) смешать в колбе 6мл фосфата натрия, 0,5мл йода, 5мл щелочного сульфита, 2,5мл 5Н уксусной кислоты. Разлить полученную смесь в контрольные пробирки по 2,8мл, перемешать. Поместить все пробирки в кипящую водяную баню на 5 минут. Затем охладить в воде со льдом. Флюоресценцию измерять не позднее, чем через час при следующих длинах волн возбуждения и флуоресценции соответственно: 313нм и 365нм; 313нм и 405нм; 313нм и 436нм; 365нм и 470нм; 405нм и 470нм; 436нм и 470нм; 365нм и 510нм; 405нм и 510нм; 436нм и 510нм.

7.2. Спектрофотометрическое определение гормонов

Определение 17-оксикортикостероидов в моче по реакции с фенолгидразином после ферментативного гидролиза

Принцип метода основан на измерении количества окрашенных веществ, образующихся в результате реакции между фенолгидразином и 17,21-диоксиацетоновой группировкой молекулы стероида в кислой среде. Глюкуроиды 17,21-диокси-20-кетостероидов освобождаются из связанного состояния путем ферментативного гидролиза β-глюкуронидазой.

Реактивы. 1. Хлороформ х. ч., свежеперегнанный; 2. 0,1Н раствор едкого натра; 3. 2Н раствор едкого натра; 4. Солянокислый фенолгидразин, дважды перекристаллизованный из спирта, последнюю перекристаллизацию проводят из очищенного этилового спирта (5-10г вещества растворяют в 30-40мл этанола при нагревании, непрерывно встряхивая сосуд круговыми движениями и периодически делая перерывы на 20-30с, охлаждают содержимое вначале при комнатной температуре, а затем в холодильнике (не менее 1ч) до полной кристаллизации,

кристаллы переносят в бюchnerовскую воронку с двумя бумажными фильтрами, высушивают под вакуумом, который создают в колбе Бунзена, процедуру повторяют от начала до конца еще раз, высушивают фенилгидразин до постоянного веса, хранят в темноте в эксикаторе на протяжении 2-3мес.); 5. Разбавленная серная кислота (310мл концентрированной серной кислоты, выдерживающей пробу Саваяля, приливают осторожно к 190мл дистиллированной воды); 6. Серно-спиртовой реактив (100мл разбавленной серной кислоты смешивают с 150мл абсолютного этилового спирта); 7. Этиловый спирт очищенный; 8. Фенилгидразиновый реактив (21,7г солянокислого фенилгидразина, дважды перекристаллизованного из спирта, растворяют в 50мл спиртового раствора серной кислоты); 9. Ацетатный буфер, pH 4,5 (5,79г уксуснокислого натрия растворяют в 10мл дистиллированной воды, добавляют 3,25мл ледяной уксусной кислоты и смесь доводят до 1л дистиллированной водой); 10. Стандартный раствор кортизона или гидрокортизона (20мкг в 1мл) – навеску в 1мг стандарта растворяют в 50 мл хлороформа, стандартный раствор держат в стеклянной посуде, обернутой черной светонепроницаемой бумагой, в холодильнике; 11. Безводный сернокислый натрий ч. д. а. или х.ч. 12. 2 н раствор соляной кислоты; 12. β -Глюкуронидаза с активностью не менее 100000ед. в 1г препарата. Перед анализом навеску порошка β -глюкуронидазы, содержащую 500ед. активности на 1мл мочи, растворяют в центрифужной пробирке в 11мл дистиллированной воды, периодически помещивая ее содержимое в течение 30мин. Центрифугированием при 3000об/мин на протяжении 1-2мин отделяют осадок. Раствор готовят перед применением в соответствии с количеством мочи, подлежащей обработке. Порошок хранят в холодильнике в посуде с притертой пробкой.

Ход определения. Измеряют суточное количество мочи и отбирают 50мл. pH мочи доводят до 6,5, добавляя каплями в пробу 2Н NaOH или 2Н HCl (при этом допустимо пользоваться универсальной индикаторной бумагой). Из этой пробы в две колбы вносят по 10мл подкисленной мочи (для установления свободных 17-ОКС). К ним доливают по 5мл ацетатного буфера и пробы помещают до следующего дня в холодильник для дальнейшей обработки. Затем в две колбы приливают еще по 5мл подкисленной мочи (для определения связанных 17-ОКС). Эти пробы кипятят в течение 5мин для удаления ингибитора фермента, прикрывая их воронками, чтобы не выпаривалась вода. После этого охлаждают их до комнатной температуры и добавляют в каждую колбу по 5мл ацетатного буфера, по 5мл раствора β -глюкуронидазы. Пробы ставят в термостат на 16-20ч при температуре +37⁰С.

Для экстракции кортикостероидов из мочи хлороформом все 4 пробы (2 колбы мочи без гидролиза и 2 – после гидролиза) переносят в делительные воронки (емкостью 150мл) и доливают к ним по 75мл (5-кратный объем) очищенного и дважды перегнанного хлороформа. При отсутствии делительных воронок экстракционные процедуры можно проводить в самих колбах. Хлороформ вливают порциями, обмывая им внутренние стенки колбы (для более полного использования мочи). Делительные воронки плотно закрывают пробками, энергично встряхивают в течение 2мин и оставляют в штативах для расслаивания фаз. Затем удаляют верхний слой мочи обычным сливанием (если экстракцию осуществляют в делительных воронках) или осторожным отсасыванием капиллярной пипеткой с помощью водоструйного насоса, начиная с проб без гидролиза. Энергичным встряхиванием промывают хлороформные экстракты сначала 7,5мл 0,1Н раствора NaOH, а затем (после расслаивания фаз) 3мл воды. После встряхивания в течение 15с верхний слой удаляют. Для освобождения от остатков воды к пробам

прибавляют по 2г безводного серноокислого натрия. Колбы плотно закрывают пробками и вновь встряхивают. Ставят в холодильник на 2ч (или до следующего дня). После этого отмеривают цилиндром в чистые круглодонные колбы с притертыми пробками по 50мл каждого хлороформного экстракта (2/3 от цельного количества), осторожно сливая хлороформ с осадка или отфильтровывая его от порошка серноокислого натрия.

Экстракцию хлороформных экстрактов мочи и стандартного вещества фенилгидразиновым реактивом, развитие окраски проб осуществляют исходя из того, что из имеющихся двух проб мочи без гидролиза и двух проб мочи после гидролиза каждая первая проба будет служить контрольной на неспецифическую окраску, развивающуюся от действия серной кислоты. Поэтому к каждой первой пробе прибавляют по 4 мл спиртового раствора серной кислоты без фенилгидразина, а к каждой второй пробе и стандартному раствору (1мл стандартного раствора выпаривают досуха, а затем растворяют в 50мл хлороформа) приливают по 4мл спиртового раствора серной кислоты с фенилгидразином. Все колбы плотно закрывают притертыми пробками и энергично встряхивают на протяжении 2мин. Оставляют их в штативе для расслаивания фаз, а затем капиллярной пипеткой, соединенной с водоструйным насосом, отсасывают нижний хлороформный слой (из-за опасности отсосать верхний слой перед опусканием пипетки в раствор зажимают каучуковый шланг, соединяющий пипетку с водоструйным насосом, отпускают шланг только тогда, когда пипетка коснется дна колбы). Для развития окраски все пробы с реактивами инкубируют в водяной бане при +60°С в течение 20мин, затем охлаждают в водопроводной воде.

Измерение интенсивности окраски производят на спектрофотометре в кюветках с толщиной слоя 10мм (общий объем кюветы – 4мл) при длине волны 410нм или на ФЭКе с синим светофильтром. Компенсационной жидкостью служит чистый реактив - спиртовой раствор серной кислоты. Оптическую плотность опытных проб и стандартного раствора измеряют путем сравнения с экстинкцией спиртового раствора серной кислоты с фенилгидразином.

Сначала рассчитывают количество свободных 17-ОКС.

Содержание свободных 17-ОКС в пробе (без гидролиза) находят из соотношения:

$$\frac{C_1}{E_1 - E_2} = \frac{C}{E_3}$$

где C_1 - количество 17-ОКС в пробе без гидролиза (мкг); E_1 - оптическая плотность опытной пробы без гидролиза; E_2 - оптическая плотность контрольной пробы без гидролиза; E_3 - оптическая плотность стандартного раствора (за вычетом экстинкции контрольной пробы к стандартной); C - количество стандарта (мкг).

Если отношение $\frac{C}{E_3}$ выразить через Q , то формула приобретет вид:

$$C_1 = (E_1 - E_2) \cdot Q.$$

Количество свободных 17-ОКС в суточной моче рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{C_1 \cdot a}{10 \cdot 2/3 \cdot 1000}, \text{ или } \frac{C_1 \cdot 3 \cdot a}{10 \cdot 2 \cdot 1000}$$

где x - количество свободных 17-ОКС в суточной моче (мг); $\frac{C_1}{10 \cdot 2/3}$ - содержание (мкг) свободных 17-ОКС в 1 мл мочи (10 - количество мочи (мл) в пробе; 2/3 - часть хлороформного экстракта, использованного для анализа); a - суточное количество мочи (мл); 1000 - коэффициент для перевода из мкг в мг.

Количество суммарных 17-ОКС (мкг) в пробе рассчитывают по той же формуле, что и для свободных.

$$C_2 = (E_{\text{оп. проба с гидрол.}} - E_{\text{к. проба после гидрол.}}) \cdot Q.$$

Экскрецию суммарных 17-ОКС с суточной мочой (мг) находят следующим образом:

$$x = \frac{C_2 \cdot a}{5 \cdot 2/3 \cdot 1000}, \text{ или } \frac{C_2 \cdot 3 \cdot a}{5 \cdot 2 \cdot 1000}$$

где x - количество суммарных 17-ОКС в суточной моче (мг); $\frac{C_2}{5 \cdot 2/3}$ - содержание (мкг) суммарных 17-ОКС в 1 мл мочи.

Для перевода размерности мг/сут в мкмоль/сут первый показатель умножают на коэффициент 2,76. Уровень суточной экскреции свободных 17-ОКС колеблется в норме от 0,04 до 0,28 мг/сут (0,38 мкмоль/сут). Содержание суммарных 17-ОКС в суточной моче варьирует от 1,31 до 7,39 мг (3,6 - 20,4 мкмоль), в среднем 3,7 мг (10,2 мкмоль). Как видно, на долю свободных 17-ОКС в моче приходится от 1 до 7% от общего их количества.

7.3. Система ацетилхолин-ацетилхолинэстеразы

Ацетилхолин является медиатором холинэргических синапсов, осуществляя взаимодействие между нервными клетками, а также между нервными окончаниями и эффекторными клетками.

Определение активности ацетилхолинэстеразы в плазме крови

Принцип метода. В щелочной среде при взаимодействии ацетилхолина с гидроксиламином образуется ацетилгидроксамовая кислота, которая в кислой среде реагирует с ионами трехвалентного железа с образованием окрашенного комплекса. Оптическая плотность продукта реакции пропорциональна концентрации ацетилхолина. Активность ацетилхолинэстеразы определяется по разности концентраций ацетилхолина до и после инкубации в течение определенного времени.

Реактивы: 1. 1/15М фосфатный буферный раствор, pH 7,8 (11,9г двузамещенного фосфата натрия двухводного растворить в воде, довести до 1л; 9,1г однозамещенного фосфата калия растворить в воде, довести до 1л, смешать

91,5мл первого раствора и 8,5мл второго, проверить на pH-метре); 2. 0,35%-ный раствор ацетилхолина хлористого – 0,2г (1 ампула) растворить в 57,1мл воды; 3. 2М раствор гидроксиламина хлористого (13,9г реактива растворить в воде, довести до 100мл); 4. 50%-ная трихлоруксусная кислота; 5. 3,5Н раствор гидроокиси натрия; 6. Смесь 2М гидроксиламина и 3,5Н гидроокиси натрия в соотношении 1:1 (готовить перед использованием); 7. 12%-ная соляная кислота (К 300мл воды прилить 150мл концентрированной соляной кислоты); 8. 0,37М хлорное железо (30г хлорного железа шестиводного растворить в 0,1Н соляной кислоте, довести до 500мл).

