

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПО ВЫСШЕМУ ОБРАЗОВАНИЮ
САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БОЛЬШОЙ СПЕЦПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ

ЧАСТЬ 1.

БИОМОЛЕКУЛЫ: СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА, ПРЕВРАЩЕНИЯ

Издательство "Самарский университет",
1996

Методическое пособие предназначено для студентов, специализирующихся по биологической химии. В представленной первой части отражены вопросы техники постановки биохимического исследования, механизмы стандартизации, составления формул расчета показателей, приготовления и расчета составов инкубационных смесей для определения активностей ферментов и содержания метаболитов. Приводятся методы и предлагаются задания для студентов по основным разделам большого спецпрактикума по биохимии: белки, ферменты, углеводы, липиды и нуклеиновые кислоты. В практикуме приводятся современные методики исследования с постановкой экспериментальной задачи, что позволяет студентам глубже освоить принципы современной научно-исследовательской работы и улучшить их профессиональную подготовку в области биологической химии.

Составитель ассис. Н. А. Кленова

Отв. редактор канд. биол. наук Ю. П. Фролов

РАЗДЕЛ 1. ТЕХНИКА ПОСТАНОВКИ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Перед началом исследований биохимик должен научиться свободно ориентироваться в концентрациях, поскольку любой метод включает определенную химическую реакцию или несколько протекающих при определенных условиях.

Тема 1. Концентрации растворов. Понятие конечной концентрации. Методы приготовления растворов

Для приготовления раствора нужной концентрации навеску поместить в чистый стаканчик подходящего размера и добавить небольшое количество растворителя. Если растворение затруднено, целесообразно стаканчик поместить на магнитную мешалку, если вещество хорошо растворяется, используют стеклянную палочку. Если в условии приготовления указана водяная баня (кипящая или определенной температуры), то стаканчик помещается в водяную баню. После растворения раствор количественно переносится в мерную посуду соответствующего объема и доводится растворителем до метки. Если разводимое вещество жидкость, то необходимое количество помещается сразу в мерную посуду и доводится растворителем до метки.

1. Процентная концентрация

Определение. Количество г вещества в 100 мл раствора (г%). Иногда применяется выражение мг% (количество мг в 100 мл раствора).

Задания для студентов

1. Рассчитайте приготовление 50 мл раствора хлористого кальция 0,273% концентрации из 10%-го раствора, используя метод креста (см. Методические разработки к БСП по биологической химии. С.4).

2. Рассчитайте приготовление 50 мл 5%-го раствора CuSO_4 из $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

3. Рассчитайте приготовление 75 мл 0,25%-го раствора натрия фосфорнокислого двузамещенного из кристаллогидрата, содержащего 12 молекул воды.

Желательно выполнение каждым студентом расчета индивидуально ему предложенного варианта раствора.

4. Приготовить 0,9%-ый раствор хлористого натрия, поместить в холодильник для дальнейших работ.

5. Приготовить 3,8%-ый раствор цитрата натрия (используется для последующих работ).

2. Молярная концентрация. Понятие конечной концентрации

Определение. Количество молей вещества в 1000 мл раствора.

Задания для студентов

1. Приготовить 0,2М раствор натрия фосфорнокислого однозамещенного в объеме 200 мл.

2. Приготовить 0,2М раствор натрия фосфорнокислого двузамещенного в объеме 200 мл.

3. Приготовить 0,2М раствор цитрата натрия (М.М. 210).

Перечисленные растворы в дальнейшем используются для приготовления буферов.

4. Рассчитайте, какой процентной концентрации соответствует 0,154 М раствор хлористого натрия.

В биохимических методиках исследования обычно используется понятие конечной концентрации. Конечная концентрация – это количество вещества (в М, мМ, мкМ), которое должно содержаться в растворе, если его объем равнялся бы одному литру.

3. Нормальная концентрация

Определение. Это количество г-экв в 1000 мл раствора.

М.М.

экв -----

валентность

Применяется реже, в основном в отношении кислот или щелочей.

Расчет концентраций кислот

Понятие объемной массы. Объемная масса равна произведению плотности раствора кислоты на процентность.

Задания для студентов

1. В лаборатории имеется 36%-ая соляная кислота плотностью 1,174. Рассчитать: а) сколько взять кислоты, чтобы приготовить 100мл 0,1N раствора? б) сколько взять кислоты, чтобы приготовить 100 мл 0,25N раствора?

2. В лаборатории имеется 100%-ая уксусная кислота плотностью 1,0498. Приготовьте 100 мл 0,2M раствора. Раствор в дальнейшем используется для приготовления буферных растворов.

Для закрепления материала по приготовлению растворов необходимой концентрации рекомендуется предложить студентам решение нескольких задач.

1. Гипс $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ при нагревании до 128°C теряет три четвертых своей воды, превращаясь в другой гидрат - жженный гипс. Какова формула этого гидрата?

2. Стандартный медный купорос должен содержать от 24,95 до 25,20% меди. Каково содержание (в процентах) кристаллогидрата $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в медном купоросе, содержащем 25% меди?

3. Необходимо приготовить 1 л 20%-го раствора серной кислоты, имеющей плотность 1,140, из 93,6%-ой кислоты, плотность которой 1,830. Сколько для этого нужно 93,6%-ой кислоты и воды?

4. Сколько необходимо воды и 87%-го раствора соли для приготовления 600 г 55%-го раствора?

5. Сколько 8- и 75%-го раствора необходимо для приготовления 400г 42%-го раствора?

6. Из растворов серной кислоты, плотности которых при 15°C 1,380 и 1,755, требуется приготовить 440 г раствора кислоты, плотность которой при той же температуре 1,535. Сколько граммов понадобится каждой из исходных кислот?

Тема 2. Расчет составов инкубационных смесей. Основы разработки методов определения концентраций веществ

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

Состав инкубационных смесей (или сред) всегда выражается в конечных концентрациях.

Реакции обычно проводятся в определенных объемах, необходимых для проведения измерения, поэтому задачей исследователя часто становится расчет оптимальных объемных соотношений инградиентов инкубационной смеси. В этих случаях обязательно учитываются следующие моменты:

- а) условия хранения инградиентов;
- б) дефицитность части инградиентов;
- в) необходимость устранения неточностей при взвешивании;
- г) возможность поглощения света тем или иным инградиентом смеси при определенной длине волны.

Задания для студентов

1. Рассчитайте состав 50 мл инкубационной смеси, если она содержит в конечных концентрациях 0,1М Трис-HCL, 5мМ ЭДТА, 2мМ NADP, 2мМ глюкозо-6-фосфата, 0,05М хлористого магния.

2. Инкубационная смесь для определения активности Феррицианидредуктазы содержит 0,01М Трис-HCL, 5мМ ЭДТА, 0,2мМ $K_3Fe/CN/6$, 2мМ НАДН.

- а) Рассчитайте состав смеси на 10 мл.
- б) Определите объемные соотношения инградиентов, если: объем смеси не должен превышать 4 мл; НАДН не хранится и является дорогим и дефицитным реактивом; объем исследуемой жидкости может варьировать от 100 до 20 мкл; точность взвешивания не более чем 1 мг.
- в) Предложите возможный ход определения активности, если известно, что оптическая плотность раствора НАДН в 6 раз выше при длине

волны 340 нм, чем у НАД⁺ (оптический тест Варбурга), а в ходе реакции происходит восстановление феррицианида калия НАДН-феррицианидредуктазой, а в качестве исследуемой жидкости используется гемолизат эритроцитов с содержанием гемоглобина не более, чем 2-4 г/л.

3. Инкубационная среда для определения активности 5-нуклеотидазы содержит 4.0мМ АМФ; 1.0мМ хлористого магния; 50 мМ ТРИС-а, рН 7.0; 1.0мМ ЭДТА. Пробы должны содержать 2.5-3.0 мг белка. Рассчитайте состав инкубационной смеси в удобных для определения соотношениях объемов, если известно, что после инкубации реакция останавливается добавлением 1 мл 10%-го холодного раствора ТХУ-ой кислоты, а объем инкубационной смеси должен быть в 1.5-2 раза меньше, чем количество осадителя.

4. Инкубационная смесь для определения активности общей АТФ-азы содержала 50 мМ ТРИС-НСl, рН 7.0; 1 мМ ЭДТА; 100 мМ хлористого натрия; 10 мМ хлористого калия; 2мМ АТФ; 3мМ хлористого магния. Рассчитайте удобные для определения соотношения ингредиентов инкубационной смеси (в объемах), если известно, что активность определяется в 0.1мл концентрированной суспензии митохондрий, а останавливается добавлением 0.2 мл ТХУ 5%-го раствора.

Тема 3. Методы стандартизации. Выводы формул расчетов концентраций метаболитов и активностей ферментов. Единицы измерений

В современных исследованиях для определения концентраций веществ используют чаще всего методы абсорбционного анализа: фотоколориметрический, спектрофотометрический. В данном случае для расчетов используют известный закон Бугера-Ламберта-Бера. Концентрация вещества в растворе прямо пропорциональна оптической плотности, толщине поглощающего слоя и зависит от длины волны.

$$\lg \frac{I_1}{I_0} = a \frac{C_1}{L \lambda}, \text{ где}$$

$$\lg \frac{I_1}{I_0} - \text{оптическая плотность (E);}$$

L - толщина поглощающего слоя;

C₁ - концентрация вещества в растворе.

Если C равна 1M, а толщина поглощающего слоя 1 см, то коэффициент а обозначается как молярный коэффициент экстинкции и выражается в M⁻¹cm⁻¹. Молярный коэффициент экстинкции обозначается греческой буквой ε .

1. Определение молярного коэффициента экстинкции

Находится как среднее значение при построении графика зависимости E от C.

$$\epsilon = \frac{E_1}{C_1} / n .$$

2. Составление формул расчета

$$X \text{ мм(мкМ)} = \frac{\Delta E \cdot P \cdot V_1}{\epsilon \cdot V_2 \cdot CT(t)} , \text{ где}$$

ΔE - оптическая плотность по разнице с контролем реактивов;

P - разведение исходного исследуемого материала;

V₁ - объем инкубационной смеси (мл);

ε - молярный коэффициент экстинкции;

V₂ - объем исследуемой жидкости;

CT - механизм стандартизации;

t - время инкубации (для определения активности ферментов).

Единицы измерений. Обычно используется система СИ - моль, кг, л, секунда, метр. Но могут использоваться также и мм, мкМ, нМ, мл, минуты, часы.

Задания для студентов

1. Составьте формулу расчета для определения активности феррици-анидредуктазы (состав инкубационной смеси возьмите из предыдущей темы), если известно, что стандартизация осуществляется за счет опре-

деления гемоглобина в исследуемых гемолизатах эритроцитов и выражается в г/л, а время инкубации 10 мин. Единицы измерения активности, таким образом, получаются в М НАДН в мин на грамм гемоглобина в литре. Молярный коэффициент экстинкции НАДН равен $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2. Для определения активности ЛДГ (лактатдегидрогеназа) используют 3,0 мл фосфатного буфера 0,1 М, pH 7,4; 0,1 мл раствора НАДН 6ММ; 0,1 мл раствора пировинограднокислого натрия 6ММ; реакция длится три минуты; молярный коэффициент экстинкции $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Составьте формулу расчета активности в ММ НАДН в мин на мг белка в мл раствора, если для определения активности используются: а) сыворотка крови 0,1 мл с содержанием белка 65 г/л; б) гемолизат эритроцитов, 10 мкл (гемолизат готовится разведением 0,1 мл эритроцитов 0,2 мл 0,2%-го раствора тритона X-100 и 0,7 мл дист. воды и содержит 2,5 г гемоглобина на литр).

Расчет концентраций веществ может осуществляться с помощью эталонных растворов с известным содержанием определяемого вещества (расчет по стандарту). Проба, содержащая известное количество определяемого вещества, проводится через все стадии методики определения, а затем расчет производится следующим образом:

$$X (\text{мм, мкм}) = C \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}}, \text{ где}$$

C – концентрация вещества в стандарте;

$E_{\text{оп}}$ – либо оптическая плотность опытного раствора, либо показатель флуоресценции,

$E_{\text{ст}}$ – подобный показатель у стандартного раствора.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Древаль В. А., Тумаков С. А. Методические разработки к большому практикуму и спецпрактикуму по биологической химии. Куйбышев: Куйбышевский государственный университет, 1981.

РАЗДЕЛ 2. БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

Концентрация водородных ионов в среде (в клетках, внутренней среде организма) является мощным и быстрым регулятором биохимических процессов. Для изучения биохимических процессов используются различные буферные растворы, сохраняющие определенный рН, необходимый для их протекания.

Тема 1. Приготовление и свойства буферных растворов

Буферные растворы обычно состоят из 2-х составных частей: одна более кислая, другая более щелочная. Необходимая концентрация водородных ионов достигается смешиванием их в определенных пропорциях. Буферная емкость зависит от свойств составных частей и их молярности (концентрации). Молярность буфера определяется молярностью его составных частей.

1. Свойства буферных растворов

Буферные растворы прежде всего характеризуются буферной емкостью. Буферная емкость – это количество мл сильной кислоты или щелочи, которое необходимо добавить к 1 л буферного раствора, чтобы изменить его рН на 1 единицу.

Задание 1. Приготовьте различные буферные смеси с рН 5,0; 3,0; 6,0; 8,0; 7,0, используя составные части, приготовленные на предыдущих занятиях, и пользуясь "Методическими разработками к большому практикуму и спецпрактикуму по биологической химии" (С.7–29).

- 1). Для приготовления смесей с рН от 6,0 до 8,0 используйте фосфатные буферы различной молярности (0,1М; 0,05М; 0,01М).
- 2). Для приготовления смесей с рН 3,0; 4,0; 5,0 используйте цитратные буферы различной молярности (0,1М; 0,05М; 0,01М).
- 3). Определите буферную емкость приготовленных смесей, используя 0,1N раствор NaOH или 0,1N раствор HCl.

Для этого в стаканчик внесите 50 мл определенной буферной смеси, поместите его на рН-метр, определите его истинную рН (она может несколько отличаться от указанной в таблице, но это в данном случае не существенно). Затем, используя либо кислоту, либо щелочь, определите количество в мл необходимое для сдвига рН на единицу. Рассчитайте

буферную емкость (по кислоте или по щелочи) по формуле:

$B = V \cdot N$, где

B – буферная емкость;

V – объем кислоты или щелочи в пересчете на 1000 мл буферной смеси;

N – нормальность кислоты или щелочи, используемой для титрования.

Задание 2. Определение буферной емкости сыворотки или плазмы

В крови буферная емкость обусловлена наличием бикарбонатной системы ($\text{H}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$), фосфатной ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) и белковыми буферными системами.

1). Определите pH сыворотки с помощью универсального индикатора или на pH-метре.

2). Разведите сыворотку в два раза. Определите, изменяется ли pH.

3). Проведите определение буферной емкости сыворотки по кислоте и щелочи на pH-метре или с помощью универсального индикатора. При расчете буферной емкости учтите разведение сыворотки.

4). Проведите подобные исследования с плазмой крови.

5). Ответьте на следующие вопросы: 1. Изменяется ли pH сыворотки и плазмы при разведении дист. водой? 2. Буферная емкость сыворотки выше по кислоте или по щелочи и почему? А плазмы?

Для изучения приготовления буферных растворов используйте "Методические разработки к большому практикуму и спецпрактикуму по биологической химии" (С. 7-29).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Фрайнфельдер Д. Физическая биохимия. М.: Мир, 1980. С.88-94.
2. Древаль В.А., Тумаков С.А. Методические разработки к большому практикуму и спецпрактикуму по биологической химии. Куйбышев: Куйбышевский государственный университет, 1980. 70с.

РАЗДЕЛ 3. БЕЛКИ

Тема 1. Методы осаждения белков

Во многих биохимических методиках бывает необходимо для определения изучаемых веществ осадить белки. Несмотря на то, казалось бы множество методов осаждения, 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.

Задание 1. Разлейте в пробирки по 0,5 мл концентрированных азотной, соляной, серной, уксусной, хлорной кислот. Осторожно из пипетки наложите раствор белка. Наблюдайте образование осадка на границе раздела сред. Встряхните пробирки, определите, в избытке каких кислот белки растворяются?