Ход определения 1. В центрифужные пробирки налить по 1,5мл фосфатного буфера, 1,5мл воды, 0,1мл плазмы, перемешать. Быстро добавить по 1,5мл ацетилхолина, перемешать. Поместить на 30 минут в водяную баню (37° С). Прилить 0,5мл 50%-ной трихлоруксусной кислоты, перемешать палочкой. Центрифугировать 15 минут, 1500об/мин. Перенести 0,5мл надосадочной жидкости в чистые пробирки, добавить 1мл смеси гидроксиламина и гидроокиси натрия, перемешать. Через 2 минуты прилить 0,5 мл 12%-ной соляной кислоты. Перемешать. Добавить 0,5мл 0,37М хлорного железа. Перемешать. Через 15 минут измерить оптическую плотность на ФЭКе, светофильтр зеленый (540нм), кювета – 5мм.

При выполнении анализа обрабатываются следующие пробы:

1. Стандарт. Вместо 0,1мл плазмы (пункт 1) добавить 0,1мл воды (2 пробы).
2. Контроль. К 0,5мл надосадочной жидкости (пункт 5) прилить те же реактивы в обратном порядке (1 проба). После добавления каждого реактива перемешивать.
3. Опыт.

Расчет производят по формуле:

$$x = (E_{St} - E_{Op}) \cdot 23,46,$$

где X - определяемая активность АХЭ, мкмоль/мл.мин; E_{St} - оптическая плотность стандартной пробы (против контроля), E_{Op} - оптическая плотность опытной пробы.

При определении ацетилхолинэстеразы в плазме крови животных с низкой активностью фермента - крыс, морских свинок, кроликов, состав инкубационной смеси следующий: 0,5мл фосфатного буфера, 0,5мл воды, 0,1мл плазмы, 0,5мл ацетилхолина. Для остановки реакции добавляют 0,2мл 50% трихлоруксусной кислоты. Далее анализ выполняется по вышеописанному методу.

Формула для расчета:

$$x = (E_{St} - E_{Op}) \cdot 8,29.$$

7.4. Определение гормонов методом ИФА

Иммуноферментный анализ (ИФА) основан на высокой избирательности и специфичности иммунологических реакций «антиген-антитело». Аналитической мишенью для антител тест-систем могут быть иммуноглобулины А, М, G, E, гормоны, липопротеины и антигены инфекционных возбудителей и другие высокомолекулярные биологические соединения. Фермент (пероксидаза хрена), присоединенный к антителам тест-систем, катализирует химическую реакцию окисления какого-либо пигмента-индикатора (хромогена). Произошедшая цветовая реакция пропорциональна предшествующей иммунологической, что позволяет выявить и количественно измерить искомый антиген или антитело.

ИФА проводится с помощью тест-систем, основными компонентами которых являются планшет, состоящий из лунок стрипов с сорбированными антителами (или антигенами), конъюгат фермента с антителами и хромоген. Измерения проводятся на спектрофотометре вертикального сканирования.

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках; не пипетировать растворы ртом; все использованные материалы подвергать обработке 6%-ным раствором перекиси водорода (не менее 6 часов).

Допускается использование образцов, хранившихся при 2-8°C не более 5 суток, либо при минус 20±3°C, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

Перед постановкой реакции компоненты тестсистемы необходимо выдержать не менее 30 мин при 18-25°C.

При использовании автоматического промывателя необходимо следить за состоянием ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно ёмкость для промывочного раствора и шланги промывать 70%-ным спиртом.

Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (буферные растворы и стоп-реагент).

Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными. Раствор стоп-реагента обладает раздражающим действием. Необходимо избегать разбрызгивания и попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

Оборудование, необходимое для проведения ИФА:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности раствора в лунках планшета при длинах волн 450nm и 620–650nm;

- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37±1°C и 500–700об/мин;

- пипетки полуавтоматические одноканальные и многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20, 50, 100, 250 и 1000мкл;

- флаконы стеклянные вместимостью 10–15мл;

- цилиндр мерный вместимостью 500мл;

- колба вместимостью 1000мл;

- вода дистиллированная;

- перчатки резиновые или латексные;

- бумага фильтровальная лабораторная.

Методы определения основаны на твердофазном ИФА с применением двух типов моноклональных антител с различной специфичностью к гормонам.

Количественное определение концентрации пролактина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуоферментного анализа

Пролактин (лактогенный гормон) – полипептид с молекулярной массой около 23кДа, секретирующийся лактотрофными клетками передней доли гипофиза. Основная физиологическая функция пролактина – стимуляция роста молочной железы и поддержание процесса лактации. При беременности уровень пролактина постепенно повышается, достигая значений в 10–20 раз превышающих норму. В период кормления грудью отмечается высокий базальный уровень гормона. Концентрация пролактина у здоровых доноров в возрасте 20–50 лет находится в интервале: для мужчин 27–600мМЕ/л, для женщин 69–750мМЕ/л.

Принцип метода. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата моноклональных антител во время инкубации одновременно происходит связывание пролактина с моноклональными антителами, иммобилизованными на лунках планшета, и конъюгатом моноклональных антител с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации пролактина в анализируемых пробах.

Реактивы и оборудование:

- планшет разборный (12 восьмилучных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к пролактину;
- калибровочные пробы, содержащие известные количества пролактина;
- контрольный образец с известным содержанием пролактина;
- концентрат конъюгата моноклональных антител к пролактину с пероксидазой хрена;
- раствор для разведения сывороток;
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСБ-Т×25), концентрат;
- субстратный буферный раствор (СБР);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат;
- стоп-реагент;
- пленка для заклеивания планшета;
- трафарет для построения калибровочного графика.

Ход определения. Вскрыть пакет и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Приготовить необходимое количество рабочего буферного раствора согласно данным таблицы 1 расхода компонентов. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов отобрать в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ-Т) и довести до соответствующего объема дистиллированной водой. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30–40°C до полного растворения осадка.

Приготовить необходимое количество конъюгата. В соответствии с числом используемых стрипов в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата (РПК), добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Внесите в соответствующие лунки в дублях по 20мкл каждой калибровочной пробы и по 20мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 20мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Во все лунки внести по 200мкл рабочего раствора конъюгата. Внесение образцов необходимо производить быстро. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере (600об/мин) при температуре 37°C.

По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием; промыть, добавляя во все лунки по 250мкл рабочего буферного раствора, с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повторить 5 раз. После промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Расход компонентов набора при определении пролактина

кол-во стрипов	рабочий буферный раствор		раствор конъюгата		Раствор ТМБ	
	ФСБ-т, концентрат, мл	дистил. вода, мл	конъюгат, концентрат, мл	рабочий буферный раствор, мл	ТМБ, концентрат, мл	СБР, мл
2	4,0	96	0,4	4,0	0,14	2,0
3	6,0	144	0,6	6,0	0,21	3,0
4	8,0	192	0,8	8,0	0,28	4,0
5	10,0	240	1,0	10,0	0,35	5,0
6	12,0	288	1,2	12,0	0,42	6,0
7	14,0	336	1,4	14,0	0,49	7,0
8	16,0	384	1,6	16,0	0,56	8,0
9	18,0	432	1,8	18,0	0,63	9,0
10	20,0	480	2,0	20,0	0,70	10,0
11	22,0	528	2,2	22,0	0,77	11,0
12	24,0	576	2,4	24,0	0,84	12,0

Внести во все лунки по 100мкл рабочего раствора тетраметилбензидина и инкубировать в темноте в течение 15 мин при температуре 18–25°C.

Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15сек; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–650нм.

Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10мин.

Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации пролактина в калибровочных пробах (мМЕ/л).

Определить содержание пролактина в контрольном образце и анализируемых образцах сыворотки крови по калибровочному графику. В случае предварительного разведения анализируемых образцов необходимо полученную концентрацию пролактина умножить на фактор разведения.

Краткая схема проведения ИФА

Внести:	по 20мкл контрольного образца и калибровочных проб и 20мкл анализируемых сывороток крови.
Внести:	по 200мкл рабочего раствора конъюгата.
Инкубировать:	60мин, 37°С, 600об/мин.
Промыть:	рабочий буферный раствор – 5 раз.
Внести:	по 100мкл рабочего раствора тетраметилбензидина.
Инкубировать:	15мин, 18–25°С.
Внести:	по 100мкл стоп-реагента.
Измерить:	референсная длина волн 620–650нм / ОП при 450нм

Иммуноферментное определение концентрации тиреотропного гормона в сыворотке (плазме) крови

Тиреотропный гормон (ТТГ) представляет собой гормон гликопротеиновой природы с молекулярной массой около 30кДа, состоящий из α - и β -субъединиц. Биологическая активность ТТГ обусловлена его β -субъединицей. ТТГ секретируется передней долей гипофиза и стимулирует синтез и высвобождение гормонов щитовидной железы. Гипофизарная секреция тиреотропного гормона крайне чувствительна к изменению концентрации трийодтиронина и тироксина. Количественное определение содержания ТТГ в сыворотке (плазме) крови человека имеет диагностическое значение при оценке тиреоидного статуса организма и может быть использовано для диагностики функциональных нарушений щитовидной железы, гипотиреоза, гипертиреоза, а также для наблюдения за состоянием пациента после заместительной терапии и скрининга врожденного гипотиреоза. Средняя концентрация ТТГ в сыворотке (плазме) крови здоровых людей в возрасте 20–50 лет составляет 1,37 мМЕ/л (0,3–4,0 мМЕ/л)

Принцип метода. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и раствора для разведения сывороток во время первой инкубации происходит связывание ТТГ с моноклональными антителами к бета-субъединице тиреотропного гормона, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к α -субъединице тиреотропного гормона с пероксидазой связывается с ТТГ, иммобилизованным в ходе первой инкубации. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ТТГ в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрации ТТГ в анализируемых образцах.

Реактивы и оборудование:

- планшет разборный (12 восьмилучных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к ТТГ;
- стандартные калибровочные пробы, содержащие известные количества ТТГ;
- контрольный образец с известным содержанием ТТГ;
- конъюгат моноклональных антител к ТТГ с пероксидазой хрена, концентрат;
- раствор для разведения сывороток (PPC);
- раствор для разведения конъюгата (PPK);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25);

- субстратный буферный раствор (СБР);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат;
- стоп-реагент;
- пленка для заклеивания планшета;
- трафарет для построения калибровочного графика;
- инструкция;
- пластиковая ванночка для реагента;
- наконечники для пипеток.

Ход определения. Вскрыть пакет и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Приготовить необходимое количество рабочего буферного раствора согласно данным таблицы 2 расхода компонентов.

Внести во все лунки по 50мкл раствора для разведения сывороток.

Внести в соответствующие лунки в дублях по 100мкл каждой стандартной калибровочной пробы и по 100мкл контрольного образца.

В остальные лунки внести в дублях по 100мкл анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°С, с интенсивностью перемешивания 300–400об/мин.

По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием и промыть, добавляя во все лунки по 350мкл рабочего промывочного раствора с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повторить 3 раза. После каждой промывки следует тщательно удалять остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Приготовить необходимое количество конъюгата в соответствии с числом используемых стрипов (табл.).

Внести в соответствующие лунки в дублях по 100мкл каждой стандартной калибровочной пробы и по 100мкл контрольного образца.

В остальные лунки внести в дублях по 100мкл анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°С, с интенсивностью перемешивания 300–400об/мин.

По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием и промыть, добавляя во все лунки по 350мкл рабочего промывочного раствора с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повторить 3 раза. После каждой промывки следует тщательно удалять остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

За 10–15мин до окончания инкубации приготовить рабочий раствор ТМБ в зависимости от числа используемых стрипов.

По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз рабочим промывочным раствором и 1 раз – дистиллированной водой.

Внести во все лунки по 100мкл рабочего раствора ТМБ, закрыть планшет пленкой и инкубировать в темноте в течение 10–15мин при встряхивании на шейкере температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 300–400об/мин.

Внести во все лунки с той же скоростью в той же последовательности, как и рабочий раствор ТМБ, по 100мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15сек; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на

кол-во стрипов	раствор конъюгата		рабочий раствор ТМБ		рабочий промывочный раствор	
	конъюгат, концентрат, мл	РРК, мл	ТМБ, концентрат, мкл	СБР, мл	ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил. вода мл
2	0,2	2,0	140	2,0	4,0	96
3	0,3	3,0	210	3,0	6,0	144
4	0,4	4,0	280	4,0	8,0	192
5	0,5	5,0	350	5,0	10,0	240
6	0,6	6,0	420	6,0	12,0	288
7	0,7	7,0	490	7,0	14,0	336
8	0,8	8,0	560	8,0	16,0	384
9	0,9	9,0	630	9,0	18,0	432
10	10	10,0	700	10,0	20,0	480
11	11	11,0	770	11,0	22,0	528
12	12	12,0	840	12,0	24,0	576

фотометре вертикального сканирования при длине волны 450нм. Измерение проводить через 2–3мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10мин.

Построить в линейных координатах для калибровочных проб график зависимости оптической плотности (ед. оп. плотн.) от заданной концентрации ТТГ в калибровочных пробах (мМЕ/л). Определить концентрацию ТТГ можно автоматически, используя аппроксимирующую функцию спектрофотометра «Point to Point».

Определить содержание ТТГ в контрольной сыворотке и анализируемых пробах по калибровочному графику. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации ТТГ в контрольном образце. Если концентрация ТТГ в анализируемых образцах сыворотки (плазмы) крови превышает 20мМЕ/л, образец следует развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20мкл исследуемого образца + 380мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

7.5. Определение витаминов на анализаторе жидкости "Флюорат-02-3М"

Измерение массовой доли витамина С

Принцип метода. Метод основан на экстракции витамина С, обработке экстракта активированным углем с целью его очистки и одновременного окисления

аскорбиновой кислоты в дигидроаскорбиновой (ДА) и последующим проведением реакции с о-фенилендиамином в слабокислой среде с образованием флуоресцирующего продукта.

Реактивы. 1. Аскорбиновая кислота; 2. о-Фенилендиамин гидрохлорид; 3. Фосфорный ангидрид; 4. Натрий уксуснокислый трехводный, х.ч.; 5. Уголь активированный; 6. Кислота азотная, х.ч.; 7. Кислота соляная, 0,1М; 8. Кислота борная, ч.д.а.; 9. Кислота уксусная, х.ч.

Ход работы.

Приготовление реактивов.

1. Раствор о-фенилендиамина (ОФДА): 0,1г гидро-5-хлорида ОФДА растворяют в 100мл дистиллированной воды, раствор хранить в холодильнике не более 3суток, при появлении окраски раствор считается непригодным; 2. 50%-ный раствор ацетата натрия: 50г трехводного ацетата натрия растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу вместимостью 100мл, доводят до метки дистиллированной водой и при необходимости фильтруют, срок хранения раствора специально не устанавливается, признаком его непригодности является появление хлопьев или мути; 3. Смесь борной кислоты и ацетата натрия: 3г борной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100мл, растворяют ее в небольшом количестве раствора ацетата натрия и разбавляют этим раствором до метки, смесь готовят непосредственно перед проведением анализа; 4. Подготовка активированного угля: смесь 20г угля и 100мл концентрированной азотной кислоты кипятят в течение 10мин (в вытяжном шкафу!) и фильтруют, уголь переносят в стакан, перемешивают не менее 5 раз с 200мл дистиллированной воды, декантируя жидкость, при необходимости операцию промывки водой повторяют до достижения рН промывных вод - 5-7 (контроль по универсальному индикатору), отфильтрованный уголь сушат в сушильном шкафу при 115°C в течение 12ч; 5. Экстрагирующий раствор - в стакан вместимостью 500мл помещают 40мл концентрированной уксусной кислоты и осторожно, малыми порциями вносят 15г фосфорного ангидрида, новую порцию фосфорного ангидрида вносят только после растворения предыдущей, затем осторожно, небольшими порциями при энергичном перемешивании добавляют 200мл дистиллированной воды, переносят в мерную колбу вместимостью 500мл и доводят объем дистиллированной водой до метки, раствор хранить в бутылки с притертой пробкой в течение недели в холодильнике; 6. Растворы аскорбиновой кислоты с массовой концентрацией 1 и 0,05мг/мл: в мерной колбе вместимостью 100мл растворяют 0,1г аскорбиновой кислоты в экстрагирующем растворе и затем доводят тем же раствором до метки, концентрация полученного раствора равна 1мг/мл, срок хранения в холодильнике - не более 3 дней; с помощью пипетки отбирают 5мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 100мл и доводят экстрагирующим раствором до метки, концентрация раствора 0,05мг/мл, раствор неустойчив и должен быть приготовлен непосредственно перед проведением анализа.

Отбор проб и подготовка экстрактов

1. Для расчета ориентировочной величины навески исследуемых образцов (пробы пищевых продуктов и пищевого сырья) можно использовать формулу: $M = 0,05 \cdot V_2 / CN$; (г)

где M - навеска продукта, г;

V₂ - общий объем получаемого экстракта, мл (обычно 50мл);

CN - нормативное или предполагаемое содержание витамина С в продукте,

мг/г.

Ориентировочные величины навесок для различных образцов продуктов: печень – 1,5г, мясо – 25-30г, молоко – 35-40мл, капуста белокочанная – 1г, лук репчатый – 10-15г, лук зеленый – 2г, картофель – 2-5г, перец зеленый – 1г, лимон – 0,5г, яблоко – 1,5г, томаты – 1,5г, смородина черная – 2,5г. Желательно проанализировать не менее двух параллельных проб.

2. Приготовление экстракта: навеску исследуемого продукта гомогенизируют 25 мл экстрагирующего раствора, полученный гомогенат, включая мякоть, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл (объем колбы – это величина V_2 в формуле для расчета величины навески), доводят содержимое колбы до метки экстрагирующим раствором, перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр. При анализе сухих продуктов гомогенат после измельчения настаивают 15-26мин.

Ход определения.

1. Обработка экстракта активированным углём: в стакан вместимостью 100мл вносят 25мл испытуемого экстракта, в другой стакан – 25мл раствора аскорбиновой кислоты с концентрацией (0,05мг/мл), добавляют в каждый стакан по 1г активированного угля, тщательно перемешивают растворы в каждом стакане и оставляют на 5мин, фильтруют через сухие фильтры "красная лента", отбрасывая первые порции фильтрата.

2. Приготовление анализируемого и градуировочного растворов: в две пробирки помещают по 5мл раствора ацетата натрия, затем в одну из них прибавляют 5 мл анализируемого фильтрата (№ 1), в другую – 5мл фильтрата градуировочного раствора аскорбиновой кислоты (№ 2), полученных после о углем, одновременно в две другие пробирки вносят по 5мл смеси борной кислоты и ацетата натрия; в одну из пробирок добавляют 5мл фильтрата анализируемой пробы (№ 3), а в другую 5мл фильтрата градуировочного раствора (№ 4), полученных после обработки углём; смеси во всех пробирках перемешивают и выдерживают 15мин, периодически взбалтывая.

3) Проведение реакции с ОФДА: в каждую из пробирок (№1,2,3,4) добавляют по 5мл раствора ОФДА и тщательно перемешивают, выдерживают пробирки в темноте 35мин.

4) Измерение флуоресценции проб проводят с использованием светофильтров С-1 (возбуждение) и С-2 (регистрация).

Концентрация витамина С в анализируемом экстракте определяется по следующей формуле:

$$C = C_{ст} * (\Phi_1 - \Phi_3) / (\Phi_2 - \Phi_4),$$

где $C_{ст}$ - концентрация витамина С в градуировочном растворе, $\Phi_1 - \Phi_4$ – флуоресценция соответствующих проб; С - концентрация витамина С в анализируемом экстракте, мг/мл.

Массовую долю витамина С в пробе (X, мг/г) вычисляют по формуле:

$$X = C * V/m$$

где V - объем экстрагирующего раствора, мл; m - величина навески, г.

Диапазон измеряемых массовых концентраций витамина С в экстракте – 0,01 – 0,1мг/мл, что при навеске 1 – 50г соответствует массовой доле 0,01 – 5,0мг/г.

Определение витамина В₁ (тиамина)

Принцип метода: основан на кислотном и ферментативном гидролизе связанных форм витамина, окислении тиамина в тиохром и измерении интенсивности флуоресценции при длинах волн 320–390нм возбуждающего и 400–580нм излучаемого света.

Реактивы. 1. 1%-ный калий железосинеродистый; 2. 0,1М HCl и кислота соляная, объемной долей 50%; 3. Кислота уксусная, ледяная и раствор с массовой долей 3%; 4. 10 и 30 %-ная Натрия гидроокись; 5. Насыщенный раствор натрия уксуснокислого 3-водного; 6. Препарат ферментный амилоризин П10Х; 7. Спирт изобутиловый (или н-бутиловый, изоамиловый), перед использованием измеряют интенсивность флюоресценции, при наличии флюоресценции спирт очищают перегонкой; 8. Спирт этиловый ректификованный; 9. Тиамин хлорида (или тиамин бромид) раствор 0,1; 0,001; 0,0001г/л 10. Фермент пепсин.

Ход работы.

1. Приготовление стандартного раствора тиамин: тиамин предварительно высушивают в течение 2ч в сушильном шкафу при 100°C, раствор с массовой концентрацией 0,1г/л хранят в темной склянке в холодильнике в течение месяца, растворы с массовыми концентрациями 0,01 и 0,0001 г/л готовят в день проведения анализов.

Для приготовления раствора с массовой концентрацией 0,1г/л растворяют 0,1г тиамин в дистиллированной воде в мерной колбе на 1000мл, прибавляют 10 капель концентрированной соляной кислоты, доводят до метки водой и перемешивают. Для приготовления раствора тиамин с массовой концентрацией 0,001г/л и 0,0001г/л полученный раствор разбавляют в 100 и 1000 раз соответственно.

2. Приготовление окислительной смеси: окислительную смесь готовят смешиванием 2,0мл раствора железосинеродистого калия с 10,0мл 30%-ного раствора NaOH.

3. Приготовление гидролизата: навеску пробы массой 50,0г – для консервированного продукта без добавления витаминов, 20,0г – с добавлением витаминов переносят в мерную колбу вместимостью 250мл, прибавляют 150мл HCl 0,1М и нагревают на кипящей водяной бане в течение 40мин. Затем охлаждают до комнатной температуры и проводят ферментативный гидролиз. При анализе фруктовых и ягодных консервов с большим содержанием пектиновых веществ (из яблок, крыжовника, черной смородины и др.) используют ферментный препарат амилоризин П10Х и пектаваморин П10Х. В остальных случаях используют только амилоризин П10Х. Предварительно устанавливают величину pH 4,2-4,5. Для этого содержимое колбы помещают в стакан вместимостью 200мл, прибавляют при постоянном перемешивании раствор уксуснокислого натрия до нужной величины pH. Измерение величины pH производят pH-метром, после этого содержимое стакана переносят в ту же колбу вместимостью 250мл. Затем прибавляют 0,10г амилоризина П10Х, или по 0,10г амилоризина П10Х и пектаваморина П10Х перемешивают, закрывают пробкой и выдерживают в термостате при 37°C в течение 12-16ч. Гидролизат охлаждают до комнатной температуры, доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют. Овощные консервы с мясом обрабатывают ферментами пепсином и амилоризином П10Х. Для этого в колбу помещают 0,10г пепсина и выдерживают в термостате при 37°C в течение 4ч. Затем устанавливают величину pH 4,2-4,5, прибавляют 0,10г амилоризина П10Х, перемешивают и снова выдерживают в термостате при той же температуре в течение 12-16ч. После этого гидролизат охлаждают, доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют.