Чаще других для осаждения белков применяют следующие кислоты различных концентраций:

- а) метафосфорная кислота (3–15%-ый раствор);
- б) хлорная кислота (0,1–1 М раствор);
- в) трихлоруксусная кислота (от 5 до 20%);
- г) сульфосалициловая кислота (10–20%);
- д) фосфорновольфрамовая кислота (3–10%).

Задания для студентов

Приготовьте следующие растворы кислот:

- а) 3 и 10%-ые растворы метафосфорной кислоты;
- б) 3 и 10%-ые растворы фосфорновольфрамовой кислоты;
- в) 0,1 и 1М растворы хлорной кислоты;
- г) 5 и 10%-ые растворы трихлоруксусной кислоты;
- д) 10 и 20%-ые растворы сульфосалициловой кислоты.

Для проведения дальнейших исследований приготовьте также:

- а) раствор яичного альбумина: 0,5 мл цельного яичного белка разведите в 20 раз дист.водой. Осадок нерастворимых в воде глобулинов отфильтруйте;

б) гомогенат животной ткани: 0,5 г печени или другой ткани отмойте физиологическим раствором от крови, просушите фильтровальной бумагой и, предварительно измельчив ножницами, гомогенизируйте в 10-кратном объеме 0,1М фосфатного буфера, pH 7,4. Освободите гомогенат от крупных неразрушенных частей тканей центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 минут. Часть гомогената сразу же оставьте в холодильнике для последующего количественного определения белка (1-2 мл). Остальное используйте для проведения ниже описанных исследований.

в) сделайте навеску 0,5 г любой растительной ткани. Измельчите, разотрите в ступке с 10-кратным объемом дист. воды. Гомогенат отцентрифугируйте при 2000 об/мин в течение 10 минут. Часть гомогената также оставьте для количественного определения белка, другую часть используйте для проведения ниже описанных исследований.

г) 2 мл крови с антикоагулянтот отцентрифугируйте при 2000 об/мин в течение 10 минут, плазму осторожно (без эритроцитов!) отберите в чистую сухую пробирку, а осадок форменных элементов крови отмойте дважды физиологическим раствором, применяя тот же режим центрифугирования. Затем приготовьте гемолизат эритроцитов, используя для разрушения клеток холодную дист. воду в соотношении 1:9.

После приготовления исследуемых жидкостей студентам предлагается решение нескольких исследовательских задач:

1. Сравните качество осаждения белков различными видами кислот и установите концентрационную зависимость. Расположите кислоты в порядке возрастания качества осаждения белка. Используйте для этого исследования раствор яичного альбумина.

2. Определите наиболее оптимальный способ осаждения белков для приготовленных объектов исследования: гомогената животной и растительной ткани; сыворотки крови; эритроцитарного гемолизата.

Преподаватель предлагает студентам найти самим способ решения поставленных задач. Затем проводит корректировку предложенного студентами хода исследования, распределяет работу. В конце занятия или в начале следующего анализируются результаты.

Тема 2. Методы выделения и очистки белков

Получение кристаллического яичного альбумина

(Филиппович Ю.Б. и соавт. Практикум по общей биохимии, 1982)

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

Ход работы. Белок 2 свежих куриных яиц тщательно отделите от желтков и поместить в мерный цилиндр на 100 мл с притертой пробкой. Прилить равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, закрыть крышкой и тщательно перемешать. При полунасыщении раствора сульфатом аммония в осадок выпадают глобулины. Отфильтруйте осадок глобулинов через складчатый фильтр в цилиндр меньшего объема. К прозрачному фильтрату прибавьте тонко размельченный порошок сульфата аммония из расчета 1,35г на мл раствора и длительно перемешать, добиваясь полного растворения кристаллов. Таким образом получается 70%-ый раствор сульфата аммония, из которого выпадает в осадок альбумин. Осадок альбумина отфильтровывают с помощью колбы Бунзена (или получают с помощью центрифугирования, подбирая число оборотов и время по характеру осадка). Осадок переносят в химический стакан на 50 мл и растворяют в минимальном объеме воды. К полученному раствору по каплям при перемешивании добавляют раствор 4%-ой уксусной кислоты, контролируя pH раствора 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 встряхивании до получения исчезающей мутности. Стаканчик накрывают чистым стеклом и ставят в холодильник. Через сутки или более выпадают кристаллы яичного альбумина. Кристаллы высушиваются и в дальнейшем используются для построения калибровочных кривых по альбумину.

Получение миозина. 5-10 г говяжьего фарша поместите в пробирку и залейте 10-15 мл дист. воды. Оставьте на 15 минут, периодически помешивая (таким путем удаляются альбумины). Затем содержимое пробирки профильтруйте через два слоя марли и мышечную кашицу хорошо отожмите руками от воды. Статую мышечную кашицу поместите в чистую пробирку

и залейте 12-15 мл 10%-го раствора хлористого аммония для извлечения миозина. Экстракцию миозина производят в течение получаса при постоянном встряхивании при комнатной температуре. Солевую вытяжку профильтруйте через складчатый фильтр или декантируйте (слейте жидкость после отстаивания жидкости). В полученную жидкость добавляют порошок поваренной соли до насыщения - выпадает обильный осадок миозина. Дайте жидкости отстояться и осторожно слейте ее. Проведите очистку миозина от неорганических примесей путем диализа.

Изготовление диализатора. Вырежьте из целлофана круг диаметром 9-12 см. Сложите его в форме мешочка и вставьте внутрь стеклянную трубочку небольшого размера. Место соединения целлофана и трубочки завяжите шнурком. Испытайте мешочек на прочность, поместив туда дист. воду (мешочек не должен пропускать воду).

Осадок миозина вместе с оставшейся в нем жидкостью поместите в мешочек и проведите диализ против дист. воды (объем воды примерно около литра), опустив мешочек в дист. воду так, чтобы весь осадок был погружен. Проведите диализ в течение 17-24 часов. После диализа осадок поместите в биксик и высушите в термостате при 37°C. Миозин подпшите и оставьте в холодильнике для дальнейших работ.

Методы экстрагирования белков из тканей

(Древаль В.И. Исследование белков животных тканей, 1978)

30-50% белкового компонента животной ткани экстрагируется водой, растворами солей, буферными растворами, разбавленными кислотами и щелочами. Эту часть белков принято называть водорастворимой. Белки, не экстрагируемые классическими водными растворителями, относят к водонерастворимым белкам. Они являются мембраносвязанными белками. Эффективно экстрагировать мембранные белки удается растворами поверхностно-активных веществ.

Экстракция водорастворимых белков

Ход работы. 2-3 г свежевыделенной ткани поместите в чашку Петри, стоящую на льду. Ткань отмойте от крови в дист. воде и освободите от жира, соединительной ткани, оболочек. Обработанную ткань подсушите на фильтровальной бумаге и взвесьте. Затем измельчите ножницами и гомогенизируйте с 20-кратным объемом (по отношению к весу ткани) охлажденной дист. воды до образования равномерной суспензии. Гомогенат оставьте на 30 минут для лучшей экстракции при периодическом помешивании. Затем отцентрифугируйте при 6000 об/мин 20 минут.

Надосадочную жидкость слейте в чистую пробирку и сохраните, а осадок 1 суспендируйте в 10-кратном объеме дистиллированной воды (по отношению к весу взятой ткани) и заморозьте. После размораживания суспензию еще раз гомогенизируйте и снова отцентрифугируйте. После такой обработки максимально экстрагируются водорастворимые белки. Соедините экстракты 1 и 2. Экстракты сохраните для дальнейших работ.

Солюбилизация водонерастворимых белков

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

Ход работы. Приготовьте реактивы: 0,3%-ый раствор додецилсульфата натрия в 0,06 М трис-HCl буфере, pH 6,7; 0,3%-ый раствор тритона X-100 в 0,06 М трис-HCl буфере, pH 6,7.

Осадок, оставшийся после последнего центрифугирования, суспендируйте с 40-кратным объемом раствора тритона X-100 и инкубируйте в термостате при 37°C 1 час, перемешивая периодически. Затем суспензию отцентрифугируйте с тем же режимом, что и в предыдущей работе. Экстракт тритон-растворимых белков соберите в сухую, чистую пробирку и сохраните для последующих работ (количественное определение белка). Осадок суспендируйте с 40-кратным объемом додецилсульфата натрия, инкубируйте 1 час при 37°C, помешивая, затем отцентрифугируйте в тех же условиях. Экстракт ДДС-растворимых белков сохраните для дальнейших работ, а осадок отбросьте.

Тема 3. Количественный анализ белков

Для количественного определения содержания белков в биологическом материале применяют следующие методы: азотметрический (старый, сейчас применяют мало), фотоколориметрические, спектрофотометрические, нефелометрические, рефрактометрические. Методы делятся также на методы определения общего содержания белка, водорастворимых белков, индивидуальных или группы белков.

Фотоколориметрические методы основаны на цветных реакциях на функциональные группы или связи. Наиболее распространенными в этой группе методов являются биуретовая реакция (на пептидные связи) и реакция Фолина (на ароматические группы аминокислот).

Методы, использующие биуретовую реакцию:

1. Биуретовый

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

Реактивы: 1) 0,9%-ый раствор хлористого натрия; 2) 0,2 Н раствор едкого натра, свободный от углекислого газа (приготовленный на хорошо прокипяченной дист. воде; 3) биуретовый реактив: 4,5 г калия-натрия виннокислого (сегнетова соль) растворяют в 40 мл 0,2 Н раствора едкого натрия. После растворения прибавляют 1,5 г медного купороса и 0,5 г йодистого калия. Раствор доливают до 100 мл 0,2 Н NaOH. Реактив хранится в посуде темного стекла около месяца; 4) 0,5%-ый раствор йодистого калия в 0,2 Н NaOH. Хранить в посуде темного стекла не более двух недель; 5) рабочий раствор биуретового реактива: 20 мл биуретового реактива (3) смешивают с 80 мл раствора KI (4). Хранится в темноте не больше 2-х недель; 6) стандартный раствор альбумина 10 г% (приготовьте из полученного ранее кристаллического альбумина) на 0,9%-ом хлористом натрии.

Ход определения. Из 10 г% стандартного раствора белка приготовьте рабочие стандартные растворы по следующей схеме:

Н пробирки	Стандарт. р-р белка, мл	0,9%-ый NaCl, мл	Концентрация, г%
1	0,4	0,6	4
2	0,6	0,4	6
3	0,8	0,2	8
4	1,0	-	10

Из каждого разведения отберите по 0,1 мл и внесите в пробирки, содержащие по 5 мл рабочего раствора биуретового реактива. Через 30 мин. экстинкцию стандартных проб измерьте при длине волны 540–560 нм против контроля (5 мл биуретового реактива и 0,1 мл 0,9%-го NaCl). Из каждого разведения стандартного раствора сделайте не менее 3 повторов.

Для каждого разведения посчитайте среднюю оптическую плотность и постройте график зависимости E от C (концентрация белка в г%). График можно считать пригодным для использования, если отношение E/C постоянно на всей калибровочной прямой (коэффициент экстинкции).

После определения коэффициента экстинкции проведите определение количества общего белка в пробах, полученных на предыдущих занятиях. А также проведите определение содержания общего белка в сыворотке крови (0,1 мл сыворотки и 5 мл биуретового реактива) по той же схеме, что и для построения калибровочного графика. Нормальное содержание общего белка в сыворотке крови у взрослых 6,5–8,5 г в 100 мл сыворотки.

Определение белка микробиуретовым методом

В основе метода лежит образование фиолетового комплексного соединения Cu^{2+} и пептида при обработке белка щелочным раствором сернокислой меди. Для развития окраски необходимо наличие, по крайней мере, двух пептидных связей. Чувствительность данного метода выше, чем у биуретового и составляет 0,1–2 мг белка в пробе.

Реактивы: стандартный раствор альбумина 2 мг/мл; 6%-ый раствор NaOH; реактив Бенедикта: 17,3 г цитрата натрия и 10 г карбоната натрия растворяют в 50 мл воды при подогревании (не доводя до кипения). Затем при перемешивании добавляют 1,73 г сульфата меди (пятиводного), предварительно растворенного в 10 мл воды. Смесь доводят водой до 100 мл.

Ход определения. Исследуемый раствор белка, содержащий 0,1–2 мг, доводят водой до объема 2 мл. Затем добавляют 2 мл 6%-го раствора щелочи и 0,2 мл реактива Бенедикта. Через 15 мин. измеряют экстинкцию при длине волны 330 нм, используя в качестве контроля раствор, состоящий из 2 мл воды, 2 мл щелочи и 0,2 мл реактива Бенедикта.

Для построения калибровочной кривой и расчета коэффициента экстинкции используйте стандартный раствор альбумина (приготовьте раствор из яичного альбумина, полученного на предыдущих занятиях).

Заполнение проб при построении калибровочной кривой микробиуретовым методом

Количество белка в пробе, мг	0,1	0,4	0,7	1,0	1,5	2,0
Стандартный раствор белка, мл	0,1	0,4	0,7	1,0	1,5	2,0
Вода, мл	1,9	1,6	1,3	1,0	0,5	
6%-ый раствор NaOH, мл	2	2	2	2	2	2
Реактив Бенедикта, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Разлейте для каждой концентрации белка не менее 3 повторов, рассчитайте среднюю оптическую плотность для каждой концентрации белка и постройте калибровочный график. По графику рассчитайте коэффициент экстинкции (среднюю его величину найдите как среднее арифметическое 8-10 отношений Е/С).

Используйте microbiуретовый метод определения белка в полученных гомогенатах (занятия по экстрагированию белков) и сравните полученные данные с данными в случае использования биуретового метода.

Определение белка по методу Лоури

Метод сочетает биуретовую реакцию и реакцию на тирозин и триптофан. Чувствительность метода очень высока - 10-100 мкг белка в пробе.

Реактивы: стандартный раствор альбумина 0,25 мг/мл; 2%-ый раствор карбоната натрия в 0,1 М растворе едкого натра (1); 0,5%-ый раствор сернокислой меди в 1%-ом цитрате натрия (2).

Непосредственно перед употреблением 1 мл реактива 2 смешивают с 50 мл реактива 1 (реактив 3).

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

фосфорной кислоты и 50 мл концентрированной HCL. Полученный раствор кипятят в колбе на 1 л с обратным холодильником в течение 10 часов. Затем добавляют 75 г сернокислого лития, 25 мл воды, 3 капли брома и кипятят без холодильника 15 минут для удаления избытка брома. Охлажденный раствор доводят водой до 500 мл и фильтруют. Перед употреблением реактива необходимо знать его кислотность, поэтому ее определяют, титруя небольшую часть (5-10 мл) 1 Н раствором щелочи, и рассчитывают его кислотность. Затем реактив разбавляют водой до кислотности, соответствующей 1 Н раствору соляной кислоты. Можно воспользоваться рН-метром. Для этого приготовьте 1 Н раствор соляной кислоты из фиксанала и измерьте его рН. Измерьте рН полученного раствора реактива Фолина, доведите его водой до рН, соответствующего рН 1Н раствора соляной кислоты.

Ход определения. Исследуемый раствор, содержащий 10-100 мкг белка, доведите водой до 0,4 мл, смешайте с 2 мл реактива 3 и спустя 10 минут, добавьте 0,2 мл реактива Фолина-Чокальтеу. Через 40 минут пробы проколориметрируйте при длине волны 750 нм против контроля на реактивы (0,4 мл воды, 2 мл реактива 3 и 0,2 мл реактива Фолина). Определите толщину поглощающего слоя (размер кюветы) исходя из объема реакционной смеси. Для построения калибровочного графика приготовьте необходимые разведения стандартного раствора белка по аналогии с предыдущими методами определения белка, постройте калибровочный график и рассчитайте коэффициент экстинкции. Метод будет использован в дальнейших работах для определения белка во фракциях субклеточных структур.

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: 16,75 г NaOH растворяют в 200 мл дист. воды, добавляют 113,40 г K_2HPO_4 , встряхивают и размешивают до полного растворения. Охлаждают до комнатной температуры и доводят водой до 250 мл.