4. Окисление тиамин в тиохром: в две делительные воронки (при отсутствии можно использовать обычные пробирки) помещают по 5,0мл гидролизата пробы. В две другие— по 5,0мл стандартного раствора тиамин. Затем в две воронки (с пробой и со стандартным раствором) прибавляют по 1,2мл окислительной смеси

(окисленная форма), в две другие (с теми же растворами) – по 1,2мл раствора гидроокиси натрия с массовой долей 30% (неокисленная форма).

Содержимое воронок перемешивают, прибавляют по 10,0мл изобутилового спирта и встряхивают в течение 1мин. Для ускорения расслаивания после взбалтывания прибавляют по 0,5мл этилового спирта. После расслаивания жидкостей нижний водный слой удаляют, а верхний органический слой сливают в кювету для измерения интенсивности флуоресценции. Измеряют сначала интенсивность флуоресценции стандартных растворов (окисленная и неокисленная форма), затем анализируемых проб.

Массовую долю витамина В1 (X₁) в процентах вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{(C - C_1) \cdot a \cdot K \cdot V \cdot 100}{(D - D_1) \cdot V_1 \cdot m},$$

где С – интенсивность флуоресценции окисленной формы анализируемого раствора;

С₁ – интенсивность флуоресценции неокисленной формы анализируемого раствора;

Д – интенсивность флуоресценции окисленной формы стандартного раствора;

Д₁ – интенсивность флуоресценции неокисленной формы стандартного раствора;

а – масса тиамин в 5мл стандартного раствора, взятая для окисления, г;

К – коэффициент пересчета тиамин бромид на тиамин хлорид, при использовании для приготовления стандартного раствора тиамин хлорида К=1; Тиамин бромид = 1,17;

V – общий объем гидролизата, мл;

V₁ – объем элюата, взятый для окисления, мл;

m – масса навески продукта, г.

Определение витамина В₂

Принцип метода: основан на кислотном и ферментативном гидролизе связанных форм витамина, окислении пигментов марганцовокислым калием, восстановлении рибофлавина гидросульфитом натрия и измерении интенсивности флуоресценции до и после восстановления при длинах волн 360–480 нм возбуждающего и 510–650нм излучаемого света. Метод предназначен для анализа слабоокрашенных овощных, фруктовых и ягодных консервированных продуктов.

Реактивы. 1. Перекись водорода, 3%-ная; 2. Калий марганцовокислый, 3%-ный; 3. Серная кислота, 93,6–95,0%-ная; 4. Натрия гидросульфит; 5. Рибофлавин – 0,02 и 0,001г/л; 6. Препарат ферментный амилоризин П10Х.

Ход работы. 1. Приготовление стандартного раствора рибофлавина: предварительно высушивают рибофлавин в вакуум-эксикаторе над концентрированной серной кислотой. Раствор с концентрацией 0,02г/л хранят в холодильнике в течение месяца. Раствор с концентрацией 0,001г/л готовят и день проведения анализа. Для приготовления стандартного раствора рибофлавина с массовой концентрацией 0,02г/л в мерную колбу вместимостью 1000мл помещают 0,02г рибофлавина, прибавляют около 750мл дистиллированной воды, 1,0мл ледяной уксусной кислоты и слегка нагревают при перемешивании до растворения. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят до метки дистиллированной водой и снова перемешивают. Для приготовления раствора рибофлавина с массовой концентрацией 0,001г/л отбирают 5,0мл раствора с массовой концентрацией 0,02г/л в мерную колбу вместимостью 100мл, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

2. Приготовление гидролизата: приготовление гидролизата проводят по п. 3 (определение витамина В₁), с дополнением, указанным ниже.

Для определения поправки на содержание витамина В₂ в ферментах одновременно проводят контрольный опыт. В мерную колбу вместимостью 250мл помещают 150мл раствора соляной кислоты 0,1М, устанавливают с помощью раствора уксуснокислого натрия величину рН 4,2-4,5. Прибавляют 0,10г амилоризина П10Х или по 0,10г амилоризина П10Х и пектаваморина П10Х и выдерживают в термостате при 37°С в течение 12-16 ч. Контрольный опыт проводят один раз для каждой партии ферментов.

3. Проведение анализа: в две колбы вместимостью 50мл каждая помещают по 10 мл гидролизата пробы, в третью колбу – 10мл гидролизата контрольного опыта. В одну колбу с анализируемым гидролизатом прибавляют 1,0мл стандартного раствора рибофлавина с массовой долей концентрацией 0,001г/л, в две другие – по 1,0мл дистиллированной воды. Во все колбы прибавляют по 1,0мл ледяной уксусной кислоты, 0,50мл раствора марганцовокислого калия, перемешивают и выдерживают 2мин. Затем прибавляют по 0,5мл раствора перекиси водорода и снова перемешивают. Через 5мин измеряют интенсивность флуоресценции сначала раствора с добавкой рибофлавина, затем раствора без добавки и контрольного опыта. Измерение интенсивности флуоресценции каждого раствора производят сначала без прибавления гидросульфита натрия, затем после его прибавления. Гидросульфит натрия прибавляют порциями по 0,02-0,05г, быстро перемешивают и снова производят измерение. Эту операцию повторяют до установления наименьшей интенсивности флуоресценции.

4) Обработка результатов: массовую долю витамина В₂ (X₂) в процентах, вычисляют по формуле:

$$X_2 = \frac{[(A - A_1) - (C - C_1)] \cdot b \cdot V \cdot 100}{[(D - D_1) - (A - A_1)] \cdot V_1 \cdot m},$$

где А – интенсивность флуоресценции раствора анализируемой пробы до прибавления гидросульфита натрия;

А₁ – интенсивность флуоресценции раствора анализируемой пробы после прибавления гидросульфита натрия;

С – интенсивность флуоресценции раствора контрольного опыта до прибавления гидросульфита натрия;

С₁ – интенсивность флуоресценции раствора контрольного опыта после прибавления гидросульфита натрия;

Д – интенсивность флуоресценции раствора анализируемой пробы с добавкой рибофлавина до прибавления гидросульфита натрия;

Д₁ – интенсивность флуоресценции раствора анализируемой пробы с добавкой рибофлавина после прибавления гидросульфита натрия;

b – масса рибофлавина в стандартном растворе рибофлавина, добавленная в гидролизат анализируемой пробы, г;

V – общий объем гидролизата, см³;

V₁ – объем гидролизата, взятый для окисления, см³;

m – масса навески продукта, г.

РАЗДЕЛ 8. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунологические методы исследования отличаются высокой точностью и широко распространены в лабораторной практике. К ним относятся реакции, основанные на феномене агглютинации, реакции, основанные на феномене преципитации, реакции с участием комплемента, реакция нейтрализации, реакции с использованием химических и физических меток и иммуноферментные методы, которые основаны на использовании антител, конъюгированных с ферментами, главным образом пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой. Чтобы обнаружить соединение меченых антител с антигеном, добавляют субстрат, разлагаемый присоединенным к IgG ферментом, с окрашиванием в желто-коричневый (пероксидаза) или желто-зеленый (фосфатаза) цвет. Ферменты, используемые в ИФА в качестве маркеров, должны отвечать ряду требований: иметь высокую активность и стабильность в условиях анализа; чувствительный и простой метод определения продуктов или субстратов ферментативной реакции; сохранять активность и стабильность после конъюгирования с антителами; быть доступным при высокой степени чистоты. Обязательным условием является отсутствие фермента и его ингибиторов в исследуемых биологических жидкостях. Используют также ферменты, разлагающие не только хромогенный, но и люмогенный субстрат. В этом случае при положительной реакции появляется свечение. Подобно иммунофлюоресценции иммуноферментный метод применяют для обнаружения антигенов или титрования антител в биологических образцах.

Наиболее популярной разновидностью иммуноферментного метода является иммуносорбция. На твердом носителе, которым могут быть целлюлоза, полиакриламид, декстран и различные пластмассы, сорбируют антиген. Чаще носителем служит поверхность лунок микропанелей. В лунки с сорбированным антигеном вносят исследуемую сыворотку крови, затем меченую ферментом антисыворотку и субстрат. Положительные результаты учитывают по изменению цвета жидкой среды. Для обнаружения антигенов на носитель сорбируют антитела, затем вносят в лунки исследуемый материал и проявляют реакцию меченой ферментом антимикробной сывороткой. Повышению чувствительности иммунофлюоресцентного и иммуноферментного методов способствует введение в систему реакции авидина и биотина. Наибольшее распространение получили методы введения ферментной метки, основанные на образовании ковалентной связи между молекулами антитела и фермента. Наибольшее практическое применение нашел метод получения иммунопероксидазных конъюгатов окислением углеводного компонента фермента периодатом натрия. В случае использования щелочной фосфатазы в качестве фермента-маркера, применяют глутаровый альдегид, взаимодействующий с аминогруппами белковых молекул.

9.1. Определение антител к *Toxoplasma gondii*

Возбудитель инфекции *Toxoplasma gondii*, является наиболее широко распространенным внутриклеточным паразитом. Инфицирование людей происходит при употреблении в пищу зараженного сырого мяса или при контакте с фекалиями, а также прямым путем через кровь при трансфузиях или у беременных – внутриутробно.

Риск передачи возбудителя плоду от матери, заразившейся в первом триместре беременности, равен 25%. Инфекция обычно приводит к самопроизвольным выкидышам, мертворождению или к серьезным заболеваниям

плода, 75% младенцев, рожденных женщинами, которые были инфицированы в третьем триместре беременности, несут в себе скрытую (субклиническую) инфекцию, которая в конечном итоге (85% случаев) приводит к хориоретиниту или неврологическим осложнениям.

Принцип метода. На внутренней поверхности лунок для микротитрования (играющих роль твердой фазы) сорбированы очищенные антигены поверхностной мембраны *Toxoplasma gondii* (Тохо Ag). Если в тестируемых образцах или в контроле содержатся соответствующие специфические антитела, они будут реагировать с иммобилизованными антигенами. Буфер, которым разводятся образцы (1), содержит антитела против IgG человека, которые предотвращают помехи в ходе анализа из-за присутствия в образцах ревматоидного фактора и специфических IgG. После отмывки от несвязавшихся реагентов добавляют антитела против IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, которые будут специфически взаимодействовать на поверхности микролунок только с антителами класса IgM, образуя комплекс типа «сэндвич»:

Toxo Ag анти-Тохо IgM* анти-IgM-антитела – HRP*

После промывания, удаляющего несвязанный конъюгат, активность пероксидазы, иммобилизовавшейся на стенках лунок, измеряют путем инкубации с субстратом (тетраметилбензидином). Интенсивность синего окрашивания, развивающегося в присутствии меченого ферментом иммунного комплекса, которое сменяется на желтое после добавления серной кислоты (останавливает реакцию), прямо пропорциональна количеству IgM-антител против *Toxoplasma gondii* в исследуемом образце. Ее регистрируют как оптическую плотность при 450нм (ОП450) на фотометре-ридере для микротитровальных планшетов. Результаты измерения в лунках с исследуемыми образцами сравнивают с пороговым cut-off-контролем (COV).

Необходимые реактивы и биологические образцы. Набор для определения в сыворотке крови человека антител класса IgM к возбудителю токсоплазмоза на основе твердофазного иммуоферментного сэндвич-анализа TOXOPLASMA GONDII HUMAN-ELISA-IgM-Antibody-Test

Кат.№.: 51109 96, сыворотка крови человека.

Реагенты и состав:

1. 100мл – Разводящий буфер IgM (синяя крышка) готов к использованию, зеленого цвета Фосфатный буфер 10мМ, рН 6,5±0,2 NaCl 8г/л, Альбумин 10г/л.
2. 25мл – Субстратный буфер (черная крышка) готов к использованию. Цитрат калия 0,2М H₂O₂ 6мМ, рН 3,9±0,2.
3. 50мл – Промывочный раствор, концентрат (белая крышка) (объем довести до 1000мл). Трис-буфер 10мМ, рН 7,2±0,2, NaCl 8г/л
4. 1,5мл – Раствор ТМБ (зеленая крышка). 3,3', 5,5' - тетраметилбензидин 20мМ
5. 11мл Останавливающий раствор (красная крышка), готов к использованию.
6. Серная кислота 1,5М
7. 11мл – Анти-IgM Конъюгат (белая крышка, раствор красноватого цвета) готов к использованию. Конъюгат кроличьих антител к IgM человека с пероксидазой хрена.

8. 2мл – TOXOPLASMAGONDIIIgM Положительный контроль (красная крышка) готов к использованию. IgM, позитивные по Тохо-Ад.
9. 2мл – TOXOPLASMAGONDIIIgM Отрицательный контроль (зеленая крышка) готов к использованию. IgM, негативные по Тохо-Ад.
10. 12шт. – Стрипы для микротитрования со съемными лунками (код ТОХ М) по 8 лунок/стрип, покрытые Тохо-Ад (из клеточной культуры).
11. 1шт. – Держатель (штатив) для стрипов.
24шт. – Пленка для запечатывания стрипов

В перечисленных реактивах содержатся следующие консерванты:

100мкг/мл	Гентамицин	в № 6
0,095%-ный	Азид натрия	в №№ 1, 7, 8
001% -ный	Тримеросал (Мертиолат)	в №№ 1, 3, 6, 7, 8

ВНИМАНИЕ:

Не принимайте внутрь компоненты набора. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.

Реагенты сохраняют стабильность вплоть до истечения срока годности при условии хранения от 2 до 8°С.

Приготовление реагентов

Рабочий Промывочный раствор (3а)

Разведите Промывочный раствор (3) 20 объемами свежей, не содержащей микроорганизмов, дистиллированной или деионизированной водой, т.е. к 50мл концентрата (3) добавьте 1000мл воды.

Стабильность: в течение 1 недели в условиях хранения при 2–8°С обеспечено отсутствие бактериального заражения.

Рабочий раствор ТМБ (4а)

Перед использованием приготовьте необходимое количество Рабочего раствора ТМБ: разведите концентрированный Раствор ТМБ (4) в 21 раз Субстратным буфером (2), т.е. к 100 мкл (4) добавьте 2 мл (2).

Для ТМБ используйте только чистую пластиковую посуду, ополоснутую дистиллированной или деионизированной водой.

Приготовленный раствор храните при 17-25°С в темном месте. Раствор стабилен в течение 8 часов при 17-25°С, далее может развиваться слабое окрашивание. Субстратный бланк-контроль, должен иметь $OP_{450} < 0,15$, иначе следует приготовить свежий Рабочий раствор ТМБ.

Стрипы для микротитрования (9) (Код ТОХ М)

Стрипы запечатаны в вакуумную упаковку и дополнительно помещены в пластиковый контейнер с осушителем. Перед вскрытием стрипы следует нагреть до комнатной температуры. Сразу после извлечения из контейнера нужного количества стрипов, следует плотно запечатать контейнер с оставшимися стрипами липкой лентой. Убедитесь, что осушитель находится в контейнере. Упакованные таким образом и хранящиеся при 2–8°С стрипы можно использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке.

Примечания

При необходимости можно воспользоваться реагентами общего назначения (1), (2), (3), (4) и (5) из других лотов и IgM-наборов. Остальные реагенты специфичны

для данного лота, и их замена на соответствующие компоненты других лотов не допускается. Для IgM-тестов используйте только Разводящий буфер 1дМ. Не пользуйтесь реагентами с истекшим сроком хранения. Не закрывайте флаконы пробками от других флаконов, не наливайте реагенты во флаконы, предназначенные для других реагентов. В обоих случаях произойдет загрязнение одного компонента другим. Во избежание испарения или микробной контаминации флакон с реагентом сразу после использования плотно закрывайте.

Реагенты набора были подвергнуты специальной проверке, которая не выявила содержания в них HBsAg и антител к ВИЧ. Однако ни один из существующих в настоящее время методов тестирования биологических материалов не может дать гарантии полного отсутствия в них патогенных для человека организмов. Поэтому все исследуемые образцы, а также контрольные растворы набора, следует рассматривать как потенциальный источник инфекции, работа с которым требует соблюдения соответствующих мер безопасности.

Образцы

Сыворотка крови. Неразбавленные образцы сыворотки следует хранить при 2–8°C не дольше 7 дней. Для продолжительного хранения рекомендуется воспользоваться морозильной камерой (-20°C).

Подготовка образцов к анализу

К образцам сывороток добавьте по 100 объемов Разводящего буфера IgM (1) (10мкл+1мл) и тщательно перемешайте. Перед тем, как продолжить работу дальше, проинкубируйте разведенные образцы, по крайней мере, 5мин. До тестирования их можно хранить в течение 24 часа при 2–8°C.

Протокол эксперимента

Надежность результатов зависит от того, насколько строго выдерживается протокол (обратите особое внимание на промывание). Перед началом работы доведите температуру всех реагентов, образцов и контролей до комнатной.

Перед началом работы, используя прилагаемую к набору форму, составьте подробный план расположения образцов в микропланшете.

Возьмите из контейнера требуемое количество стрипов (9) или лунок и надежно укрепите их в штативе (10). Отведите 1 лунку на микропланшете для субстратного бланк-контроля и 2 лунки - для положительного и отрицательного контролей.

Замечания

1. Разведите образцы сывороток (1+100), как описано в предыдущем разделе. Положительный и Отрицательный Контроли уже готовы к использованию и разведения не требуют.

2. Контроли и разведенные образцы следует добавлять в лунки через равные промежутки времени, не останавливаясь, так, чтобы вся процедура заняла не более 5мин. Если уложиться в 5мин не удается, следует начать с добавления образцов, где-то в середине процедуры прерваться и заполнить контрольные лунки, а затем продолжить внесение образцов.

Расположение контролей см. в пункте 11-го Этапа.

Этап 1

1. Оставьте лунку A1 для субстратного бланк-контроля (4а). Внесите контроли или исследуемые образцы в следующем порядке:

100мкл Отрицательного Контроля (8) - в лунки В1 и С1
100мкл Положительного Контроля (7) - в лунки D1 и E1
по 100мкл исследуемых образцов в остальные лунки.

2. Покройте лунки клейкой пленкой.

3. Инкубируйте 30мин при 17-25°C.

4. Аспирируйте содержимое лунок в 5%-ный раствор гипохлорита натрия и добавьте в каждую лунку по 400мкл Рабочего раствора (3а). Через 15–30 сек. аспирируйте содержимое лунок снова и повторите это трижды (т.е. всего 4 раза).

Используйте автоматическим вошером, направьте его Рабочим раствором и промойте стрипы 4 раза.

Обратите внимание на то, что вошер заполняет все лунки доверху и аспирирует их содержимое практически полностью через 15 – 30 сек. (допускается остаточный объем жидкости <15 мкл).

Перед началом следующего этапа удалите остатки жидкости из микропланшета, опрокинув его на фильтровальную бумагу.

Этап 2

1. Внесите по 100мкл Ферментного анти-IgM Конъюгата (6) во все лунки, кроме А1.

2. Покройте лунки клейкой пленкой

3. Инкубируйте 30мин при 17-25°C. Во время инкубации приготовьте Рабочий раствор ТМБ (4а) в количестве, достаточном для заполнения всех лунок.

4. Промойте стрипы 5 раз, как это описано в п.4 Этапа 1.

Перед началом следующего этапа удалите остатки жидкости из микропланшета, опрокинув его на фильтровальную бумагу.

Этап 3

1. Внесите по 100мкл Рабочего раствора ТМБ (4а) во все лунки.

2. Инкубируйте 15мин при 17-25°C в темноте.

3. Остановите ферментативную реакцию добавлением 100мкл останавливающего раствора (5) во все лунки.

4. Установите ридер на ноль по значению оптической плотности в лунке А1.

5. Измерьте ОП при 450нм (A₄₅₀).

Примечания

Измерение при двух длинах волн (620 или 690нм в качестве длины волны сравнения) рекомендуется, но не является обязательным. Измерять следует в течение 30 мин после остановки реакции.

Расчеты контрольных значений и COV

Средние значения ОП отрицательного контроля в лунках В1 и С1(ОК_{Ср}) и положительного контроля в лунках D1 и E1 (ПК_{Ср}), а также величину COV рассчитывают по формулам:

$$ОК_{Ср} = 1/2 (A_{450}B1 + A_{450}C1)$$

$$ПК_{Ср} = 1/2 (A_{450}D1 + A_{450}E1)$$

$$COV(\text{пороговый cut-off-контроль}) = ОК_{Ср} + 0,2 ПК_{Ср}$$

Анализ считается выполненным правильно, если полученные результаты удовлетворяют следующим критериям:

1. Субстратный бланк-контроль в лунке А1 < 0,150
2. ОК_{ср} < 0,250
3. ПК_{ср} > 0,400
4. ПК_{ср} : ОК_{ср} > 3

Интерпретация результатов

Если A_{450} образца > $COV \pm 15\%$, образец считается содержащим IgM-антитела к *Toxoplasma gondii* (позитивным).

Если A_{450} образца < $COV \pm 15\%$, образец считается не содержащим IgM-антитела к *Toxoplasma gondii* (негативным).

Из-за естественного разброса в уровне антител и аналитических погрешностей результаты, отличающиеся от COV менее, чем на 15%, следует рассматривать как неоднозначные. Такие образцы нужно протестировать еще раз (в дубликатах) вместе с образцами, взятыми на 7-14 дней позже, а при оценке новых данных – учесть тенденцию их изменения во времени, а также учесть концентрацию специфических IgG (определенную с помощью теста HUMANELISA IgG).

Образцы от пациентов с инфекционным мононуклеозом могут дать в данном тесте ложноположительные результаты благодаря реактивации выработки IgM-антител к *Toxoplasma gondii*. Это обстоятельство следует учитывать перед оценкой результатов анализа.

Если в вашем распоряжении нет автоматического ридера, результаты можно оценить *визуально*:

- Лунка А1, содержащая Субстратный бланк-контроль, должна выглядеть бесцветной.
- Образец следует считать позитивным в том случае, если лунка с этим образцом окрашена значительно сильнее, чем лунки с Отрицательным Контролем (В1 и С1).

Замечание

На результаты не влияет мутность в Разводящем буфере (1), появляющаяся после добавления образца.

9.2. Определение фагоцитирующей активности лейкоцитов

Получение суспензии лейкоцитов

Первая группа способов получения лейкоцитов основана на различиях удельной массы эритроцитов (1,097кг/л) и лейкоцитов (1,07-1,08кг/л).

Одним из наиболее простых является метод спонтанной седиментации эритроцитов. Он состоит в том, что кровь выдерживают при 20-37°C в течение 0,5-1,5ч, в результате чего она расслаивается: нижний слой содержит преимущественно эритроциты (с примесью лейкоцитов), верхний представляет собой плазму, обогащенную лейкоцитами (однако содержащую большую или меньшую примесь эритроцитов). Плазму отбирают, клетки осаждают центрифугированием.