2. Разведенные растворы фосфатов:

а) 46,25 мл осн. раствора до 50 мл водой;

- б) 37,45 мл осн. раствора до 50 мл водой;
- в) 35,39 мл осн. раствора до 50 мл водой;
- г) 29,40 мл осн. раствора до 50 мл водой;
- д) 24,30 мл осн. раствора до 50 мл водой.

Ход определения: В штатив поместите 7 пробирок: одна контрольная, обозначьте ее нулевой. В нулевую пробирку внесите 10 мл дист. воды. В пробирки N 1, 2, 3, 4, 5 внесите соответственно по 5 мл растворов а, б, в, г, д. В пробирку N 6 внесите 0,5 мл сыворотки крови, 0,75 мл дист. воды и 3,75 мл основного фосфатного раствора. Содержимое пробирки N 6 смешивают 5–6-кратным переворачиванием, избегая образования пузырьков воздуха.

Затем в пробирки N 1, 2, 3, 4, 5 добавляют по 0,5 мл смеси из 6 пробирки, в нулевую пробирку 1 мл смеси.

Содержимое каждой пробирки осторожно перемешивают и через 15 минут измеряют оптическую плотность против содержимого нулевой пробирки, начиная с 5 в обратном порядке при длине волны 670 нм, кювета толщиной 10 мм.

Расчет: 1) вычисляют показатель ОП альбуминов. Он равен $E_1 - E_2$;

2) α_1 -глобулины $E_2 - E_3$;

3) α_2 -глобулины $E_3 - E_4$;

4) β -глобулины $E_4 - E_5$;

5) γ -глобулины E_5 .

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

Для выражения величин в абсолютных числах (г/л) определите содержание общего белка в данной сыворотке биуретовым методом, тогда E_1 будет соответствовать содержанию общего белка в г/л, а оптическая плотность каждой фракции X г/л. Найдите абсолютное содержание каждой фракции из пропорции. Целесообразно использование нескольких разных сывороток и распределение их между группами студентов.

Определение содержания фибриногена в плазме крови методом избирательного высаливания

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

Реактивы: 1) сульфат аммония, 21,35%-ый раствор; 2) физиологический раствор (0,9% раствор хлористого натрия).

Ход определения. Разлейте в опытные пробирки по 5 мл раствора сульфата аммония, а в контрольные по 5 мл физиологического раствора. К каждой плазме крови ставится свой контроль. Добавьте по 0,1 мл исследуемой плазмы в опытную и в контрольную пробирку. Через 10 минут определите оптическую плотность опытного раствора против контрольного при длине волны 540 нм в кювете толщиной 10 мм. Для расчета используется коэффициент экстинкции: $X \text{ г/л} = E \cdot 60$.

Фракционирование водорастворимых белков методом гель-фильтрации

(Дресаль В.И., 1978)

Жидкостная хроматография методом гель-фильтрации является эффективным методом разделения и очистки белков. Скорость движения белков в колонке определяется молекулярным весом, формой и химическим строением молекул. Элирование компонентов белковой смеси происходит в порядке уменьшения их молекулярного веса.

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 - 0,02%-ый азид натрия или 0,001%-ый мертиолат.

Марки сефадекса различаются между собой по степени пористости гранул геля, что определяет их свойства (таблица 1).

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

$$V_{\text{общая}} = V_H + V_B + V_C.$$

Общий объем можно рассчитать, зная высоту столбика сефадекса в колонке и внутренний диаметр колонки.

V_H и V_B рассчитываются по формулам:

$$V_H = V_{\text{общая}} - \frac{\alpha (I + M) d}{M d},$$

$$V_B = \alpha M = (V_{\text{об}} - V_H) \frac{I + M}{I + M},$$

где α - сухой вес, M - степень набухания сефадекса, d - плотность набухшего геля.

Свойства гелей сефадекса (Детерман, 1970)

Марка сефадекса	Диапазон фракционирования пептидов и глобулярных белков по молекулярному весу	$V_{0,0.01}$ мл/г	V_B мл/г	$V_{0.1}$ мл/г	Поглощение воды, мл/г	Плотность набухшего геля, г/мл	Время набухания, час.
Г-10	до 700	2	0.8	1.0	1.0+0.1	1.24	3
Г-15	до 1500	3	1.1	1.5	1.5+0.2	1.19	3
Г-25	1000-1500	5	2.0	2.5	2.5+0.2	1.13	3
Г-50	1500-30000	10	4.0	5.0	5.0+0.3	1.07	3
Г-75	3000-70000	13	5.0	7.0	7.5+0.5	1.05	24
Г-100	4000-150000	17	6.0	10.0	10+1.0	1.04	48
Г-150	5000-400000	24	8.0	15.0	15+1.5	1.03	72
Г-200	5000-800000	30	9.0	20.0	20+2.0	1.02	72

Объем элюата, собранного с момента внесения образца на колонку до момента выхода белка с колонки, называют объемом выхода V_6 . Объем выхода не зависит от скорости элюирования, концентрации вещества, температуры и прямо пропорционален логарифму молекулярного веса. Это служит предпосылкой для определения молекулярного веса белков путем измерения объема выхода. Эмпирические формулы, устанавливающие эту зависимость, приведены в таблице 2.

Таблица 2

Зависимость между молекулярным весом
и объемом выхода глобулярных белков (Детерман, 1970)

Марка сефадекса	У р а в н е н и е
Г-75	$\lg MB = 5,624 - 0,752 (V_6/V_B)$
Г-100	$\lg MB = 5,941 - 0,847 \quad - / -$
Г-150	$\lg MB = 6,040 - 0,803 \quad - / -$
Г-200	$\lg MB = 9,698 - 0,987 \quad - / -$

Эффективность разделения белков определяется также размерами колонки и скоростью элюирования. Отношение диаметра колонки к ее длине обычно составляет 1:10, 1:20. Объем наносимого образца не может быть больше 1-2% объема геля, а концентрация белка не более 4%.

Для расчета условий проведения гель-фильтрации в зависимости от параметров колонки и марки сефадекса целесообразно использовать данные таблицы 2.

Внешний вид установки для гель-хроматографии приведен на рис. 1

Реактивы: сефадекс G-150 (зернение 40-120 мк), 0,05M трис-HCl буфер pH 8,0, содержащий 0,5 M NaCl.

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

В работе используют колонку с внутренним диаметром 1,5 см. Перед заполнением колонки на стеклянный фильтр (2) помещают кружок из фильтровальной бумаги и заполняют буфером на 1/3 длины. При этом следует обратить особое внимание на отсутствие пузырей воздуха под стеклянным фильтром. Наличие пузырей воздуха препятствует эффективному разделению белков.

Затем в трубку заливают суспензию геля. Когда сформируется слой сефадекса высотой в 3-4 см, кран 7 открывают и по мере вытекания растворителя в колонку добавляют гель. Заполнение колонки прекращают, когда высота сформировавшегося столбика геля достигает 45 см. На поверхность геля помещают кружок фильтровальной бумаги.

Перед нанесением образца слой буфера из колонки спускают почти полностью. На поверхность геля пипеткой наносят 3 мл экстракта белка. Кран 7 открывают и дают возможность раствору белка полностью впитаться. Затем на поверхность геля настилают буферный раствор толщиной в несколько сантиметров и закрывают пробкой (4).

Эффективное гидростатическое давление (6) составляет 15-20 см. Скорость элюирования 10-15 мл/час. Фракции собирают на автоматическом коллекторе объемом 2,5-3 мл. Белок, содержащийся в вытекающей жидкости, определяют по методу Лоури или микробиуретовым методом.

Для определения объема выхода V_6 строят график зависимости содержания белка в элюатах от объема элюата (рис. 2).

Молекулярный вес элюированных белков можно оценить по формуле:

$$\lg MB = 6,040 - 0,803(V_6/V_n)$$

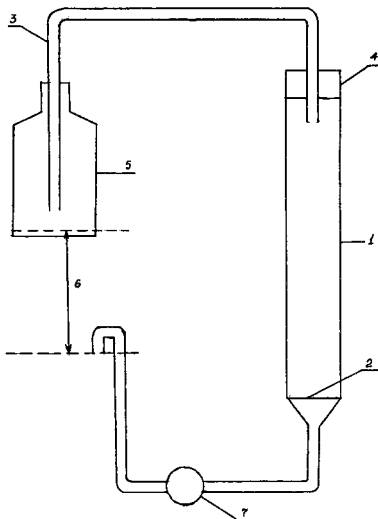


Рис. 1. Схема установки для гельфильтрации:

1 - стеклянная колонка; 2 - стеклянный фильтр; 3 - полиэтиленовые шланги; 4 - резиновая пробка; 5 - склянка с буферным раствором; 6 - эффективное гидростатическое давление; 7 - кран

Количество
белка во
фракции

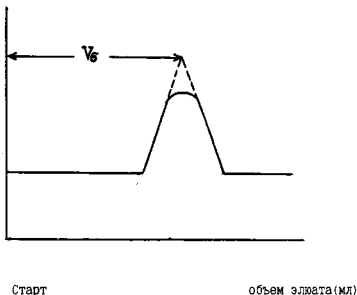


Рис. 2. Схема расчета объема выхода V_6 на основании кривой элюирования

Анализ белков электрофорезом в полиакриламидном геле

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) используется для анализа белков в их смесях. Поддерживающей средой при электрофорезе служит сополимер акриламидных и метилен-бис акриламидных мономеров. Разделение белковых молекул происходит при движении под действием внешнего электрического поля и определяется величиной заряда, молекулярным весом и размерами.

Электрофорез водорастворимых белков в 7,5%-ом ПААГ pH 8,7 применяется для разделения белков с молекулярным весом 10 000 – 1 000 000 Дальтон.

Реактивы: (на 100 мл раствора) А – трис 4,48 г, pH 8,7; Б – акриламид 30 г, метилен-бис-акриламид 0,8 г; В – тетраметил-этилен-диамин 1 мл; Г – аммоний надсерноокислый 0,3 г; Д – трис 0,726 г, pH 6,7;

Е - акриламид 10 г, метилен-бис-акриламид 2,5 г; Ж - сахароза 43 г; З - рибофлавин 4 мг, бромтимоловый синий 0,001 г, амидочерный 10Б в 7%-ой уксусной кислоте 1 г, сахароза 55 г, трихлоруксусная кислота 10 г.

Приготовленные растворы хранить в темных склянках при 4°C. Растворы персульфата аммония и сахарозы хранить не более недели.

Электродный буфер pH 8,3 на 1000 мл 7%-ой уксусной кислоты трис - 6 г, глицин - 28,8 г.

Ход работы. Разделяющий ПААГ готовят смешиванием растворов А-Б-вода-В-Г в объемных отношениях 2:2:2:1:1. Из раствора разделяющего геля удаляют воздух. В стеклянные трубки внутренним диаметром 5мм и длиной 100 мм вносят по 2 мл разделяющего геля. На его поверхность наслаивают 0,2-0,3 мл раствора А, разбавленного в 10 раз. Время полимеризации геля 20-25 минут, о чем можно судить по образованию границы раздела между гелем и наслоенным раствором. С поверхности геля удаляют наслоенный раствор с помощью тонких полосок фильтровальной бумаги.

Концентрирующий гель готовят смешиванием растворов Д-Е-В-Ж-З в отношении 1:4:1:7:2. В каждую трубку вносят по 0,2 мл раствора геля и сверху наслаивают 0,1-0,2 мл раствора Д, разбавленного в 10 раз. Фотополимеризация завершается через 20-30 минут при использовании ультрафиолетовой лампы, о чем можно судить по помутнению геля и появлению границы раздела.

Наслоенный раствор удаляют и в каждую трубку вносят по 0,01-0,03 мл бромтимолового синего.

1 мл исследуемого раствора белка смешивают с 0,1 мл 55%-го раствора сахарозы. В каждую трубку вносят полученную смесь, содержащую не более 150-200 мкг белка.

Трубки устанавливают в верхний буферный резервуар. Нижний буферный резервуар заполняют 1 л разбавленного в 10 раз электродного буфера. Трубки опускают таким образом, чтобы они были погружены не более чем на 5 мм в раствор буфера. Поверх раствора белка в трубках наслаивают раствор разбавленного в 10 раз электродного буфера так, чтобы над краями наблюдался выпуклый мениск. Верхний резервуар заполняют 1 л разбавленного в 10 раз электродного буфера. Электроды подключают к источнику питания: верхний (-), нижний (+).

Первые 30 минут электрофорез проводят при токе 2мА/трубку, затем повышают до 4мА на трубку. Опыт прекращают, когда окрашенная полоса маркера отстоит от конца геля на 5 мм.

После извлечения из трубок гели обрезают по линии маркерной полосы и фиксируют в трихлоруксусной кислоте 2 часа. Белки окрашивают амидочерным 30 минут. Избыток красителя отмывают 7%-ой уксусной кислотой.

Относительную электрофоретическую подвижность (R_m) обнаруженных белковых полос рассчитывают по формуле:

$$R_m = \frac{\text{расстояние, пройденное зоной белка}}{\text{расстояние, пройденное зоной маркерного красителя}}$$

Аминокислотный анализ белков

Для качественного и количественного анализа аминокислотного состава белков можно использовать хроматографию на бумаге или в тонком слое (силиконовые пластинки).

Реактивы: этанол: смесь этанол-эфир-хлороформ (2:1:2); смесь этанол-эфир (1:2); эфир: соляная кислота концентрированная; трихлоруксусная кислота 50%-ая; стандартные растворы аминокислот 2 мг/мл; 0,5%-ый раствор нингидрина в 95%-ом ацетоне, содержащем 1%-ую уксусную кислоту; метанол, содержащий в объеме 500 мл 0,2 мл насыщенного водного раствора азотнокислой меди; смесь бутанол-уксусная кислота-вода: в делительной воронке к 250 мл свежеприготовленной смеси в равных объемах воды и н-бутанола добавляют 30 мл ледяной уксусной кислоты и встряхивают. После разделения используют верхний слой.

Подготовка образца для анализа. Белки осаждают трихлоруксусной кислотой из расчета 4:1 по объему и центрифугируют при 8000 об/мин 10 мин.

Для удаления липидов полученный осадок последовательно экстрагируют 10-кратными объемами (по отношению к весу взятой ткани) этанола, смесями этанол-эфир-хлороформа и этанол-эфира, и дважды эфиром в течение 15 минут. После каждой экстракции белки осаждают центрифугированием при 8000 об/мин 10 минут. Полученный белок при комнатной температуре высушивают и растирают в ступке.

Гидролиз белков. 2 мг белка помещают в ампулу, добавляют к нему 0,5 мл дистил. воды и 0,5 мл концентрированной HCL. Ампулы запаивают и помещают в термостат на 22 часа при 110°C. После гидролиза ампулы охлаждают до комнатной температуры и вскрывают. Гидролизат переносят в тиглики и выпаривают на водяной бане, не допуская обугливания. Су-

хой гидролизат растворяют в 2 мл воды и фильтруют. Полученный фильтрат используют для хроматографии.

Востоящая тромтография. В работе используют листы хроматографической бумаги размером 22х30 см. Микропипеткой наносят пятно в углу листа (объем около 10 мкл), отступив на 2,5 см от того и другого края. Размер пятна не должен превышать 1 см в поперечнике, учитывая нанесенный объем. Остальные пятна размещают на стороне листа размером 22 см на расстоянии 2,5 см друг от друга. Место нанесения пятен предварительно намечают простым карандашом. В процессе нанесения пятен бумага не должна касаться какой-либо поверхности пока не высохнут пятна.

На дно камеры высотой 40-50 см помещают 100 мл смеси бутанол-уксусная кислота-вода. Лист помещают в сосуд так, чтобы край его касался среды разделения, фиксируют в вертикальном положении. Надо следить, чтобы лист не касался стенок хроматографического сосуда, а крышка сосуда была плотно пригнана.

Расстояние, пройденное фронтом растворителя, не должно быть больше 25 см. На этой стадии нужно прекращать разделение. Время разделения зависит от сорта хроматографической бумаги.

Обнаружение аминокислот. После извлечения хроматограммы из камеры, на бумаге отмечают простым карандашом расстояние, пройденное фронтом растворителя, затем хроматограмму высушивают в течение 10 минут при 105°C. Высушенную хроматограмму окрашивают, погружая в раствор нингидрина. После испарения ацетона хроматограмму проявляют путем нагревания при температуре 65°C в течение 30 минут.

Идентификация аминокислот. Одновременно с опытной ставят стандартную хроматограмму с нанесенными пробами стандартных растворов аминокислот (см. реактивы). При идентификации пользуются величиной R_f , которую рассчитывают по уравнению:

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное аминокислотой}}{\text{расстояние, пройденное фронтом растворителя}}.$$

Некоторые значения величины R_f , по данным литературы, приведены в таблице 3. Абсолютные значения хроматографической подвижности аминокислот могут варьировать в зависимости от условий постановки исследования, но относительные (больше-меньше) должны сохраняться.

**Величины R_f для аминокислот, полученные экспериментально
(Бейли, 1965)**

Цистин	0,05
Лизин	0,08
Аргинин	0,10
Гистидин	0,10
Аспарагиновая кислота	0,16
Серин	0,16
Глицин	0,17
Треонин	0,17
Оксипролин	0,17
Глутаминовая кислота	0,17
Тирозин	0,24
Пролин	0,27
Аланин	0,28
Триптофан	0,43
Метионин	0,44
Валин	0,45
Фенилаланин	0,53
Изолейцин	0,59
Лейцин	0,61

**Определение С-концевой аминокислоты в белках и пептидах
карбоксипептидазным методом**

(Филиппович Ю.Б. и соавт. *Практикум по общей биохимии*, 1982)

Карбоксипептидаза представляет собой пептидгидролазу, отщепляющую аминокислоты от карбоксильного конца полипептидной цепи. Различают карбоксипептидазы А, Б и С. Скорость отщепления карбоксипептидазой индивидуальных аминокислот от белковой молекулы различна. Карбоксипептидаза А лучше всего осуществляет отщепление аминокислот с ароматическими радикалами, но способна отщеплять лейцин, изолейцин, метионин, треонин, гистидин, аланин, валин и глутамин. Частично она ускоряет гидролитическое отщепление аспарагиновой кислоты, серина, лизина, метионин-сульфоксида, глицина, аспарагина и глутаминовой

кислоты. Такие аминокислоты, как пролин, оксипролин карбоксипептидазой А не отщепляются. Карбоксипептидаза В отщепляет аргинин, лизин и орнитин. Карбоксипептидаза С – пролин и ароматические аминокислоты. Оптимум pH карбоксипептидаз 7,4–8,0.

В работе можно использовать как фирменные препараты карбоксипептидаз, так и полученные студентами в ходе летней практики кристаллические препараты карбоксипептидазы А из поджелудочной железы коровы или свиньи.

Реактивы: 1) суспензия препарата карбоксипептидазы А; 2) гидрокарбонат натрия, 1%-ый раствор; 3) гидроксид натрия, 0,1 N раствор; 4) соляная кислота, 0,1 N; 4) N-этилморфолинаацетатный буфер с pH 8,3 (0,2 M раствор N-этилморфолина доводят ледяной уксусной кислотой до pH 8,3); 5) уксусная кислота (ледяная).

Оборудование: термостат на 37°C; центрифуга на 6000 об/мин; пробирки стеклянные, пробирки центрифужные.

Ход определения. Суспензию карбоксипептидазы А, содержащую 100 мкг фермента, разбавляют 1 мл воды и центрифугируют 5 мин при 6000 g. Осадок суспендируют в 0,1 мл 1%-го раствора гидрокарбоната натрия, охлаждают до 0°C в ледяной бане и при постоянном помешивании на магнитной мешалке добавляют по каплям 0,1 N раствор NaOH до растворения фермента. С помощью 0,1 N раствора соляной кислоты pH доводят до 8–9 и полученный раствор карбоксипептидазы А приливают к раствору, содержащему 0,1 мкмоль белка (используйте выделенные студентами в предыдущих занятиях белки: миозин; альбумин) в 0,1 мл 0,2 M N-этилморфолинаацетатного буфера, pH 8,3 (допускается использование Трис-HCl буфера). Реакционную смесь выдерживают при 37°C в течение 4 часов (при определении С-концевой последовательности отбирают пробы через 0,5; 1; 2; 4 часа). Пробу подкисляют ледяной уксусной кислотой до pH 3; добавляют 1 мл воды и центрифугируют при 6000 g. Надосадочную жидкость упаривают досуха, а затем подготавливают пробы и проводят хроматографию как описано выше. Аминокислота, выявляющаяся в наибольшем количестве, является С-концевой.

Количественное определение аминокислот. Обнаруженные пятна аминокислот на хроматограмме вырезают, разрезают на мелкие кусочки и помещают в пробирки. Для контроля вырезают кусочки такого же диаметра из участков хроматограммы, свободных от аминокислот. В каждую пробирку наливают по 4 мл метанола. Экстракция продолжается 2 часа в темноте с периодическим встряхиванием для полноты экстракции.

Интенсивность окраски измеряют на ФЭКе при длине волны 500 нм в кюветах с толщиной 5 мм против контрольного экстракта. Результаты количественного определения выражают в относительных процентах против показаний в стандартных пробах аминокислот, исходная концентрация которых известна.

Тема 4. Изучение свойств отдельных белков. Гемоглобина. Свойства. Окисляемость. Сродство к кислороду

Основной процесс диссоциации гемоглобина: $HbO_2 \rightarrow Hb + O_2$.

Образование окисленной формы гемоглобина – метгемоглобина:

$HbO_2 \rightarrow Hb^+ + O_2^-$, где Hb^+ – метгемоглобин.

В крови человека постоянно содержится 1-2% окисленной формы гемоглобина (метгемоглобина). Повышение концентрации метгемоглобина сверх 1-2% приводит к снижению кислород-транспортной функции крови. Причины метгемоглобинемии могут быть разными: наследственные нарушения структуры гемоглобина, нарушение функционирования метгемоглобин-редуктазных систем в эритроцитах.

Пути восстановления метгемоглобина в эритроцитах:

1. NADH-метгемоглобинредуктазой (активность можно оценить по способности эритроцитов восстанавливать феррицианид);
2. Восстановление аскорбиновой кислотой с использованием глутатиона;
3. Прямое восстановление глутатионом;
4. NADPH-дегидрогеназой, восстанавливающей метгемоглобин только в присутствии метиленового синего.

Метод определения метгемоглобина в крови (в эритроцитах)

(Атауллаханов Ф.И. и соавт., 1984)

10 мкл суспензии отмытых эритроцитов гемолизируют в 5,0 мл 5М фосфатного буфера, pH 7,7.

Проводят измерение ОП на двух длинах волн: $\lambda_1 = 524$, 8 нм $\lambda_2 = 566$, 7 нм. Относительную концентрацию метгемоглобина (Met Hb) вычисляют по формуле:

$$\text{Met Hb \%} = \frac{D_2}{K_2^{2+} - K_2^{3+}} \cdot \frac{K_1^{2+}}{D_1} \cdot 100\%, \text{ где}$$

D_1 - оптическая плотность при первой длине волны;

D_2 - оптическая плотность при второй длине волны;

K_2^{2+} - 9,86; K_1^{2+} - 7,80; K_2^{3+} - 5,12.

Задача 1. Определите содержание метгемоглобина в свежезабранной крови из пальца. Для этого 10 мкл крови поместите в 5,0 мл 5мМ фосфатного буфера, pH 7,7. Далее выполните все по выше описанной методике. Из этого же пальца наберите еще 0,1 мл крови и поместите в 5 мл физиологического раствора. Осторожно перемешайте. Отцентрифугируйте (2000 об/мин) 7-10 минут. Тщательно удалите надосадочную жидкость, пользуясь пипеткой Пастера. Затем осторожно взболтайте полученную суспензию эритроцитов (для получения однородной суспензии). Определите содержание метгемоглобина по выше описанной методике. Одновременно определите содержание гемоглобина в цельной свежевзятой крови и в суспензии отмытых эритроцитов циангемоглобиновым методом.

Определение гемоглобина циангемоглобиновым методом

Реактивы: реактив Драбкина: 1г кислого углекислого натрия; 0,2г феррицианида калия (красная кровяная соль) и 50 мг цианистого калия на 1000 мл раствора в дист. воде. Можно воспользоваться реактивом Драбкина из наборов для определения гемоглобина в клинике. Из этого же набора используется стандартный раствор гемоглобина в реактиве Драбкина (150г/л).

Ход определения. 20 мкл свежевзятой крови или 20 мкл суспензии отмытых физ. раствором эритроцитов поместите в 5 мл реактива Драбкина. Через 15 минут промерьте оптическую плотность растворов против реактива Драбкина, длина волны 540 нм, кювета 1 см. Определите также и оптическую плотность стандартного раствора.

Расчет проведите по обычной формуле пересчета содержания веществ по стандарту (см. занятие по составлению формул расчетов).

Рассчитайте содержание метгемоглобина в цельной свежей крови в процентах по отношению к гемоглобину, а также для суспензии отмытых свежих эритроцитов. Объясните полученные данные.

Задача 2. Возьмите кровь, которая хранилась в холодильнике определенное время (зафиксируйте время хранения в своих записях). Разделите кровь на три равные части (можно по 1 мл, можно - меньше). Одну часть оставьте на ярком свете, в другую добавьте аскорбиновую

кислоту. В третью - гидроксиламин в конечной концентрации 0,01 М. Оставьте все пробы на 15 мин. Затем отмойте все пробы физиологическим раствором. Определите содержание метгемоглобина и гемоглобина по выше описанным методикам. Сравните полученные результаты, объясните полученные данные.

Гемоглобин в основном находится в свободном состоянии в цитоплазме эритроцита, доля структурированного, мембраносвязанного гемоглобина в норме составляет 7-10% от общего количества. Предполагается, что более высокой степени связывания Hb с мембраной или элементами цитоскелета способствует процесс его окисления в метгемоглобин. Возможно, окисление гемоглобина инициирует перекисное окисление липидов в мембране эритроцитов и, таким образом создаются условия, способствующие встраиванию белка в мембраны эритроцитов.

Определение мембраносвязанного гемоглобина

(Токтамысова З.С., Биржанова Н.Х., 1990)

Используйте в работе кровь с различным и уже определенным содержанием метгемоглобина (свежую, хранимую, выдержанную на свету, окисленную гидроксиламином, восстановленную аскорбиновой кислотой).

Приготовьте гемолизаты из отмытых эритроцитов с различным содержанием метгемоглобина, используя 5 мМ фосфатный буфер, pH 7,7 (как описано в методике определения метгемоглобина). Затем проведите определение оптической плотности в зоне поглощения гемоглобина на двух длинах волн: 540 нм и 575 нм. Проведите первое центрифугирование для осаждения остатков разрушенных эритроцитов на 1000 об/мин 10 минут, снова определите оптическую плотность растворов на двух длинах волн (в данном случае произойдет осаждение в основном неразрушившихся клеток и крупных остатков). Затем проведите второе центрифугирование на 4000 об/мин 20 минут и снова определите оптическую плотность; проведите третье центрифугирование - 8000 об/мин 20 минут и измерьте оптическую плотность как описано выше (все пробы промеряются относительно буфера или воды в кюветках 10 мм). Найдите количество мембраносвязанного гемоглобина по разнице в оптической плотности по отношению к пробе без центрифугирования в процентах. Сделайте выводы о наличии или отсутствии связи между исходным количеством метгемоглобина и способностью гемоглобина к встраиванию в структуры эритроцитарной клетки.

Для интересующихся студентов или в качестве индивидуального задания можно предложить работу по изучению способности гемоглобина к структурированию в зависимости от состояния его четвертичной структуры (для разрушения сульфгидрильных мостиков используйте п-хлормеркурибензоат натрия). Предложите студентам самим составить схему проведения исследования после предварительного знакомства с литературными источниками (Мышкин А.Е. Окисление гемоглобина).

В качестве индивидуального задания можно предложить также получение кристаллического гемоглобина (после получения его используют для приготовления стандартных растворов, изучения и сравнения окисляемости вне клетки).

Кристаллизация гемоглобина. Эритроциты отмойте физиологическим раствором. Затем гемолизируйте 10-кратным объемом дистил. воды с добавлением 5%-го эфира. Гемолизат центрифугируйте на 3000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость оставьте на ночь при 4 градусах тепла, затем добавьте равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и удалите образовавшийся осадок (глобулины) фильтрованием. Фильтрат снова оставьте на ночь при той же температуре, затем кристаллы соберите фильтрованием на воронке Бюхнера (оксигемоглобин).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Древаль В.И. Исследование белков животных тканей: Спецпрактикум по биохимии. Куйбышев: Куйбышевский Государственный университет, 1978. 43с.
2. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севостьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1982. С.37-80.
3. Строев Е.А., Макарова В.Г. Практикум по общей биохимии. М.: Высшая школа, 1986. С.42.
4. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Минск: Белорусь, 1976. С.21.
5. Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Жаботинский А.М., Кияткин А.Б., Пичугин А.В. Стационарная зависимость скорости восстановления метгемоглобина от его концентрации в интактных эритроцитах // Биохимия. 1984. Т.49. Вып.2. С.193-197.
6. Мышкин А.Е. Окисление гемоглобина // Успехи химии. 1984. Вып.6. С.1045-1071.
7. Токтамысова З.С., Биржанова Н.Х. О мембраносвязанном гемоглобине // Биофизика. 1990. Т.35. Вып.6. С.1019-1020.

РАЗДЕЛ 4. ФЕРМЕНТЫ

Тема 1. Приготовление ферментных препаратов. Определение удельной активности ферментов

Работа 1. Получение ферментного препарата пероксидазы из растительных объектов (Савич И.М., Тажибаева Т.Л., 1988)

Используйте для выделения фермента различные растительные объекты: листья взрослых растений различных видов; листья проростков; плоды растений (хрен, редьку, томаты, яблоки); сухие семена растений. Разделите студентов на небольшие группы (два-три человека) и предложите каждой группе свой объект исследования. Для получения препаратов пероксидазы (КФ 1.11.1.7. H_2O_2 -оксидоредуктаза) растительную ткань гомогенизируют (растирают) в отношении 1:1 в холодном 5М Трис-буфере, содержащем 3,8М глицина и 30% сахарозы, pH 8,3. Гомогенат профильтруйте через 2 слоя марли, а затем отцентрифугируйте (3000 об/мин, 10 мин). Полученные центрифугаты диализируйте в течение 17-20 часов против дист. воды. Белки из диализата осадите 4-мя объемами холодного ацетона и отцентрифугируйте (4000 об/мин, 10 минут). Полученный осадок растворите в небольшом объеме 30%-ой сахарозы.

Полученный ферментный препарат пероксидазы используйте для дальнейших исследований.

1. Определите качество полученного препарата (Лебедева О.В. и соавт., 1977).

Для этого приготовьте произвольное разведение препарата (например, 0,5 мл препарата разведите в 50 мл 0,01 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 0,1 М нитрата калия pH 7,0 и измерьте оптическую плотность на двух длинах волн: 280 нм (область поглощения белков) и 403 нм (область поглощения пероксидазы), рассчитайте отношение поглощения собственно пероксидазы к общему поглощению белками препарата. Препарат можно считать хорошим, если это отношение больше 0,5. Оптическая плотность на длине волны 403 нм определяет концентрацию пероксидазы в приготовленном вами растворе, рассчитайте ее, используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon = 9,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2. Определите идеальную активность полученного препарата пероксидазы, используя метод А. Н. Бояркина.

Реактивы: 1) ацетатный буфер 0,1 М, pH 5,4; 2) раствор перекиси водорода 0,01%; 3) раствор бензидина в ацетатном буфере 0,92 г/л (навеску бензидина разотрите в фарфоровой ступке и разведите в небольшом количестве буфера). Затем перенесите смесь в мерную посуду и доведите до необходимого объема ацетатным буфером, дайте постоять минут 20, профильтруйте; 4) полученный ферментный препарат (разведенный).

Ход определения: 1. Определите истинную концентрацию перекиси водорода, измерив оптическую плотность на длине волны 230 нм. Молярный коэффициент экстинкции равен $72,7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2. Приготовьте ряд пробирок, в которые разлейте по 2 мл ацетатного буфера, 2 мл раствора ферментного препарата и 2 мл раствора бензидина.