Для улучшения отделения лейкоцитов от эритроцитов к крови можно добавлять вещества, образующие коллоидные растворы (декстрин, желатин, метилцеллюлозу, фибриноген, гуммиарабик и др.). Например, 3%-ый раствор желатина в физиологическом растворе смешивают с кровью в соотношении 1:3,

после чего инкубируют при 37°C в течение 30-40мин, собирают надосадочную жидкость, полученные клетки осаждают центрифугированием. Данный способ прост, он позволяет выделять лейкоциты крови с минимальным повреждением, и, что самое важное, в выделенных с его помощью лейкоцитах соотношение субпопуляций почти такое же, как в цельной крови. Однако популяционный состав выделенных лейкоцитов зависит от времени расслаивания крови: поскольку удельная масса гранулоцитов больше, они осаждаются после эритроцитов в первую очередь. В связи с этим, учитывая различие в вязкости плазмы разных образцов крови, трудно подобрать индивидуальное время расслаивания крови так, чтобы состав лейкоцитов полностью соответствовал их соотношению в крови. Кроме того, в выделенной суспензии лейкоцитов практически всегда присутствуют эритроциты. Их можно удалять путем гемолиза дистиллированной водой или раствором хлористого аммония. Вторая группа методов основана на удалении эритроцитов из цельной крови путем их гемолиза гипотоническими растворами. Поскольку содержание эритроцитов в цельной крови велико, лизис ведут с использованием большого избытка растворов. Для гемолиза обычно используют дистиллированную воду.

Гемолиз дистиллированной водой. К крови добавляют 40-50-кратный объем дистиллированной воды, перемешивают 30-40сек, после чего восстанавливают осмотическое давление, приливая соответствующее количество 10-кратного концентрата раствора Хенкса или забуференного физиологического раствора (PBS). Клетки осаждают центрифугированием.

Одним из главных недостатков гемолиза является повреждение лейкоцитов, которое в большей или меньшей степени происходит всегда. При этом гемолиз с использованием дистиллированной воды является более мягким, поскольку предполагает: а) менее длительное воздействие на клетки; б) практически мгновенное и полное снятие этого воздействия, которое достигается прибавлением 10-кратного концентрата раствора Хенкса.

Спектрофотометрическое определение восстановления нитросинего тетразолия нейтрафилами (НТС-тест)

Принцип метода. Показателем полноценности функций фагоцита служит степень выраженности метаболического взрыва. В основе реакции лежит восстановление в цитоплазме нейтрофилов нитросинего тетразолия до диформаза под влиянием супероксидного аниона, в повышенных количествах образующегося при активизации клетки. Диформазан имеет вид темно-синих или черных гранул, количество которых меняется в зависимости от степени активизации клетки, т.е. от выраженности фагоцитоза. Активацию нейтрофилов проводят опсонизированным зимозаном, пирогеналом, латексом. Например, меланин-формальдегидный латекс (ВНИИ биологического приборостроения) является хорошим активатором нейтрофилов, сопоставимым с зимозаном и пирогеналом, поэтому для активации НТС-теста рекомендуется использовать этот вид латекса. НТС-тест является исключительно простым и в то же время информативным методом оценки фагоцитоза.

Необходимые реактивы и биологические образцы. 1. Предметные стекла. 2. Гепарин 10ед./мл. 3. Взвесь латекса. 4. Раствор нитросинего тетразолия 0,1%-ный, приготовленный на изотоническом растворе хлорида натрия. 5. Среда 199 (набор хранят при температуре от 2 до 8° С). 6. Фосфатно-солевой буфер (1 литр раствора содержит 8г NaCl, 2,9г Na₂HPO₄, 0,2г NaH₂PO₄, pH 7,4). 7. 3%-ный желатин,

приготовленный на фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). 10г желатина нагревают в 100мл дистиллированной воды до полного растворения. 8. Суспензия нейтрофилов.

Ход работы

1. Лейкоцитарную взвесь получают из 0,5мл крови, взятой из пальца (если используется венозная кровь, то необходимо добавить гепарин или ЭДТА). К 0,5мл крови добавляют 0,25мл 3%-ного раствора желатина, приготовленного на фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). Инкубируют 15минут при 37°С, наблюдают расслоение. Верхний слой, содержащий нейтрофилы осторожно отбирают, дважды отмывают фосфатно-солевым буфером с помощью центрифугирования (500g).

2. Так как в лейкоцитарной взвеси, полученной на желатине, содержится примесь эритроцитов, их удаляют с помощью гемолитического шока. Для этого к осадку клеток после центрифугирования добавляют 4,5мл дистиллированной воды, встряхивают и через 30с добавляют 0,5мл 10-кратного раствора Хенкса или среды 199.

3. Центрифугируют двукратно при 200g 10 мин в среде Хенкса или среде 199.

4. После последнего центрифугирования к осадку добавляют 0,5мл среды 199 и в камере Горяева с помощью краски Задорожного-Дозморова определяют число нейтрофилов в 1мл.

5. На хорошо обезжиренное предметное стекло наносят 50мкл исследуемой клеточной суспензии, 50мкл раствора гепарина – 10ед/мл, 50мкл взвеси латекса (50 000 частиц/мкл) и 50мкл 0,1%-го нитросинего тетразолия, приготовленного на изотоническом растворе хлорида натрия. В контроле вместо латекса добавляют 5мл среды 199.

6. Все компоненты реакции тщательно смешивают и помещают во влажной камере в термостат на 20 мин при температуре 37°С. После термостата препарат оставляют при комнатной температуре до полного высыхания.

7. Фиксируют 10мин в этаноле и для подкрашивания ядер обрабатывают 3мин 0,1%-ым водным раствором азура-II.

8. Результаты реакции учитывают с помощью иммерсионного объектива 90. Просматривают не менее 100 нейтрофилов. Учитывают процент клеток, образующих гранулы формазана, и количество образовавшихся гранул по цитологическому индексу. Реакцию оценивают по четырем степеням в зависимости от количества образующихся в нейтрофилах гранул: I степень – единичные гранулы, II степень – гранулы занимают 1/3 цитоплазмы клетки, III степень – гранулы занимают 2/3 цитоплазмы клетки, IV степень – гранулы занимают всю цитоплазму клетки.

Пример. При обследовании здорового донора 20-ти лет процент нейтрофилов, имеющих в цитоплазме гранулы, был равен 10-ти. Из них пять клеток – I степени, 3 клетки – II степени, 2 клетки – III степени формирования гранул. Цитологический индекс составляет $5+6+6=17:100=0,17$.

После активации латексом процент нейтрофилов, имеющих гранулы, составил 30. Из них 11 клеток – I степени, 9 клеток – II степени, 8 клеток – III степени и 2 клетки – IV степени. Цитологический индекс равен 0,61. Можно сделать вывод о хорошо выраженной активизации фагоцитарной системы, что характерно для нормальной реакции.

При ряде патологических процессов восстановление нитросинего тетразолия в клетках снижено и, что особенно важно, нет активизации этих процессов под влиянием стимулирующих агентов.

Определение активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках крови человека

Принцип метода. Миелопероксидаза принимает участие в окислительном взрыве и во многом определяет бактерицидное действие нейтрофилов.

Миелопероксидаза (МРО) представляет собой комплекс ферментов, катализирующих преобразование перекиси водорода и ионов хлора в хлорноватистую кислоту. Хлорноватистая кислота обладает в 50 раз более мощным бактерицидным действием, чем перекись водорода. МРО также непосредственно хлорирует фагоцитированные бактерии; таким образом, система МРО–пероксид водорода–Сl играет важную роль в уничтожении микробов. Помимо этого, продукты системы МРО–пероксид водорода–Сl играют роль в разрушении грибов, паразитов, простейших, вирусов, опухолевых клеток, НК-клеток, эритроцитов и тромбоцитов. Сущность методики заключается в добавлении к лизату клеток периферической крови субстратов пероксидазы (последнего фермента в комплексе) – ортофенилендиамина и перекиси водорода. Цветная реакция оценивается по изменению оптической плотности при 492нм на фотометре.

Понижение уровня миелопероксидазной активности четко коррелирует с понижением бактерицидности нейтрофилов по отношению к стафилококкам. Особенно сильно снижен уровень активности этого комплекса при хроническом грануломатозе – заболевании, связанном с дефектом фагоцитарной системы.

Необходимые реактивы и биологические образцы. 1.Среда Хенкса. 2. Камера Горяева. 3. Краска Задорожного-Дозморова. 4. Ортофенилендиамин (0,4мг/мл) 5. 0, 002%-ная перекись водорода на 50ММ фосфатно-цитратном буфере рН5,0. 6. Луночные планшеты для иммунологических реакций. 7. Коммерческий препарат пероксидазы хрена. 8. Лейкоцитарная взвесь, полученная из периферической крови.

Ход работы

Уровень миелопероксидазы в лимфоцитах, крайне низок, поэтому этот фермент можно определить в клеточной суспензии, полученной стандартным способом без выделения нейтрофилов и моноцитов.

1. Лейкоцитарную взвесь получают из 0,5мл крови, взятой из пальца (если используется венозная кровь, то необходимо добавить гепарин или ЭДТА). К 0,5мл крови добавляют 0,25мл 3%-ного желатина, приготовленного на фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). Инкубируют 15 минут при 37°С, наблюдают расслоение. Верхний слой, содержащий нейтрофилы осторожно отбирают, дважды отмывают фосфатно-солевым буфером с помощью центрифугирования (500g).

2. Так как в лейкоцитарной взвеси, полученной на желатине, содержится примесь эритроцитов, их удаляют с помощью гемолитического шока. Для этого к осадку клеток после центрифугирования добавляют 4,5мл дистиллированной воды, встряхивают и через 30с добавляют 0,5мл 10-кратного раствора Хенкса.

3. Центрифугируют двукратно при 200g 10мин в среде Хенкса или среде 199.

4. После последнего центрифугирования к осадку добавляют 0,5мл среды 199 и в камере Горяева с помощью краски Задорожного-Дозморова определяют число нейтрофилов в 1мл.

5. Клеточную суспензию центрифугируют при 200g 10 мин и добавляют к осадку такое же количество дистиллированной воды, чтобы концентрация нейтрофилов была равна $500 \cdot 10^6$ кл/мл.

6. Осадок взбалтывают и выдерживают не менее 20 минут. Этого времени достаточно для полного лизиса клеток.

7. Готовят 4 разведения полученного лизата на дист. воде (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) и по 25мкл вносят в плоскостонные 96-ти луночные планшеты для иммунологических реакций, по два образца на каждое разведение. Первые вертикальный и горизонтальный ряды планшета оставляют для бланка.

8. К клеточному лизату, источнику миелопероксидазы, добавляют 100мкл субстратной смеси, состоящей из ортофенилендиамина (0,4мг/мл) и 0, 002%-ной перекиси водорода на фосфатно-цитратном буфере с pH 5,0.

9. Через 5мин реакцию останавливают 100мкл 1N серной кислоты.

10. Измеряют оптическую плотность на фотометре при длине волны 492нм.

11. Для перевода единиц оптической плотности в условные единицы активности миелопероксидазы строят калибровочную кривую. Из коммерческого препарата пероксидазы хрена (удельная активность 350-500ЕД/мг) готовят различные дозы на дист. воде, начиная с 2мкг/мл и кончая 0,015мкг/мл. Далее проводят реакцию, как описано в пп.8-9.

12. Строят стандартную калибровочную кривую, откладывая по оси ординат оптическую плотность, а по оси абсцисс – концентрацию пероксидазы. По этой стандартной кривой находят, какому количеству пероксидазы хрена соответствуют оптические плотности опытных образцов. Для удобства оценки результатов найденную величину умножают на 100 и получают активность миелопероксидазы в условных единицах.

РАЗДЕЛ 9. ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Очень важным итогом большого спецпрактикума является способность студентов к самостоятельному выполнению сложных лабораторных задач. Поставленные задачи предусматривают изучение научной литературы, организацию рабочего места, правильное планирование рабочего времени. Это обязывает студентов согласно их конкретному эксперименту выполнять работу и контроль опыта по конкретному графику. В данном случае предлагается биотехнологическая задача выделения и очистки гликолитических белков, в том числе олигомерного гликолитического фермента – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. А также использования его для иммобилизации на нерастворимом носителе. Иммобилизованный фермент может использоваться для определения содержания 3-фосфорного альдегида с сохранением фермента как аналитического реагента и изучения физико-химических свойств иммобилизованных ферментов.