3. Определение проведите в кюветах толщиной 2 см. Перелейте содержимое одной из пробирок в кювету и стартуйте реакцию раствором перекиси водорода. Измерьте промежуток времени, за который ОП достигает 0,2, длина волны 590 нм.

Рассчитайте активность фермента по формуле:

$$E \times (0,2) \times 1000$$

$$X \text{ ед/г л сек} = \frac{\text{-----}}{t \times 2 \times \text{конц. фермента (в г на литр)}}$$

Работа 2. Получение ферментного препарата фосфолипазы эритроцитов и определение активности (Безрукова Г.А., Рубин В.И., 1989)

Активация внутриклеточных фосфолипаз приводит к деструкции цитомембран за счет расщепления мембранных фосфолипидов. В норме эти процессы связаны с обновлением фосфолипидного слоя мембран. При патологии чрезмерная активация приводит к разрушению клеток. В настоящее время известно 4 вида фосфолипаз, различающихся по положению расщепляемых связей. Наибольшее значение для развития клеточной мембранодеструкции имеет фосфолипаза А, гидролизующая эфирную связь фосфолипидов в положении 2 с образованием чрезвычайно токсичных для мембран лизопроизводных фосфолипидов.

Реактивы: 1) субстратная смесь – 10%-ый раствор лецитина в растворителе, состоящем из 95% эфира и 5% метанола; 2) Трис-HCl буфер 0,05 М, содержащий 0,02 М хлористого кальция, pH 7,5; 3) 2 М раствор хлористого натрия; 4) абсолютный этиловый спирт.

Приготовление лецитина. К одному желтку куриного яйца добавьте 30 мл горячего этилового спирта 96%-го. Отцентрифугируйте, подобрав оптимальный режим. Осадок суспендируют в 20 мл горячего этилового спирта и снова центрифугируют. Повторяют процедуру еще раз, все три надосадочные жидкости собирают вместе и оставляют на холоде на ночь. Затем фильтруют, фильтрат осаждают водным раствором 50%-го хлористого кадмия, который добавляют малыми порциями, всего 1,2 мл. Центрифугируют.

Осадок промывают 4 мл спирта. К осадку добавляют 4 мл эфира и 0,4 мл воды до растворения осадка. Раствор обрабатывают 4 мл спирта. Центрифугируют. Снова прибавляют 4 мл эфира и 0,4 мл воды к осадку для растворения. К этому раствору добавляют 4 мл этилового спирта, содержащего 10% концентрированной соляной кислоты и затем 8 мл 2%-го хлористого натрия, охлажденного до 0°C. Центрифугируют. Нижнюю водно-спиртовую фазу удаляют путем отсасывания. Эфирную фазу обрабатывают метанольно-соляно-кислой смесью и 2%-ым хлористым натрием как описано выше. Затем снова центрифугируют и обрабатывают только 2 мл метанола и 4 мл хлористого натрия. Эфирную фазу обрабатывают 6 мл ацетона для осаждения лецитина и промывают ацетоном полученный осадок.

Приготовление ферментного препарата. Используют венозную кровь, взятую с цитратом натрия (3,8%) в отношении 1:9. Эритроциты получают, отмывая дважды холодным физиологическим раствором. Гемолизат готовят добавлением равного объема охлажденной дистиллированной воды.

К 0,4 мл гемолизата прибавляют 0,2 мл 2 М раствора хлористого натрия и перемешивают в течение 10 минут при 37°C для полной экстракции фосфолипазы. Ферментный раствор готовят смешиванием равных объемов полученного экстракта и трис-HCl буфера (реактив 2).

Ход определения. В контрольную пробу последовательно вносят 25 мкл препарата фермента, 3 мл этанола и 2 мл субстратной смеси. В опытную пробу этанол не вносят. Пробу помещают в термостат при 37 градусах на 10 мин., затем в опытные пробы также добавляют этанол 3 мл.

Активность фосфолипазы оценивают по степени просветления лецитиновой эмульсии, для чего пробы центрифугируют в течение 5 минут на

1000 об/мин и измеряют оптическую плотность контроля против опытной пробы, длина волны 500 нм в 1 см кюветах. За единицу активности ферментного препарата принимают вызываемое при стандартных условиях уменьшение ОП на 0,01 за 1 мин. Удельную активность рассчитывают на мг гемоглобина в ферментном препарате.

1. Составьте формулу расчета активности.
2. Определите количество гемоглобина в исходном гемолизате и пересчитайте его содержание на ферментный препарат.
3. Определите удельную активность фосфолипаз в различной крови (свежей, хранимой).
4. Отмойте эритроциты и оставьте их на ночь в холодильнике в физиологическом растворе. На следующий день приготовьте из них ферментный препарат фосфолипазы А и определите удельную активность. Сделайте выводы.

Работа 3. Получение препарата карбоксипептидазы А

Замороженную поджелудочную железу коровы или свиньи измельчают и размешивают с трехкратным по весу количеством 2%-го раствора хлористого натрия и добавляют толуол в количестве 20% от веса взятой железы. Оставляют на ночь при комнатной температуре. Затем снимают пену, толуол фильтруют через 2 слоя марли, прибавляют 5 Н раствор уксусной кислоты до получения pH 4,0, затем фильтруют при отсасывании, прибавляют сульфат аммония в расчете 39,0 г на каждые 100 мл, осаждающийся фермент отфильтровывают и диализируют против холодной воды в течение ночи, центрифугируют и высушивают осадок при комнатной температуре. Затем осторожно растирают в порошок. Препарат карбоксипептидазы помещают в сухой и чистый пузырек и подписывают дату выделения. Препарат с хорошей удельной активностью может быть использован следующим курсом для определения концевых аминокислот в белках.

Получение субстрата для карбоксипептидазы А (гидролизат эдестина)

Эдестин может быть получен из конопляного семени. Для этого 50 г конопляного семени тщательно растирают в ступке и вносят в стакан объемом 1000 мл, прибавляют туда 500 мл 5%-го раствора хлористого натрия и помещают на 1 час в термостат при 50 градусах, смесь периодически помешивают. После этого смесь при той же температуре филь-

труют через складчатый фильтр. Фильтрат помещают на ночь для осаждения эдестина.

На следующий день раствор декантируют (сливают после отстаивания) и снова переосаждают 500 мл 5%-го раствора хлористого натрия. Полученный осадок промывают дважды водой при охлаждении для удаления хлористого натрия. Осадок переносят в чашки Петри и высушивают при комнатной температуре. Размельчают в порошок и хранят в банке.

2,5 г эдестина вносят в стакан и настаивают в течение ночи при температуре 37 градусов с 20 мл 1N раствора соляной кислоты, 12,5 мл воды и 100 мг пепсина, фильтруют. К каждому 10 мл фильтрата прибавляют 1 мл формальдегида и нейтрализуют по фенолфталеину 1N раствором едкого натра, доводят объем до 20 мл. Раствор оставляют на ночь, затем он готов для определения активности карбоксипептидазы А.

Определение активности карбоксипептидазы А

10 мг порошка карбоксипептидазы А растворите в 10 мл фосфатного буфера 0,1 М, pH 8,0. В пробирки разлейте по 1 мл препарата и 1,5 мл раствора субстрата и поместите в термостат (37 градусов) на 2-3 часа. Затем реакцию остановите добавлением 1,5 мл 15%-ой трихлоруксусной кислоты. Отцентрифугируйте пробы, выбрав оптимальный режим по консистенции осадка. К 3,5 мл центрифугата добавьте 0,5 мл 0,5%-го раствора нингидрина в воде, поместите в кипящую водяную баню на 10 минут. Пробы охладите и измерьте ОП при длине волны 570 нм против контроля на реактивы.

Составьте формулу расчета в ед ОП на мг белка в мл препарата в минуту.

Работа 4. (для сильных и интересующихся энзимологией студентов)

Выделение липоксигеназы из плодов помидора (Рездел Д. и соавт., 1994)

Реактивы: 1) буфер А: 50 мМ фосфатный буфер, pH 6,8, содержащий 1 мМ аскорбиновой кислоты и 1 мМ ЭДТА; 2) буфер Б: Трис-буфер 10 мМ, pH 6,8; 3) порошок сульфата аммония.

Плоды (можно взять зеленые, красные, желтые) измельчали ножницами и растирали в ступке, затем растворимую часть экстрагировали в течение 30 минут при постоянном перемешивании. Нерастворимую часть удаляли центрифугированием 10000 g 15 минут. Экстракт насыщали порошком сульфата аммония до 0,25 и осадок удаляли центрифугированием

15000g 15 минут. Надосадочную жидкость насыщали до 0,75 сульфатом аммония и снова центрифугировали в том же режиме. Осадок суспендировали в минимальном объеме буфера А и диализировали против буфера Б в течение 20 часов с заменой буфера. Диализат должен содержать от 5 до 40 мг белка.

Получение субстрата для липоксигеназы

1. Выделение субмитохондриальных частиц

Реактивы: 0,25 М раствор сахарозы.

Материал: печень крысы или другого животного.

Ход работы. Печень промывают холодным раствором сахарозы (2-4 град. тепла), подсушивают фильтровальной бумагой и взвешивают.

Ткань гомогенизируют с 0,25 М сахарозой из расчета 1:9 (вес/объем) в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в течение 3 минут. Гомогенат фильтруют через слой марли для удаления неразрушенных клеток и соединительной ткани. 10 мл гомогената центрифугируют 10 минут при 800 g. Осадок дважды промывают, суспендируя каждый раз в 2,5 мл сахарозы и центрифугируя в том же режиме. Смывы и первый супернатант объединяют. Осадок (ядерная фракция) отбрасывают. Объединенные супернатант и смывы центрифугируют 10 минут при 8500g. Осадок дважды промывают 2,5 мл сахарозы и центрифугируют в том же режиме. Промытый осадок ресуспенсируют в 2 мл сахарозы (митохондриальная фракция).

2. Выделение суммарного липида из митохондриальных частиц

0,5 мл суспензии митохондрий разбавляют до 2 мл фосфатным буфером 0,1 М, pH 7,4; добавляют 2,5 мл хлороформа и 0,5 мл метанола (нельзя применять пластиковые пробирки). Смесь встряхивают в течение 1 минуты и оставляют в ледяной бане на 5 минут. Затем добавляют еще 2,5 мл хлороформа и 2,5 мл 0,1 М KCL, интенсивно перемешивают в течение 1 минуты и оставляют в ледяной бане на 5 минут. Для четкого разделения фаз смесь центрифугируют при 4000 об/мин в течение 5 минут. Нижнюю фазу отбирают, а водно-метанольную фазу обрабатывают еще раз хлороформом. Хлороформные фазы объединяют и растворитель выпаривают в водяной бане при 70°C досуха (конденсат можно подсушить в сушильном шкафу при той же температуре). Суммарные липиды растворяют в 0,5 мл метанола.

Определение активности липоксигеназы из плодов помидора

Инкубационная среда на объем 3 мл содержит 2,5 мл фосфатного буфера 50 мМ; pH 6,8; 30 мкл суммарных липидов; 0,1 мл детергента (Твин-20); 100 мкл препарата фермента. Реакцию запускают добавлением фермента, измеряют увеличение ОП на длине волны 234 нм. Молярный коэффициент экстинкции $25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Тема 2. Составление формул расчета активностей ферментов.

Определение ферментативных активностей различных ферментов

Работа 1. Определение активности аминотрансфераз

Реактивы: 1) подготовка субстратных смесей

а) для аланинаминотрансферазы:

29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 1,78 г DL-аланина (или 0,89 г L-аланина) растворяют в 0,1N растворе NaOH (осторожно по каплям, проверяя pH) до получения pH 7,4 (индикаторная бумага). Раствор переливают в мерную колбу емкостью 100 мл. Доводят до 100 мл 0,1 M фосфатным буфером pH 7,4 (можно приготовить на 50 мл);

б) для аспаратаминотрансферазы:

29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 2,66 г LD-аспарагиновой кислоты (или 1,33 г L-аспарагиновой кислоты) растворяют осторожно в 0,1N растворе едкого натра до получения pH 7,4 (индикаторная бумага). Довести до 100 мл фосфатным буфером (можно приготовить 50 мл);

2. Стандартный раствор пировинограднокислого натрия:

11 мг точно взвешенного кристаллического пирувата натрия растворяют в небольшом количестве дист. воды, переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят водой до метки;

3. Раствор 2,4 динитрофенилгидразина:

19,8 мг отвешивают на торсионных весах. Растворяют в небольшом количестве 1 N раствора соляной кислоты при нагревании на водяной бане. После того, как раствор остынет, доводят объем 1 N соляной кислотой до 100 мл. На следующий день раствор фильтруют, хранят в темной посуде. Раствор годен в течение года.

4. 0,4 N раствор NaOH, свободный от карбонатов:

Дист. воду кипятят в течение 10 минут для удаления карбонатов. После этого закрывают и дают остыть. Используют для приготовления раствора едкого натра.

Принцип метода. В результате переаминирования, происходящего под действием аминотрансфераз, образуются щавелево-уксусная и пировиноградная кислоты. Щавелево-уксусная кислота в процессе ферментативной реакции способна превращаться в пировиноградную кислоту. При добавлении кислого раствора 2,4 динитрофенилгидразина энзиматический процесс останавливается и образуется гидразон пировиноградной кислоты. Последний в щелочной среде дает окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Построение калибровочного графика для определения молярного коэффициента экстинкции

Для построения калибровочного графика приготовьте серию стандартных разведений раствора пировинограднокислого натрия как указано в таблице.

N	Стандартный раствор ПВК-го натрия		Дист. вода, мл
	мл	мкМ	
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

Приготовьте 2-3 повтора для каждой концентрации.

Ход определения. В каждую пробирку, содержащую 0,6 мл раствора ПВК натрия, а также одну пробирку, содержащую 0,6 мл воды (контроль реактивов), добавить по 0,25 мл раствора 2,4 ДНФГ. Оставить пробы на 20 минут для прохождения реакции, затем добавить 2,5 мл 0,4 Н раствора едкого натрия, оставить на 10 минут при комнатной температуре для развития окраски. Измерить оптическую плотность, длина волны 540 нм, толщина кюветы 0,5 см.

Постройте калибровочный график: по оси абсцисс - содержание ПВК натрия; по оси ординат - оптическая плотность.

Ход определения активности аминотрансфераз. В 2 пробирки снесите по 0,5 мл субстратной смеси (либо для аланинаминотрансферазы, либо

для аспартатаминотрансферазы) и прогрейте пробирки 5 минут при 37°C. Затем добавьте в опытную пробирку 0,1 мл свежей сыворотки крови или 10 мкл гомогената ткани печени, а в контрольную соответственно 0,1 мл или 10 мкл дист. воды. Поместите пробы в термостат при той же температуре и инкубируйте для определения активности АЛАТ в течение 30 минут, для определения активности АСАТ в течение 1 часа. Затем в пробирки добавьте по 0,5 мл 2,4ДНФГ и оставьте на 20 минут. Затем прилейте по 5 мл раствора едкого натра 0,4 N, перемешайте и оставьте еще на 10 минут при комнатной температуре. Измерьте ОП на длине волны 540 нм, кювета 1 см.

Составьте формулу расчета активностей аланин и аспартатаминотрансфераз в мкМ ПВК натрия в мин на г белка в л исследуемой жидкости.

Работа 2. Определение активности каталазы (Королюк М.А., Иванова Л.И., 1988)

Принцип метода. Основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

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

Ход определения. Реакция запускается добавлением 0,1 исследуемой жидкости к 2 мл 0,03%-го раствора перекиси водорода. В холостую пробу – дист. вода вместо исследуемой жидкости. Реакцию останавливают через 10 минут добавлением 1 мл 4%-го молибдата аммония. Интенсивность окраски измеряют на длине волны 410 нм, против контроля на реактивы (2 мл воды, 0,1 мл исследуемой жидкости, 1 мл молибдата аммония).

Активность каталазы рассчитывают по формуле:

$E = (A_{хол. пр.} - A_{оп. пр.}) \times V \times t \times K$, где

$K = 22,2 \times 10^3 \text{ мм}^{-1} \text{ см}^{-1}$;

t – время (600 сек);

V – объем исследуемой жидкости (0,1 мл).

Задание 1. Примените метод определения каталазы для сыворотки крови, эритроцитов, гомогенатов печени, митохондрий, растительных гомогенатов, сделав необходимые модификации метода.

Задание 2. Определите локализацию фермента и его взаимодействие с другими белками (схему исследования студенты предлагают сами).

Тема 3. Кинетика ферментативных реакций. Определение константы Михаэлиса-Ментен

Константа Михаэлиса-Ментен - концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна 1/2 от максимальной. Определить K_m экспериментально можно, построив графики зависимости (V) от (S). Удобнее пользоваться системой двух обратных величин 1/V и 1/S (график Лайнуивера-Берка).

Работа 1. Определение K_m для пероксидазной реакции с бензидином

Реактивы: 1) ацетатный буфер 0,1 М с pH 5,4; 2) серия растворов перекиси водорода 0,002%, 0,004%, 0,008%, 0,01%, 0,015%; 3) раствор бензидина 0,92 г/л на ацетатном буфере (см.приготовление выше); 4) раствор фермента: взвесьте 2мг пероксидазы из хрена и разведите в 50 мл фосфатного буфера 0,01 М, pH 7,0. Затем 1 мл исходного раствора фермента разведите в 100 раз буфером. Определите истинную концентрацию фермента, измерив ОП на 403 нм, молярный коэффициент $9,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Определите истинную концентрацию перекиси водорода,измерив ОП растворов на длине волны 230 нм, молярный коэффициент $72,7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ход определения. Приготовьте ряд чистых сухих пробирок, в которые разлейте по 2 мл ацетатного буфера, 2 мл раствора фермента, 2 мл раствора бензидина. Переливайте поочередно содержимое пробирок в кюветы с толщиной поглощающего слоя 2 см. Стартуйте реакцию добавлением 2 мл перекиси водорода различной концентрации (по возрастающей). Измерьте промежуток времени, за который ОП достигает определенной величины, например 0,2, длина волны 590 нм.

Рассчитайте активность фермента по формуле:

$$E(0,2) \times 1000 \text{ (пересчет в л)}$$

$$X = \frac{\text{-----}}{t \times 2 \times \text{концент. фермента}} \quad (\text{ед/г л сек}).$$

1. Постройте график Лайнуивера-Берка и определите K_m .

2. Определив концентрацию фермента в растворе, рассчитайте константу каталитическую (k).

В условиях насыщения субстратом (определите по графику концентрацию насыщения, она равна $2K_m$) справедливо выражение:

$$V_{max} = k(E_t), \text{ где}$$

E_t - суммарная концентрация фермента.

Максимальную скорость определите по графику.

3. Рассчитайте начальную скорость ОП реакции окисления бензидина по формуле:

$$V_0 = \frac{k(E) \times (S_1)}{K_m \times (S)}, \text{ где}$$

E – концентрация фермента;

S – концентрация субстрата в условиях насыщения.

S₁ – конкретная концентрация субстрата.

Работа 2. Определение K_m пероксидазной реакции окисления ферроцианида калия (Угарова Н.Н. и соавт., 1977)

Реактивы: 1) ацетатный буфер, 0.1М; pH 5.4; 2) ферроцианид калия (перекристаллизованный из спирта), 0.3 мМ раствор; 3) раствор фермента (см. приготовление выше); 4) перекись водорода различных концентраций (приготовление и измерение истинных концентраций см. выше).

Ход определения. В ряд пробирок внесите по 2,5 мл буфера; 2 мл раствора фермента и 0.2 мл раствора ферроцианида калия. Поочередно вносите в пробирки по 1 мл перекиси водорода, начиная с меньшей концентрации, и сразу же измеряйте начальную ОП (длина волны 420 нм, кювета 1 см). Через 10 минут замерьте конечную ОП.

Контроль. Бесферментативное окисление ферроцианида калия за этот же промежуток времени.

Молярный коэффициент экстинкции 1045 М⁻¹см⁻¹

1. Составьте формулу расчета активности.
2. Постройте график Лайнуивера-Берка и определите K_m. V_{max}; рассчитайте константу каталитическую и начальную скорость реакции.
3. Сделайте выводы о сродстве к субстратам (бензидину, ферроцианиду) препаратов пероксидазы из хрена.

Работа 3. Определение K_m, константы каталитической и других кинетических констант, используя полученные препараты пероксидазы из различных растительных объектов по отношению к бензидину и ферроцианиду калия (проведите исследования по вышеописанным методикам).

Работа 4. Определение зависимости K_m от pH среды

1. Определение зависимости K_m окисления бензида пероксидазой хрена от pH среды.

Для выполнения работы используйте буферы: ацетатный pH 4,0; 5,0; фосфатный pH 7,0; 8,0; 9,0 (0,1 М).

Используйте методику, которая описана выше.

2. Определение зависимости K_m окисления ферроцианида калия пероксидазой хрена от pH среды. Используйте те же буферные растворы.

Работа 5. Определение зависимости K_m от pH среды приготовленных ферментных препаратов пероксидазы

Работа 6. Кинетика ферментативных реакций. Лактатдегидрогеназная реакция. Специфичность, условия протекания, обратимость, изоферменты

1. Общая характеристика

Лактатдегидрогеназа (К.Ф.1.1.27) цитозольный фермент, М.м. 135 тыс.Д. Обратимо катализирует реакцию превращения молочной кислоты в пировиноградную. Кофермент – никотинамидадениндинуклеотид, выступает в качестве второго субстрата.

Экстракты большинства тканей человека содержат 5 изоферментных форм, обусловленных различным содержанием субъединиц М (мышечная форма) и Н (сердечная форма). Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) представлена четырьмя М субъединицами (M_4), обозначается как ЛДГ-5. ЛДГ сердца представлена 4-мя Н-субъединицами (H_4), обозначается как ЛДГ-1. Остальные промежуточные формы содержатся в малых количествах.

Задание 1. Изучение условий обратимости лактатдегидрогеназной реакции.

Для окисления лактата необходимо поддержание высокого значения pH, так как функционально важный аминокислотный остаток His-195 должен быть депротонирован. Установите сдвиг pH цитозоля, при котором реакция окисления лактата в пируват становится возможной.

Реактивы: приготовьте серию буферных растворов: 1) фосфатный буфер 0,1М; pH 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8; 2) раствор пирувата натрия 1 мМ; 3) раствор лактата натрия 1 мМ; 4) раствор НАДН, 6 мМ; 5) раствор НАД, 6мМ; 6) раствор фермента 0,05 мл суспензии фирменного препарата развести в 100 раз фосфатным буфером 0,01 М, pH 7,2 (0,1 мл со-

держит 0,2 мкг белка). Реактивы 2-6 готовятся перед употреблением.

Ход определения.

1. Окисление лактата в пируват.

Разлейте в пробирки фосфатный буфер по 3 мл в двух-трех повторях на каждую реакцию среды, добавьте по 0,1 мл раствора НАД и 0,1 мл раствора фермента. Перемешайте. Измерьте начальную ОП, длина волны 340 нм, кювета 1 см. Поочередно вносите в каждую пробу по 0,1 мл лактата натрия, тщательно перемешайте и через 3 минуты измерьте конечную оптическую плотность. В процессе окисления лактата натрия в пируват происходит восстановление НАД в НАДН, и ОП увеличивается (оптический тест Варбурга).

1). Составьте формулу расчета активности фермента, если молярный коэффициент экстинкции НАДН на 340 нм $6,22 \text{ мм}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

2). Рассчитайте скорость образования лактата при каждом значении pH.

2. Восстановление пирувата в лактат.

Разлейте в пробирки фосфатный буфер по 3 мл в двух-трех повторях на каждое значение pH, добавьте по 0,1 мл раствора НАДН и 0,1 мл раствора фермента. Далее проведите операции, описанные выше, добавив вместо лактата натрия пируват натрия по 0,1 мл.

1). Рассчитайте скорость восстановления пирувата при каждом значении pH.

2). Определите, что способствует сдвигу равновесия реакции в сторону образования лактата: снижение или увеличение pH?

Задание 2. Изучение изоферментов ЛДГ методом дифференциального ингибирования

Определите относительную концентрацию ЛДГ-1 и ЛДГ-5 в сыворотке крови, эритроцитах или суспензии фермента, если известно, что мочеви́на инактивирует ЛДГ-5 в присутствии лактата в качестве субстрата, а оксалат в тех же условиях в основном ингибирует ЛДГ-1.

Проведите определение активности ЛДГ, используя концентрации ингибиторов, соответствующие концентрациям субстратов.

Реактивы: 1) фосфатный буфер pH 8,0; 2) НАД, 6 mM раствор; 3) лактат натрия, 1 mM раствор; 4) мочеви́на, 1 mM раствор; 5) оксалат натрия, 1 mM раствор.

Ход определения. В пробирки разлейте по 3 мл фосфатного буфера, добавьте во все пробирки раствор НАД по 0,1 мл. В часть пробирок добавьте мочевины в качестве ингибитора по 0,1 мл. в другую часть оксалат натрия по 0,1 мл, часть оставьте без ингибитора, добавив еще по 0,1 мл буфера. Во все пробирки разлейте суспензию фермента или исследуемую жидкость (сыворотка крови, гемолизат эритроцитов (0,1 мл отмытых эритроцитов + 0,2 мл 0,2% тритона X100 + 0,7 мл дист. воды)). Суспензия фермента предварительно разведется в 100 раз буфером (см. выше) и добавляется по 0,1 мл. Сыворотка добавляется по 0,1 мл, а гемолизат по 10 мкл. Измерьте начальную ОП на 340 нм, стартуйте реакцию добавлением 0,1 мл лактата натрия. Перемешайте и через 3 минуты снова измерьте ОП. Оптическую плотность можно измерять как против воздуха, так и против дист. воды. Долей незначиматического восстановления НАД можно пренебречь.

1. Выведите формулу расчета активности ЛДГ.
2. Определите в % долю активности ЛДГ-1, ЛДГ-5 и остальных фракций. Результаты занесите в таблицу:

Общая активность ЛДГ	Активность ЛДГ-1	Активность ЛДГ-5	Ост. фрак.
----------------------	------------------	------------------	------------

1. мкм НАД/мин на
мг белка в мл
 2. 100%
-

Задание 3. Изучение специфичности лактатдегидрогеназной реакции.

Проведите ЛДГ-реакцию, используя в качестве субстрата оксибутират натрия. Сравните скорости ЛДГ-реакции в случае применения лактата или оксибутирата в качестве субстрата при всех других аналогичных условиях (конц. субстрата, pH среды, количество кофермента, температура) для различных изоферментов ЛДГ. Результаты занесите в таблицу. Используйте тот же метод определения активности, который описан выше.

Общая ЛДГ-активность	Активность ЛДГ-1	Активность ЛДГ-5
----------------------	------------------	------------------

лактат /оксибутират	лактат /оксибутират	лактат /оксибутират
---------------------	---------------------	---------------------

Ответьте на вопросы:

1. Какова специфичность ЛДГ (абсолютная, относительная)?
2. Какой из изоферментов ЛДГ обладает наибольшим сродством к оксидутирату натрия?

Работа 7. Химическая модификация ферментативных реакций. Механизм действия ферментов

Химическая модификация функциональных групп позволяет установить структуру активных центров, роль отдельных функциональных групп в нем, роль третичной и четвертичной структуры в каталитической функции ферментов.

Применяемые исследователями модификаторы: гидроксилламин – модификатор OH-групп; п-хлормеркурибензоат натрия – модификатор SH-групп; карбамид (мочевина) – модификатор карбоксильных групп; имидазолы – нуклеофильные модификаторы; цианиды – модификаторы металлов с переменной валентностью в активном центре ферментов.

Задание 1. Проведите химическую модификацию SH-групп п-хлормеркурибензоатом натрия. Установите наличие и роль SH-групп в каталитической активности различных ферментов ЛДГ, амилазы, пероксидазы.

1. Приготовить 0,1 М раствор п-хлормеркурибензоата натрия (5–10 мл). Навеску растворите в нескольких каплях 0,1 Н NaOH, затем доведите до нужного объема 0,1 М фосфатным буфером pH 7,4.

2. Приготовьте растворы ферментов:

а) для ЛДГ 0,1 мл суспензии разведите в 9,9 мл 0,1 М фосфатным буфером pH 7,4 или разведите буфером 0,1 мл суспензии эритроцитов;

б) для амилазы 2 мл сыворотки крови разведите 8 мл фосфатного буфера pH 7,4 или 1 мл слюны разведите 9 мл фосфатного буфера;

в) для пероксидазы: 2 мг пероксидазы из хрена растворите в 100 мл дист. воды. 1 мл из раствора фермента соедините с 9 мл фосфатного буфера 0,01 М с 0,1 М KNO_3 .

3. Проведите химическую модификацию путем 30-минутной преинкубации растворов ферментов с п-ХМБ в одинаковых объемах при комнатной температуре (например, 1,5 мл+1,5 мл).

4. Проведите определение скорости ферментативной реакции в присутствии модификатора и без него (не забудьте о разведении исходных растворов ферментов при модификации в 2 раза).

Определение скоростей ЛДФ-ой и пероксидазной реакции выполните по выше описанным методикам, подобрав оптимальные соотношения реагентов (количество фермента может варьировать от 0,1 мл в пробу до 0,5 мл). Составьте формулы расчета.

Определение активности α -амилазы

(Лаб. дело. 1986. N 8. С. 40)

Реактивы: 1) 0,24%-ый раствор крахмала на 0,9% NaCl; 2) 0,15 М фосфатный буфер, pH 7,15; 3) раствор I_2 в KI (0,3 г йода + 3 г йодистого калия в 100 мл дист. воды); 4) 0,5 Н соляная кислота.

Ход определения. 0,5 мл раствора крахмала и 0,1 мл раствора фермента инкубируйте при 37°C 30 минут. Добавьте 0,2 мл соляной кислоты и 9,1 мл воды. добавьте 0,025 мл реактива 3. Перемешайте, измерьте оптическую плотность при длине волны 590 нм. кювета 0,5 см против воды. Одновременно поставьте контрольную пробу: 0,5 мл крахмала + 0,1 мл дист. воды – далее по методике.

Расчет: $E_x - E_0$

 E_0

Далее формула составляется в зависимости от разведения и способа стандартизации.

Задание 2. Проведите модификацию гидроксильных групп гидроксиламином и карбоксильных мочевиной.

1. Приготовьте 0,1М раствор гидроксилamina и 0,1 М раствор мочевины и проведите модификацию так же, как описано выше.

2. Проведите определение скорости ферментативных реакций с модифицированным ферментом и без него.

3. Сделайте выводы о роли различных функциональных групп в этих ферментах.

Примечание. Для изучения активного центра пероксидазы можно провести модификацию железа цианидами, производными имидазола.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Древаль В.И., Тумаков С.А. Методические разработки к большому практикуму и спецпрактикуму по биохимии. Куйбышев: Куйбышевский Государственный университет, 1981.

2. Строев Е. А., Макарова В. Г. Практикум по биологической химии. М.: Высшая школа, 1986.
3. Савич И. М., Тажибаева Т. Л. Влияние холодового стресса на изо-пероксидазы проростков кукурузы и пшеницы, различающиеся по изоэ-лектрическим точкам // Физиол. растений. 1988. Т. 35. Вып. 5. С. 841-847.
4. Сабурова Е. А., Ягодина Л. О. Кинетические исследования меха-низма снятия субстратного ингибирования лактатдегидрогеназы анионами и рН // Биохимия. 1990. Т. 55. Вып. 10. С. 1819-1825.
5. Мецлер Д. Биохимия. М.: Мир, 1980. Т. 1; 2.
6. Безруков Г. А., Рубин В. И. Метод определения фосфолипазной ак-тивности эритроцитов // Лаб. дело. 1989. N 8. С. 18-20.
7. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. N 1. С. 16-19.
8. Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. Минск: Бела-русь, 1976. С. 78-84.

РАЗДЕЛ 5. УГЛЕВОДЫ

Тема 1. Моносахариды

Моносахариды поступают в клетки в фосфорилированном виде. Про-цесс фосфорилирования осуществляется в мембране с помощью специфи-ческих киназ. В свободном состоянии находятся в межклеточном прост-ранстве или во внутренней среде организма. В наибольшем количестве представлена глюкоза.