Задача 1. Выделение глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и других гликолитических белков из мышц кролика

Одновременное выделение 3-фосфоглицераткиназы, 3-фосфоглицератмутазы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и енолазы проводят по модифицированному методу Скоупс и Хилл. Мышцы спины и задних конечностей кролика проворачивают через мясорубку, а затем гомогенизируют в 30мМ K_2HPO_4 , pH 7,0; 1мМ ЭДТА, 10мМ ДТТ (2,5мл среды на грамм измельченной ткани) при 4°C. После гомогенизации в течение 1 минуты, гомогенат перемешивают 30мин. Затем гомогенат центрифугируют при 4°C при 5000об/мин в течение 30 минут и фильтруют супернатант через несколько слоев марли, для удаления частиц жира.

Затем к супернатанту добавляют сухой измельченный сульфат аммония из расчета 275г на литр (45% насыщение), небольшими порциями при постоянном перемешивании в течение примерно 10 минут. После добавления последней порции продолжают перемешивание в течение 30 минут на холоду.

- ❖ Осадок, содержащий киназу фосфорилазы и фосфофруктокиназу, удаляют центрифугированием в течение 25 минут при 0-5°C и 12000об./мин. Измеряют объем супернатанта.
- ❖ Продолжают высаливание, добавляя сульфат аммония из расчета 100г на литр супернатанта (60%-ное насыщение), перемешивая и центрифугируя, как описано выше. Преципитат А, содержащий в числе прочих белков 3-фосфоглицератмутазу, растворяют в 10мМ TRIS-MES, pH 6,8, (объем буфера примерно 15% от первоначального объема экстракта).
- ❖ Супернатант продолжают высаливать, добавляя сульфат аммония из расчета 100г на литр (75% насыщение), перемешивая и центрифугируя, как описано выше. Преципитат В, содержащий в числе других белков 3-фосфоглицераткиназу и енолазу растворяют в буфере содержащем 1мМ ЭДТА, 1мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, pH 7,5.
- ❖ К супернатанту добавляют 35 грамм сульфата аммония на литр (80%-ное насыщение) при тщательном перемешивании, доводят pH

суспензии до 7,5 медленным добавлением концентрированного аммиака и оставляли на ночь. Полученная фракция С содержит в числе других белков глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу

Дальнейшая очистка глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы

Фракцию С отделяют центрифугированием, растворяют в небольшом количестве 5мМ ЭДТА и доводят pH раствора до 8,0 концентрированным раствором аммиака и оставляют на 2-3 дня при 4°C. За кристаллизацией следят, отбирая пробы из суспензии и определяя количество белка и его активность в осадке и в супернатанте. Кристаллы ГАФД отделяют центрифугированием; осадок растворяют в небольшом объеме воды, содержащей 5мМ ЭДТА и 2мМ ДТТ, pH 7,5, так, чтобы концентрация белка была 15-20мг/мл. Не растворившуюся часть осадка удаляют центрифугированием. К прозрачному раствору медленно добавляют сухой сульфат аммония (при постоянном перемешивании на магнитной мешалке) до помутнения, после чего, доводят pH до 8,5 добавлением разведенного аммиака. Суспензию оставляют при 4°C на 1-2 дня. Перекристаллизацию повторяют два-три раза. Полученный таким способом препарат ГАФД, подвергают дальнейшей очистке на колонке с сефадексом G-100. Таким образом убирают примеси миоглобина и 3-ФГкиназы, плохо отделяющиеся при перекристаллизациях.

- ❖ Гель-фильтрацию проводят при 4°C. Колонку с сефадексом G-100 *superglue* (2,5x 40см) уравнивают буфером, содержащим 10мМ KH_2PO_4 , 0,1М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5мМ ЭДТА, pH 7,5. Фермент растворяют в выше указанном буфере; 15-20мл раствора (60мг/мл) наносят на колонку. По мере прохождения через колонку препарат разделяется на две хорошо различимые полосы: первой идет полоса желтого цвета, характерная для холоформы ГАФД; второй – полоса миоглобина красно-коричневого цвета. Фракции по 5-10мл собирают и определяют концентрацию белка и ферментативную активность. Фракции с максимальной дегидрогеназной активностью объединяют. В том случае, если отношение $A_{280/260}$ более чем 1,07, к раствору фермента добавляют NAD^+ до конечной концентрации 0,5мМ, после чего ГАФД высаливают насыщенным раствором сульфата аммония, поддерживая pH суспензии на уровне 8,3-8,5. Суспензию оставляют при 4°C на 1-2 дня, после чего центрифугируют и осадок суспендируют в полунасыщенном растворе сульфата аммония, pH 8,3. Раствор фермента перед использованием обессоливают на колонке с сефадексом G-50, уравниваемой 5мМ раствором ЭДТА pH 7,5.

Определение дегидрогеназной активности ГАФД

Активность ГАФД определяют спектрофотометрически по росту поглощения при 340нм, в результате накопления NADH в ходе окисления D-глицеральдегид-3-фосфата. Измерение активности проводят в среде следующего состава: 100мМ глицин, 50мМ KH_2PO_4 , pH 8,9; 5мМ ЭДТА, 0,5мМ NAD^+ , 0,5мМ 3-ФГА. Реакцию начинают добавлением 3-ФГА. Удельную активность выражают, как количество мкмоль NADH, образующихся за 1мин, в расчете на мг белка.

Препараты ГАФД из мышц кролика характеризуются отношением $A_{260}/A_{280} = 1,07$ и удельной активностью 100-120ед/мг

Задача 2. Иммунизация белков

Иммобилизованными ферментами называются ферменты, искусственно связанные с нерастворимым носителем, но сохраняющие свои каталитические свойства. Коммерческое использование ферментов ограничено рядом факторов. Важнейшие из них — нестабильность ферментов и их высокая стоимость. Стоимость можно существенно снизить за счет иммобилизации фермента. Это означает, что фермент закрепляют на поверхности или внутри твердой подложки, которую легко удаляют из реакционной смеси после завершения ферментации. Фермент может быть использован повторно, что существенно снижает стоимость процесса. Другое преимущество иммобилизации заключается в том, что фермент становится более стабильным, вероятно, за счет ограничения его способности денатурировать при изменениях pH, температуры и растворителей. Например, иммобилизованная глюкозоизомераза стабильна при 65°C в течение года, тогда как в растворе она стабильна только 3 суток. Существуют различные способы иммобилизации ферментов. Они включают либо механическое включение (захват) фермента, либо его присоединение к определенной структуре, или матрице. Преимуществом метода захвата является то, что фермент сохраняется в естественном состоянии. Однако крупным молекулам из-за диффузионных затруднений трудно достичь фермента. Захват шариками альгината легко продемонстрировать на лабораторных занятиях; он является наиболее распространенным промышленным методом.

Иммобилизация фермента в геле

Альгинат натрия образует в воде высоковязкие растворы; он взаимодействует с ионами двухвалентных металлов, причем с ионами Ca^{2+} получаются устойчивые гели. Раствор, содержащий фермент и альгинат натрия, по каплям вносят в раствор хлористого кальция. Как только капельки вступают в контакт с хлористым кальцием, они немедленно начинают превращаться в гель; при этом образуются идеальные по форме шарики геля, содержащие внутри захваченный фермент. Для длительного использования гель можно стабилизировать полиакриламидом или приготовить его в виде пластин, если поместить его на тканевую основу

Ковалентная иммобилизация ГАФД

К активированной и промытой сефарозе добавляют равный объем раствора ГАФД в 0,1М KH_2PO_4 , 5мМ ЭДТА, pH 8,3; из расчета 0,7-1,0мг белка на 1мл осевшей сефарозы. Раствор белка предварительно обессоливают на колонке с сефадексом G-50. Затем суспензию инкубируют 2 часа при комнатной температуре, осторожно перемешивая. После инкубации в систему вносят глицин (конечная концентрация 50мМ), для блокирования не прореагировавших активных групп носителя и продолжают инкубацию в течение 10-15 часов при температуре 4°C. Затем сефарозу отмывают от неспецифически связанного белка и глицина 0,1М KH_2PO_4 , содержащим 5мМ ЭДТА, pH 8,3 до исчезновения активности и белка в элюате. В полученном препарате иммобилизованного фермента определяют содержание белка, каталитическую активность и количество ковалентно связанных с матрицей субъединиц.

Сефарозу с иммобилизованными тетрамерами ГАФД промывают буфером 0,15М NaCl, 5мМЭДТА, 2мМ ДТТ, рН 7,5. К отмытой сефарозе, содержащей иммобилизованные тетрамеры, добавляют равный объем охлажденного буфера, содержащего 0,15М NaCl, 5мМ ЭДТА, 2мМ ДТТ, 25мМ АТР, рН 7,5 и перемешивают на льду. Перемешивание продолжают до достижения ферментом 50% от исходной дегидрогеназной активности. Полученную сефарозу с иммобилизованными димерами, промывают на стеклянном фильтре 0,1М KH_2PO_4 , 5мМ ЭДТА, рН 8,3, до исчезновения ферментативной активности и белка в элюате. В полученных препаратах ферментов определяют содержание белка, каталитическую активность и количество ковалентно связанных с матрицей субъединиц.

Определение количества ковалентно связанных с сефарозой субъединиц олигомерного белка ГАФД

Для определения количества ковалентно связанных с сефарозой субъединиц олигомерных ферментов проводят обработку препаратов 8М мочевиной с последующим определением количества оставшегося на сефарозе белка. Сравнение содержания белка до и после обработки мочевиной позволяет определить соотношение ковалентно связанных и адсорбированных за счет белок-белковых взаимодействий субъединиц фермента.

Обработку препаратов иммобилизованной ГАФД мочевиной проводят следующим образом. Сефарозу с иммобилизованным белком промывают 3 объемами 8М мочевины, затем готовят суспензию из расчета 1мг белка на 1мл 8М мочевины и инкубируют в течение 24 часов при комнатной температуре, при постоянном перемешивании. Сефарозу снова промывают 5-кратным объемом 8М мочевиной и отмывают фосфатным буфером (100мМ NaH_2PO_4 , рН 7,0) до исчезновения поглощения при 280 и 260нм в элюате. Затем проводят определение содержания белка до и после обработки мочевиной и рассчитывают количество субъединиц белка, ковалентно связанных с сефарозой.

Определение концентрации иммобилизованного белка

В препаратах иммобилизованных ферментов концентрацию белка определяют модифицированным методом Бредфорд [Asryan *et al.*, 1985], измеряя оптическую плотность суспензии сефарозы в растворе красителя кумасси G-250 при 595нм. Для этого 0,1 мл суспензии (1:1) иммобилизованного на сефарозе белка помещают в кювету с длиной оптического пути 1 см и добавляют 2 мл раствора кумасси. Смесь тщательно перемешивают, не допуская оседания сефарозы. Измерение оптической плотности проводят относительно контрольной пробы, в которую помещают 0,1мл суспензии неактивированной сефарозы (1:1).

Количество белка в опытных пробах вычисляют по калибровочному графику, полученному следующим образом. К 0,1мл суспензии неактивированной сефарозы добавляют увеличивающиеся количества белка, смешивают с 2мл раствора красителя, тщательно перемешивают и определяют оптическую плотность относительно сефарозы, не содержащей белка. Для построения калибровочного графика в качестве стандарта используют раствор бычьего сывороточного альбумина или раствор иммобилизуемого белка. Этим методом можно определять

до 15-20мкг связанного с сефарозой белка (в расчете на мл уплотненного геля) с точностью 6-10%.