Методы определения глюкозы в плазме крови

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

Недостаток. Невысокая специфичность, так как присутствующие в крови редуцирующие вещества, не являющиеся углеводами, также вступа-ют в реакцию. Количество получается выше истинного, но разница обыч-но величина постоянная.

2. Колориметрические. Основаны на определении степени интенсивности окраски глюкозы с определенным веществом. Наиболее распространен ортотолуидиновый метод. Метод специфичен и точен. Недостатком можно считать наличие едких и вредных веществ среди используемых реактивов.

3. Энзиматические. Используется действие глюкозооксидазы, окисляющей глюкозу до глюконовой кислоты кислородом воздуха (глюкозооксидантный метод). Метод специфичен и точен, не связан с применением вредных веществ и широко используется для определения глюкозы. Также может использоваться и метод, основанный на сопряжении двух реакций: гексокиназной и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной (Бергмейер, 1975), но он не получил широкого распространения из-за дефицитности части применяемых реактивов.

Работа 1. Ортотолуидиновый метод определения глюкозы в крови

Принцип метода. Глюкоза при нагревании с ортотолуидином в растворе уксусной кислоты дает сине-зеленое окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации глюкозы и определяется фотометрически.

С ортотолуидином реагируют все альдогексозы, но их содержание в крови и тканях невелико, поэтому метод позволяет определить практически одну глюкозу.

Реактивы: 1) трихлоруксусная кислота, 3%-ый раствор; 2) ортотолуидиновый реактив (0,15 г тиомочевины растворяют в 94 мл ледяной уксусной кислоты и смешивают с 6 мл бесцветного или слегка желтоватого ортотолуидина. Реактив стоек, хранят в холодильнике. Удобно пользоваться готовым реактивом из наборов для определения глюкозы ортотолуидиновым методом; 3) стандартный раствор глюкозы, 10 мМ. Водный раствор глюкозы готовится прямо перед употреблением. Если предполагается хранение стандартного раствора, то он готовится на 0,2%-ом растворе бензойной кислоты. Раствор бензойной кислоты готовится при нагревании на водяной бане.

Оборудование: центрифужные пробирки; пипетки на 0,1, 1 и 5 мл, центрифуга и ФЭК.

Исследуемый материал: кровь, плазма крови.

Ход определения. Кровь разделите на две части. Одну отцентрифугируйте и отберите плазму в чистую пробирку.

Разлейте в центрифужные пробирки по 0,9 мл раствора трихлоруксусной кислоты и добавьте в одну 0,1 мл цельной крови, в другую 0,1 мл плазмы крови, в третью стандартный раствор глюкозы. Перемешайте. Пробы с кровью и плазмой отцентрифугируйте на 2000 об/мин 15 минут.

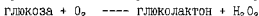
Для определения глюкозы отберите из каждой пробирки по 0,25 мл центрифугата (он должен быть прозрачным и бесцветным) и добавьте по 2,5 мл ортотолуидинового реактива. Пробирки закройте пробками и поставьте в хорошо кипящую водяную баню на 8 минут. Затем пробирки необходимо вынуть и охладить в проточной воде.

Измерьте ОП в кюветах 0,5 см, длина волны 590 нм против ортотолуидинового реактива или дист. воды.

1. Проведите расчет концентрации глюкозы по стандарту.
2. Сравните полученные данные между собой и сделайте выводы.

Работа 2. Определение глюкозы глюкозоксидазным методом. Сравнение чувствительности двух методов определения глюкозы: ортотолуидинового и глюкозоксидазного

Принцип основан на реакции, катализируемой глюкозоксидазой:



Образовавшаяся перекись водорода в присутствии пероксидазы окисляет ряд субстратов с образованием окрашенных продуктов. Интенсивность окраски измеряется фотометрически.

Реактивы: 1) ферментативная смесь: смесь кристаллической глюкозоксидазы (3 тыс.един.) и пероксидазы из хрена (4 тыс.един.). При использовании наборов для определения глюкозы глюкозоксидазным методом таблетизированная ферментная смесь растворяется в 5 мл воды; 2) антикоагуляционный раствор (применяется при определении глюкозы в цельной крови): 0,9%-ый хлористый натрий, содержащий 0,038% цитрата натрия; 3) буферно-субстратная смесь: фосфатный буфер 0,05 М, содержащий субстраты пероксидазы, pH 7,0. Две таблетки буферно-субстратной смеси растворяют в 200 мл дист. воды при непрерывном перемешивании; 4) рабочий реактив: 0,5 мл ферментного раствора и 20 мл буферно-субстратной смеси (1:40). Готовится перед употреблением; 5) стандартный раствор глюкозы, 10 мМ. Водный раствор готовится перед употреблением.

Ход работы. Разлейте в центрифужные пробирки по 0,9 мл трихлоруксусной кислоты (3 пробирки) и по 0,9 мл антикоагуляционного раст-

вора (3 пробирки); добавьте в одну пробирку с трихлоруксусной кислотой 0,1 мл свежезятой крови, в другую 0,1 мл свежей плазмы крови, в третью 0,1 мл стандартного раствора глюкозы. Проведите определение глюкозы ортотолуидиновым методом, как описано выше. В пробирки с антикоагуляционной жидкостью добавьте соответственно: 0,1 мл свежезятой крови, 0,1 мл плазмы крови, 0,1 мл стандартного раствора глюкозы. Отцентрифугируйте пробу с цельной кровью на 2000 об/мин. 10 минут.

По 0,25 мл из каждой пробирки поместите в 2,5 мл рабочего раствора для определения глюкозы глюкозоксидастным методом. Оставьте на 25 минут, избегая попадания прямого света. Измерьте ОП растворов при длине волны 500 нм. кювета толщиной 0,5 см против рабочего раствора или дист. воды. Рассчитайте содержание глюкозы по стандарту.

Задание 2. Выполнив определение глюкозы крови двумя методами, проведите сравнительное исследование чувствительности методов.

Для этого готовятся из стандартного раствора глюкозы растворы различной концентрации и предлагаются для определения содержания в них глюкозы двумя методами. Студенты могут приготовить растворы друг для друга. Пробы с другой концентрацией глюкозы ставятся одновременно с пробой с концентрацией 10 мМ (для расчета).

1. Сравните опытно найденную концентрацию глюкозы с расчетной.
2. Сравните два метода по чувствительности.

Тема 2. Обмен углеводов

Работа 1. Гликолиз. Определение скорости гликолитического процесса

1). Приготовление инкубационной смеси.

Мышцы только что забитого животного промойте физиологическим раствором и быстро измельчите ножницами на холоду до состояния мышечной кашицы. 1,0 г полученной кашицы поместите в колбочку и добавьте 12 мл 0,5%-го раствора глюкозы на 0,15 М NaHCO_3 . Перемешайте. Содержимое колбочки сразу же разделите на 2 равные части. Другую часть поместите в такую же колбочку и сразу же добавьте туда 2 мл 10%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Обе колбочки покройте ров-

ным слоем растительного масла для создания анаэробных условий при 37°C на 2 часа.

2). Определение скорости гликолиза по скорости потребления глюкозы и скорости образования молочной кислоты.

После окончания инкубации в опытную колбочку прилейте 2 мл 10%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Перемешайте и профильтруйте содержимое обеих колбочек или отцентрифугируйте, поместите в чистые стаканчики или пробирки.

Используйте по 0,5 мл из опытного и контрольного экстракта для определения глюкозы любым методом (см. описание методов выше). Рассчитайте скорость гликолитического процесса по формуле:

$$V \text{ мм глюкозы/мин} = \frac{C_x - C_0}{120}, \text{ где}$$

C_x – концентрация глюкозы в контроле;

C_0 – концентрация глюкозы в опыте.

По 1,5 мл полученного экстракта используйте для определения молочной кислоты. Для этого проведите осаждение углеводов добавлением по 0,5 мл 2%-го раствора CuSO_4 по 1 г гидроксида кальция (или оксида кальция). Пробу тщательно перемешайте, оставьте на 30 минут, время от времени помешивая.

Определите в пробах содержание молочной кислоты по Баркеру и Саммерсону. Пробу перед исследованием должны иметь голубоватое окрашивание. Отцентрифугируйте пробы 5 минут при 1000 об/мин.

Принцип. Метод основан на способности молочной кислоты при нагревании с концентрированной серной кислотой переходить в ацетальдегид, дающий с п-гидрооксифенилом характерную фиолетовую окраску, интенсивность которой пропорциональна концентрации молочной кислоты.

Реактивы: 1) концентрированная серная кислота; 2) п-гидрооксифенил, свежеприготовленный раствор (50 мг п-гидрооксифенила растворяют в 3 мл 3%-го едкого натра); 3) стандартный раствор молочной кислоты в 5%-ой ТХУ-кислоте.

Ход определения. 1,5 мл надосадочной жидкости сливают в чистую пробирку, приливают 0,1 мл 4%-го раствора CuSO_4 и осторожно наклоняют 3 мл конц. серной кислоты, погрузив пробирку в лед и непрерывно помешивая стеклянной палочкой. После этого пробирку помещают в кипящую водяную баню на 5 минут, а затем охлаждают в водяной бане до 20

градусов. Одновременно обрабатывают стандартную пробу: 1Мм раствор молочной кислоты в 5%-ой ТХУ.

К охлажденной смеси приливают 0,05 мл щелочного раствора п-гидрооксифенила и ставят пробирку в водяную баню при 30 градусах на 30 минут, время от времени взбалтывая содержимое. Развивается голубое окрашивание. Пробирку помещают на 90 сек (ровно!) в бурно кипящую водяную баню. Голубая окраска переходит в фиолетовую. Смесь охлаждают, фотометрируют, длина волны 540 нм, кювета 0,5 см. Расчет проводят по стандарту.

Скорость гликолитического процесса оценивают по скорости образования молочной кислоты в мм/мин.

Тема 3. Полисахариды

Работа 1. Выделение гликогена из дрожжей и животных тканей

В организме животных и многих других организмов гликоген служит резервным углеводом для поддержания концентрации глюкозы на относительно постоянном уровне. Гликоген в организме находится в двух формах: прочно связанной с белками и трудно извлекаемой из тканей и менее прочно связанной и легко экстрагируемой горячей водой и разбавленными растворами трихлоруксусной кислоты.

Существуют 2 метода выделения гликогена. Один из них предполагает извлечение его из тканей 30%-ым раствором КОН на кипящей водяной бане. При этом ткани распадаются, но гликоген не распадается и при добавлении спирта выпадает в осадок. В ходе извлечения происходит частичный гидролиз гликогена, и его молекулярная масса значительно уменьшается.

Второй метод заключается в извлечении гликогена 5%-ым раствором ТХУ-кислоты. Гликоген здесь сохраняет свою массу, но его труднее извлечь полностью.

Выделение гликогена из дрожжей

Оборудование: термостат, центрифуга, шкаф сушильный, холодильник, колбы конические на 250 и 300 мл, ступка фарфоровая, цилиндр на 50 мл, бюксы, воронка стеклянная, палочки стеклянные.

Реактивы: 1) дрожжи; 2) сахароза, 20%-ый раствор; 3) ТХУ-кислота, 5%-ый и 10%-ый растворы; 4) песок кварцевый; 5) этиловый спирт; 6) диэтиловый эфир.

Ход работы. 10 г дрожжей размешивают в 200 мл 20%-го раствора сахарозы и оставляют при комнатной температуре на 3 часа. Начинается интенсивное брожение, в процессе которого в дрожжевых клетках накапливается гликоген.

Затем дрожжи отделяют центрифугированием и растирают в предварительно охлажденной ступке в течение 10 минут с 15 мл охлажденной до 0°C 10%-ой ТХУ-кислотой. Для лучшего растирания добавьте 5 г кварцевого песка.

Смесь центрифугируют 5 минут при 3000 g. Кислый экстракт сливают в коническую колбочку на 200 мл и хранят при температуре 0-4 градуса, а осадок переносят в ступку и снова экстрагируют 10 мл охлажденной 5%-ой ТХУ-кислоты. Эту операцию повторяют дважды. Вместо центрифугирования можно использовать фильтрование. Все экстракты собирают в коническую колбочку и, если раствор содержит твердые частицы, еще раз фильтруют, а фильтр промывают двумя порциями по 3 мл 5%-ой ТХУ-кислоты. При высоком содержании гликогена экстракт опалесцирует.

Обнаружение гликогена. Несколько капель экстракта поместите в пробирку и добавьте несколько капель реактива Люголя (растворяют 1 г йода и 2,5 г KI в 20 мл воды; после растворения объем доводят до 100 мл). Появляется красное окрашивание, исчезающее при нагревании и вновь появляющееся при охлаждении.

К экстракту прибавляют двойной объем этанола, перемешивают и оставляют при 0°C на 30 минут, после чего осадок (гликогена) отделяют центрифугированием при 3000 g в течение 5-10 минут. Надосадочную жидкость сливают, а осадок гликогена для его очистки растворяют в 3-х объемах подогретой дист. воды, размешивая его стеклянной палочкой. Затем приливают двойной объем (по отношению к воде) спирта, оставляют на 30 минут в холодильнике, после чего центрифугируют.

Осадок гликогена дважды промывают 5 мл 65%-го раствора спирта, хорошо размешивая и каждый раз центрифугируя. После этого гликоген промывают 5 мл 96%-го спирта и, наконец, 10 мл эфира. Гликоген количественно переносят во взвешенный бюкс, просушивают в сушильном шкафу при 80°C и взвешивают.

Работа 2. Выделение гликогена из животной ткани

Больше всего гликогена в ткани печени, богата им и мышечная ткань.

Оборудование: центрифуга, холодильник, баня водяная, пробирки, трубка стеклянная.

Реактивы: 1) КОН, 30%-ый раствор; 2) сернокислый натрий, 10%-ый раствор; 3) этанол.

Ход работы. 300 мг ткани печени или мышц помещают в пробирку с 2 мл нагретого 30%-го раствора КОН. Пробирку нагревают в течение 40 минут на кипящей водяной бане при частом перемешивании содержимого. По окончании гидролиза пробирку охлаждают и к ее содержимому прибавляют 0,2 мл 10%-го раствора сернокислого натрия и 5 мл этанола. Смесь хорошо перемешивают и оставляют на ночь в холодильнике (можно оставить и на более длительный срок). Осадок отделяют центрифугированием (40 минут, 7000 g). Надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок растворяют в 1-2 мл дист. воды. К полученному раствору прибавляют 2 объема этанола, перемешивают и оставляют на 30 минут в холодильнике. Образующийся осадок отделяют центрифугированием, растворяют в воде и переосаждают спиртом. После третьего переосаждения надосадочную жидкость удаляют, осадок гликогена высушивают, растворяют в воде и используют для определения его концентрации.

Работа 3. Количественное определение гликогена с помощью антронового реактива

Принцип. Гексозы, дегидратируясь в присутствии концентрированной серной кислоты, конденсируются с антроном, давая соединение, окрашивающее раствор в синий цвет.

Оборудование: ФЭК, баня водяная, пробирки стеклянные химические; пипетки на 0,5 и 5 мл;

Реактивы: 1) антрон перекристаллизованный (1 г антрона растворяют в 9 мл горячего бензола и к полученному раствору прибавляют 3 мл холодного петroleйного эфира; выпавшие светло-желтые кристаллы отсасывают на воронке Бюхнера и высушивают в эксикаторе над хлоридом кальция; серная кислота (66%-ая: к 34 мл воды осторожно приливают 66мл концентрированной серной кислоты и охлаждают); тиомочевина; антроновый реактив (к 100 мл 66%-ой серной кислоты добавляют 1 г тиомочевины и 50 мг антрона; смесь помещают на водяную баню и нагревают

при помешивании до 80–90°C, полученный прозрачный раствор охлаждают и хранят в холодильнике в темной склянке с притертой пробкой не более 2–3 недель); стандартные растворы глюкозы (50, 100, 200 мг чистой глюкозы в воде (готовятся перед употреблением)).