Индивидуальные задачи

- Сравнить рН стабильность растворимого и иммобилизованного ферментов
- Определить температурный оптимум иммобилизованного и растворимого ферментов
- Определить активность тетрамерной и димерной форм фермента

1. Алексахина Н.В., Мешкова Н.П. Практическое руководство к занятиям по биохимии животных. Углеводы / М.: МГУ, 1967. – 46с.
2. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лабор.дело, 1988. №11. С.41-43.
3. Антонов М.П., Антонова Л.А., Лапутина Т.В. Особенности определения активности церулоплазмينا с *l*-фенилендиамином в качестве субстрата // Лабор.дело, 1985, №6. С.335-381.
4. Безруков Г.А., Рубин В.И. Метод определения фосфолипазной активности эритроцитов // Лабор. Дело, 1989. №8. С.18-20.
5. Биомониторинг почвы. Методическая разработка / А.В.Гарусов, Ф.К. Алимова, Н.Г. Захарова. – Казань: Изд-во КГУ, 1999. – 47с.
6. Большой спецпрактикум. Часть 1. / Изд-во «Самарский университет», Самара, 1996. 88с.
7. Биохимия гормонов и гормональной регуляции. / Сборник под ред. Н.А.Юдаева. – М.: Медкнига, 1976. – 379 с.
8. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Усп.химии, 1985. Т.54. Вып.9. С.1540-1557.
9. Введение в количественную гистохимию ферментов / Под ред. Т.Б. Журавлевой и Р.Д. Почуханова. – М.: Медицина, 1978. – 238с.
10. Виноградов А.Д., Лейкин Ю.Н., Липская Т.Ю. Биохимия митохондрий. Биоэнергетика / М.: МГУ, 1977. – 63с.
11. Гайер Г. Электронная гистохимия. – М.: Мир, 1974. – 488с.
12. Галактионов В.Г. Иммунология / В.Г. Галактионов. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 528с.
13. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир, 2002. – 234с.
14. Данилевич В.Н., Петровская Л.Е., Гришин Е.В. Быстрая и эффективная экстракция растворимых белков из грамотрицательных микроорганизмов без разрушения клеточных стенок // Биоорганическая химия, 2006. Том 32. №6. С.579-588.
15. Данилова Л.А., Лопатина Н.И. Колориметрический метод определения гликозилированных гемоглобинов // Лабор.дело, 1986, №5. С.281-314.
16. Древаль В.И. Исследование белков животных тканей. Спецпрактикум по биохимии / Куйбышев: издательство Куйбышевского государственного университета, 1978. – 43с.
17. Древаль В.А., Тумаков С.А. Методические разработки к большому практикуму и спецпрактикуму по биологической химии / Куйбышев: Издательство Куйбышевского государственного университета, 1981. – 71с.
18. Долгих Т.М. Современный подход к диагностике и лечению токсоплазмоза.- Омск, 2005. – 147с.
19. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. Теория и практика иммуноферментного анализа. – Москва: Высшая школа.1991. – 288с.
20. Инструкция по применению набора реагентов «Вектор-Бест» для иммуноферментного определения концентрации тиреотропного гормона в сыворотке (плазме) крови. РУ № ФСР 2009/05145.
21. Кадыкина З.М., Колмаков В.Н., Радченко В.Г. Проницаемость эритроцитарных мембран у больных с хроническими заболеваниями печени // Клиническая медицина, 1987. №8. С.15-17.

22. Кишкун А.А. Современная клиническая лабораторная диагностика. 2010. – 744с.
23. Кленова Н.А., Кленов Р.О. Строение, метаболизм и функциональная активность эритроцитов человека в норме и патологии / Самара: Издательство «Самарский государственный университет», 2009. – 116с.
24. Кленова Н.А. Большой спецпрактикум по биохимии. Часть 2. / Изд-во «Самарский университет», Самара. 2000. – 38с.
25. Колб В.Г., Камышенцев В.С. Клиническая биохимия / Минск: «Белорусь», 1976. С.21, 78-84, 114-117, 150-171.
26. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – 366 С.
27. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабор. дело, 1988. №1. С. 16-19.
28. Костюк В.А. Использование системы гептан-изопропанол для экстракции первичных продуктов перекисного окисления липидов // Укр.биох.журнал, 1991. Т.63. №1. С. 98-101.
29. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. – М.:Наука,1990. – 224с.
30. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368с.
31. Лемешко В.В., Бровкович В.М., Листопад А.П. Простой метод определения фосфолипидов в биологических объектах // Укр.биохим.журнал, 1991. Т.63. №1. С.60-66.
32. Лойд З. Гистохимия ферментов. – М.: Мир, 1982. – 326с.
33. Луппа Х. Основы гистохимии / Под ред. Н.Т. Райхлина. – М.: Мир, 1980. – 342с.
34. Манухов И.В., Котова В.Ю., Мальцов Д.Г., Ильичев А.В., Бельков А.П., Завильгельский Г.Б. Индукция окислительного стресса и SOS-ответа в бактериях *E. coli* растительными экстрактами и эффект синергизма при совместном действии с цисплатиной // Микробиология, 2008. Т.77. №5. С.590-597.
35. Маршал В. Дж. Клиническая биохимия. / Пер. с англ. – М.-СПб.: Биом-Диалект, 2011. – 408с.
36. Меньшиков В.В. Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. – М.: Медицина, 1974. –184 с.
37. Мышкин А.Е. Окисление гемоглобина // Успехи химии, 1984. вып.6. С. 1045-1071.
38. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / М., «Наука», 1985. 536с.
39. Остерман Л.А. «Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование», Москва, «Наука», 1981.
40. Петрович Ю.А., Гуткин Д.В. Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе воспаления, ишемии и стресса // Пат.физиол. и экспер.медицина, 1986. №5. С.85-90.
41. Писарева Е.В. Большой спецпрактикум по биохимии. Раздел «Гистохимия». Методические указания. – Самара: Универс-групп, 2006. – 18с.
42. Писарева Е.В. Основы иммунологии: лаб. практикум / Е.В. Писарева. – Самара: Самарский университет, 2009. – 88с.
43. Подковкин В.Г. Молекулярные механизмы гомеостаза и адаптации: практикум / В.Г. Подковкин. – Самара: Самарский университет, 2009. – 88с.
44. Практикум по биохимии / под редакцией С.Е. Северина и Г.А. Соловьевой. – М.: Издательство МГУ, 1989. – 509с.

45. Практикум по гистологии, цитологии и эмбриологии / Под ред. Н.А. Южной, А.И. Радостинной. - М.:
46. Практикум по иммунологии: Учеб. пособие /Под ред. И. А. Кондратьевой, В. Д. Самуилова. – М.: Изд-во МГУ, 2000. – 224 с.
47. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство. Р 4.1.1672-03 / Под ред. И.М. Скурихина, В.А. Турельяна. 2003, С.150, 156.
48. Сабурова Е.А., Ягодина Л.О. Кинетические исследования механизма снятия субстратного ингибирования лактатдегидрогеназы анионами и pH // Биохимия, 1990. Т.55, вып. 10. С.1819-1825.
49. Савич И.М., Тажибаева Т.Л. Влияние холодового стресса на изопероксидазы проростков кукурузы и пшеницы, различающиеся по изоэлектрическим точкам // Физиология растений, 1988. Т.35, вып. 5. С.841-847.
50. Семченко В.В., Барашкова С.А., Ноздрин В.Н., Артемьев В.Н. Гистологическая техника: учебное пособие. – Омск-Орел: Омская областная типография, 2006. – 290с.
51. Скорняков В.И., Скворцов С.В., Кожемякин Л.А. Определение активности лактатдегидрогеназы с применением оптического теста Варбурга // Лабор.дело, 1989, №9. С.52-55.
52. Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С.63-66.
53. Современные методы лабораторной диагностики (ИФА, ПЦР). Руководство для врачей / Кривенчук Н. А., Решетников О.В., Зимина И. Ю. – Новосибирск, 2002. – 65с.
54. Строев Е.А., Макарова В.Г. Практикум по биологической химии. М.: Высшая школа, 1986. С. 60-64.
55. Токтамысова Э.С., Биржанова Н.Х. О мембраносвязанном гемоглобине // Биофизика, 1990. Т.35, вып.6. С.1019-1020.
56. Технический паспорт устройства «Микротом-криостат».
57. Ткачук В.А. Введение в молекулярную эндокринологию. – М.: МГУ, 1983. – 256с.
58. Тумаков С.А., Тимирбулатов Р.А., Савченко Р.П. Методы количественного определения белков: теоретические основы, дифференцированный подход и практическое использование / Самара-Пенза, 2006. – 88с.
59. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей химии / М.: «Просвещение», 1982. С. 217-241.
60. Фримель Г. Иммунологические методы / Пер. с нем. А. П. Тарасова. – М.: Медицина, 1987, – 472с.
61. Фролов Ю.П. Современные методы биохимии. – Самара: Самарский университет, 2003. – 411с.
62. Фролов Ю.П., Васильева Т.И., Теньгаев Е.И. Современные методы биохимии: лабораторный практикум / Самара, изд-во «самарский университет», 2011.
63. Химия белка. Спецпрактикум /составитель О.Н. Макурина, Самара, СамГУ,1999. 47с.
64. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. //Anal. Biochem. – 1976 – V. 72, No 12 – p. 248-254.
65. Doris L. Lefkowitz, James Mone, Stanley S. Lefkowitz Myeloperoxidase: The Good, the Bad, and the Ugly.// Current Immunology Reviews, 2010. V 6, N 2. P123-129.
66. Jun F. Liang, Yong T. Li, Victor C. Yang Biomedical Application of Immobilized Enzymes. //Jour. of Pharm. Sci., 2000. V. 89, N.8. p. 979-989

67. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. V. 227. P. 680-685.

68. Schagger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 1987. V. 166, P. 368-379.

69. Scopes R.K., Stoter A. "Methods in Enzymology", 1982. V.90. P. 479-491.

70. Vdovenko M.M., Zubkov G.I., Kuznetsova Delia Ciana, Kuzmina N.S., Sakharov I.Yu. Development of ultrasensitive soybean peroxidase-based CL-ELISA for determination of human thyroglobulin // *Journal of Immunological Methods*, 2010. V. 362. P.127-130.

71. Wolf-Dieter Fessner, Thorleif Anthone. *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions* -John Wiley & Sons. 2009. P. 375.

72. Yasykova M.Y., Arutyunov D.Y., Danshina P.V., Pleten A.P., Schmalhausen E.V., Muronetz V.I. Role of phosphorylating and non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in an uncoupling of the process of oxidation and phosphorylation in glycolysis//Abstracts of the International conference "BIOCATALYSIS-2002.-fundamentals and applications".-Moscow. 2002. P.148-149.

Оглавление

Раздел 1. Справочные сведения (<i>Н.А. Кленова</i>).....	3
Раздел 2. Белки (<i>Н.А. Кленова, О.Н. Макурина</i>).....	15
Раздел 3. Ферменты (<i>Н.А. Кленова, О.Н. Макурина, Е.В. Писарева</i>).....	36
Раздел 4. Углеводы (<i>Н.А. Кленова</i>).....	76
Раздел 5. Липиды (<i>Н.А. Кленова</i>).....	86
Раздел 6. Нуклеиновые кислоты (<i>О.Н. Макурина</i>).....	97
Раздел 7. Гормоны и витамины (<i>Е.В. Писарева</i>).....	110
Раздел 8. Иммунологические методы исследования (<i>М.Ю. Языкова</i>).....	128
Раздел 9. Исследовательские задания БСП (<i>М.Ю. Языкова</i>).....	138
Список использованных источников.....	143

Дизайн и верстка: Ильдуртов А. О.

Подписано в печать 15.08.2013 г.

Формат 60 X 84 1/16

Бумага офсетная. Печать офсетная.

Услов. печ. листов 4,3

Тираж 100 экз.

Издательство ООО «БМВ и К»
443110, г. Самара, ул. Ново-Садовая, д. 44, оф. 310
Отпечатано в типографии и ООО «С-Принт»