Ход определения. В пробирки наливают по 0,5 мл раствора, содержащего 20–200 мг гликогена (испытуемая проба) и 50, 100 и 200 мг глюкозы (для построения стандартной кривой). Для контроля на реактивы в две пробирки наливают по 0,5 мл воды. Во все пробирки приливают по 5 мл антронового реактива. Добавление реактива следует проводить быстро, так, чтобы струя реактива попадала в центр проб. Для этого используют пипетку с широким носиком. Смесь немедленно перемешивают и помещают на 10–15 минут в кипящую водяную баню. При нагревании следят, чтобы в пробирки не попала вода, которая мешает колориметрированию. По окончании нагревания пробирки быстро охлаждают в проточной воде и оставляют в темном месте на 30 минут. Окрашенные растворы колориметрируют на ФЭКе, длина 620 нм, кювета толщиной 0,5 см. Количество глюкозы в испытуемых пробах с гликогеном рассчитывают по кривой и умножают на 0,9 (относительная масса молекулярная масса остатка глюкозы в гликогене равна 162,1; глюкозы 180,1: 162,1:180,1=0,8999 или 0,9).

Работа 4. Различие в действии α - и β -амилаз на крахмал

При участии амилаз осуществляется гидролиз различных соединений: крахмала, гликогена, олигосахаридов и родственных им веществ, построенных из остатков α -D-глюкопиранозы и содержащих в молекулах 1,4 и 1,6-связи.

Выделение амилаз

Оборудование: центрифуга, термостат, баня водяная, ступка фарфоровая, воронка Бюхнера, колба коническая на 100–150 мл, пробирки стеклянные конические, стаканы стеклянные, пипетки.

Реактивы: 1) хлористый натрий, 1%-ый раствор; 2) сульфат аммония (порошок); 3) этанол; 4) цитратный буфер, pH 5,6 (84 мл лимонной кислоты (0,1M) смешивают с 116 мл $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2M)); 5) соляная кислота (0,1N, 2%); Na_2HPO_4 (0,15M); 6) крахмал растворимый, 2%-ый раствор; 7) раствор Люголя (1 г йода и 2,5 г KI в 20 мл дист. воды, после растворения объем доводят водой до 100 мл); 8) 20%-ый раствор соляной кислоты; 9) Фелингова жидкость; готовятся 2 раствора: А -

6,92г медного купороса в 100 мл дист. воды; В -34,6 г сегнетовой соли и 14 г едкого натра в 100 мл дист. воды; перед употреблением смешивают равные части растворов; 10) реактив Барфедда: 13,3 г ацетата меди растворяют в 200 мл горячей воды, фильтруют и к фильтрату добавляют 1,9 мл ледяной уксусной кислоты.

Ход выделения. Для выделения α - и β -амилаз используют муку, зерновки злаков. Проросшее зерно содержит значительно больше амилаз, в связи с чем для получения этих ферментов лучше использовать солод. При приготовлении солода зерновки злаков (пшеницы, ржи, ячменя) проращивают до проростков размером с зерновку, высушивают в термостате при температуре не выше 35°C и измельчают в тонкую муку. 100 г молодого солода тщательно экстрагируют 400 мл 1%-го раствора хлорида натрия в течение 1-1,5 часов при температуре $30-35^{\circ}\text{C}$ с периодическим встряхиванием. Экстракт отфильтровывают на воронке Бюхнера и на каждые 100 мл его прибавляют по 35 г тонкоизмельченного сульфата аммония. При таком насыщении раствора сульфатом аммония α -и β -амилазы выпадают в осадок. Осадку дают хорошо отстояться на холоду и затем отделяют его от раствора центрифугированием при 3000 g в течение 10-15 минут. Осадок, содержащий ферменты, растворяют в 20 мл воды.

α -амилазу выделяют из этого раствора, прогревая 10 мл его в конической колбе при 70°C в течение 15 минут (необходимо следить за температурой), после чего раствор охлаждают и используют для исследования активности α -амилазы. β -амилаза при указанной температуре инактивируется. Так как оптимум pH альфа-амилазы равен 5,5-5,8, то после охлаждения к раствору фермента добавляют 10 мл цитратной буферной смеси, pH 5,6.

β -амилазу выделяют из солодовой вытяжки путем инактивирования альфа-амилазы в кислой среде. Ко второй половине (10 мл) водного раствора амилаз прибавляют 2 мл 0,1 N раствора соляной кислоты и 8 мл воды (общий объем равен 20 мл, pH 3,3) и оставляют в ледяной бане на 15 минут. Затем к раствору бета-амилазы приливают 4 мл 0,15 M раствора гидрофосфата натрия для того, чтобы довести pH до 6,0.

Выявление и сравнение декстринирующей способности альфа- и бета-амилаз

Приготовьте 2 ряда разведений ферментов (один для альфа-амилазы, другой для бета-амилазы:

Название веществ Номер пробирки	Количество веществ в пробирках, мл					
	1	2	3	4	5	6
1. Ферментный раствор	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	0
2. Вода дист.	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0	4,0

Разлейте во все пробирки по 5 мл 2%-го раствора крахмала. Растворы тщательно перемешивают и ставят в водяную баню при 40°C на 10-15 минут. Затем их охлаждают и в каждую пробирку добавляют по 0,1 мл 20%-ой соляной кислоты для остановки реакции. В каждую пробирку добавьтe по 0,25 мл раствора Люголя и доведите объем проб до 10 мл дист. водой (если окраска растворов очень интенсивная, можно развести до 15-20 мл). Запишите окраску в каждой пробирке, а затем измерьте ОП при длине волны 590 нм против воды дист. Найдите разницу в ОП каждой пробирки по отношению к контролю (6-я пробирка).

$$E_x - E_0$$

$$E = \frac{E_x - E_0}{E_0}$$

$$E_0$$

Кювета толщиной 0,3-0,5 см в зависимости от интенсивности окраски.

Осахаривающая способность амилаз

В две пробирки вносят по 5 мл 2%-го раствора крахмала, прогревают в водяной бане при 40°C в течение 15 минут. Затем в первую пробирку приливают 1 мл раствора альфа-амилазы, во вторую 1 мл раствора бета-амилазы, содержимое пробирок хорошо перемешивают и снова ставят в водяную баню (40°C; 30 минут). После инкубации обе пробирки помещают в кипящую водяную баню на 5 минут. Растворы охлаждают до комнатной температуры и делят на две части. С одной проводят реакцию с фелинговой жидкостью, а с другой - реакцию Барфедда.

1. К 1-2 мл исследуемых растворов приливают равный объем фелинговой жидкости и нагревают до начинающегося кипения. В случае нали-

чия редуцирующих моносахаридов и дисахаридов выпадает красный осадок закиси меди.

2. К 5 мл реактива Барфедда прибавляют 1 мл исследуемого раствора. Смесь нагревают в кипящей водяной бане 10 минут. Моносахариды восстанавливают реактив до закиси меди, а дисахариды реакции не дают. Необходимо четко придерживаться указанного времени помещения в водяную баню, чтобы избежать гидролиза дисахаридов до моносахаридов.

На основании полученных данных сделайте выводы о различии в действии альфа и бета-амилаз на крахмал.

Тема 4. Углеводсодержащие белки (гликопротеиды) и их роль в организме

Гликопротеиды – обширная группа белков. Единой классификации еще до сих пор нет. Выделяют две группы: мукопротеиды и гликопротеиды.

1. Мукопротеиды. Протетические группы – аминополисахариды (гликозаминогликаны). Они состоят из аминсахаров, гексуроновых и серных кислот. Имеют сильно выраженные кислотные свойства благодаря наличию большого числа карбоксильных групп и остатков серной кислоты. Типичные представители: гиалуриновые кислоты, хондроитинсульфаты, кератосульфат, гепарин, гепариносульфат и сульфогиауриновая кислота. Связь с белками не прочна. В основном входят в состав мембран, служат регуляторами мембранной проницаемости. Например, гликофорины, образующие гликокаликс мембраны эритроцитов.

2. Гликопротеиды. Характеризуются прочной связью с аминсахарами, не содержащими уроновых кислот и сульфатов. В состав аминсахаридов входят гексозы, гексозамины, фукозы и сиаловые кислоты. Обладают слабо выраженными кислотными свойствами. К гликопротеидам относятся: холинэстераза; церулоплазмин, гормоны (гонадотропин, эритропоэтин); группоспецифические субстанции крови; протромбин; фибриноген; гамма-глобулины; гаптоглобин; трансферрин. Отдельно выделяют группу серомукоидов; гликопротеидов, растворимых в хлорной кислоте.

Работа 1. 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 синий цвет соединения. Реакция проводится при участии борной кислоты, необходимой для увеличения интенсивности фиолетовой окраски и подавления побочного окрашивания, которое может развиваться в ходе реакции.

Реактивы: 1) абсолютный этиловый спирт; 2) борно-серный раствор, состоящий из 77 мл серной кислоты конц., 23 мл дист. воды и 5 г борной кислоты; 3) раствор триптофана: 1 г триптофана растворяют в 100 мл дист. воды (предпочтительно использовать L-триптофан, так как эта форма лучше растворима в воде); 4) эталонный раствор 0,1%-ой маннозы. Готовится перед употреблением.

Ход определения. Всю реакцию проводят в одной пробирке. Она складывается из нескольких этапов:

а) осаждение гликопротеидов и других белков. На дно пробирки помещают 0,05 мл сыворотки, прибавляют 10 мл абсолютного спирта и содержимое пробирки взбалтывают, после чего пробу оставляют при комнатной температуре на 15 минут. Затем центрифугируют при 2500 об/мин в течение 10 минут, спирт удаляют осторожным сливанием, стараясь не потерять при этом ни частицы осадка;

б) гидролиз и цветная реакция. Осадок растворяют в 1 мл дист. воды и быстро приливают в пробирку 7 мл борно-серного реактива, после этого пробирку сразу же погружают в ледяную воду (или охлаждают холодной проточной водой). Через 5 минут прибавляют 1 мл раствора триптофана. Чтобы избежать появления побочного желтого цвета, важно сразу же перемешать жидкости (пипеткой). Пробирки еще раз охлаждают, а затем переносят в кипящую водяную баню на 20 минут, причем через 10 минут необходимо еще раз перемешать реактивы (пипеткой). После извлечения пробирки из бани ее снова охлаждают в течение 5 минут, а затем 30 минут оставляют при комнатной температуре.

Параллельно опытной ставят контрольную пробу путем прибавления к 1 мл дист. воды 7 мл борно-серного раствора и обрабатывают ее так же, как опытную;

в) фотометрирование. Оптическую плотность измеряют на ФЭКе, длина волны 520 нм, кювета шириной 0,5 см.

Расчет проводят по маннозе.

Построение калибровочной кривой: 2 мл 0,1%-го раствора маннозы доводят водой до объема 20 мл. 10 мл полученного рабочего раствора маннозы содержат 1000 мкг маннозы. Приготовьте серию разведений рабочего раствора, содержащих 10, 20, 40, 60, 100, 120, 140 мкг маннозы в 1 мл раствора.

К 1 мл каждого разведения добавляют 7 мл борно-серного раствора, после чего пробы колориметрируют. Постройте калибровочный график и определите коэффициент экстинкции. Поскольку для определения берут 0,05 мл сыворотки, а концентрацию выражают в мг%, рассчитывают на 100 мл (умножают на 2000 и делят на 1000 - перевод мкг в мг). Таким образом, формула выглядит следующим образом:

$$X \text{ мг\%} = \frac{E_0 - E_K}{K} \times 2, \text{ где}$$

K - коэффициент экстинкции, найденный по калибровочному графику. Нормальное содержание гликопротеидов в сыворотке крови людей 140 мг% (в среднем). Увеличение наблюдали при многих воспалительных заболеваниях, инфаркте миокарда, диабете и других тяжелых заболеваниях.

Работа 2. Турбидиметрический метод определения серомукоидов в сыворотке крови

Принцип. При добавлении к сыворотке крови раствора хлорной кислоты белки выпадают в осадок, а серомукоиды остаются в растворе, из которого они могут быть определены путем их осаждения фосфорновольфрамовой кислотой. По степени помутнения раствора и судят о содержании серомукоидов в исследуемом материале.

Реактивы: 1) 0,85%-ый раствор хлористого натрия; 2) 1,8 М раствор (18%-ый) хлорной кислоты; 3) 5%-ый раствор фосфорновольфрамовой кислоты, приготовленный на 2 Н соляной кислоте.

Ход определения. 0,5 мл сыворотки смешивают с 4,5 физиологического раствора и добавляют по каплям 2,5 мл 1,8 М раствора хлорной кислоты, хорошо перемешивают стеклянной палочкой, оставляют на 10 минут при комнатной температуре, фильтруют через мелкопористый фильтр (синяя полоса) или центрифугируют 15 минут при 2000 об/мин.

Отмеривают 5 мл фильтрата (центрифугата), перемешивают с 1 мл фосфорновольфрамовой кислоты и через 15 минут измеряют мутность на

ФЗКе. 620 нм, кювета 1 см против контроля (смешать 3,3 мл физ.раствора, 1,7 мл раствора хлорной кислоты, 1 мл фосфорновольфрамовой кислоты). Результат выражают в ед. оптической плотности.

Норма содержания серомукоидов в сыворотке крови – 0,130–0,200.

Работа 2. Гликопротеиды и регуляция клеточной проницаемости

Ферменты-гидролазы, расщепляющие связи сахаров с белками: гиалуронидаза, лизоцим.

Гиалуронидаза – мукополисахаридаза, обладающая специфическим действием на гиалуронат.

Лизоцим (N-ацилмурамид-гликогидролаза 3.2.1.17). М.М. 14700. Изoeлектрическая точка между pH 10,5 и 11,0. SH-группы отсутствуют, отличаются высоким содержанием аргинина. Оптимум pH – нейтральный. Активатор: NaCl (не выше 2%).

Лизоцим вырабатывается организмом не с бактерицидной целью, а для регулирования проницаемости мембран и тканевых барьеров путем воздействия на полисахаридные компоненты за счет расщепления гликозидных связей.

Кристаллизация лизоцима. Яичный белок гомогенизируют и доводят до pH 9,5. Затем добавляют NaCl до конечной концентрации, 5%. Препарат сохраняют при 4°C в течение 2-х недель, причем за весь промежуток времени 2-3 раза в день внутренние стенки сосуда натирают стеклянной палочкой. По истечении времени часть смеси центрифугируют и делают мазок. Несколько кристаллов на стекле свидетельствуют о его образовании.

Образовавшиеся кристаллы собирают центрифугированием и растворяют в небольшом объеме разбавленной уксусной кислоты, pH около 5. Нерастворимый материал удаляют. Затем, доведя pH до 9,5–10 и добавляя NaCl до 5%, вызывают перекристаллизацию лизоцима.

Действие гиалуронидазы и лизоцима на гликокаликс мембраны эритроцита

Реактивы: 1) ферментный раствор гиалуронидазы: 2 мг препарата фермента растворите в 10 мл 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,0; 2) ферментный раствор лизоцима: 2 мг лизоцима растворите в 100 мл фос-

фатного буфера 0,01 М, рН 7,0; 3) физиологический раствор (0,9%-ый хлористый натрий); 4) реактивы для определения активности лактатдегидрогеназы (см. раздел "Ферменты"); 5) 0,154 М раствор мочевины.

Ход исследования. Отмойте эритроциты физиологическим раствором, рН 7,2, каждый раз центрифугируя 10 минут при 2000 об/мин. Удалите надосадочную жидкость после третьего центрифугирования.

Проведите инкубацию эритроцитов в среде, содержащей лизоцим и гиалуронидазу. Например:

1) 1,0 мл суспензии эритроцитов + 2,2 мл физиологического раствора, рН 7,2;

2) 1,0 мл суспензии эритроцитов + 2,0 мл физиологического раствора, рН 7,2 + 0,2 мл раствора гиалуронидазы;

3) 1,0 мл суспензии эритроцитов + 2,0 мл физиологического раствора + 0,2 мл раствора лизоцима.

Поместите пробы в термостат при 37°C на 15-20 минут. Затем, закончив инкубацию, отцентрифугируйте пробы 10 минут, 2000 об/мин.

Осторожно отберите надосадочную жидкость. Измерьте ОП при длине волны 540 нм - область поглощения гемоглобина. Сравните показания ОП в трех пробах и сделайте выводы об изменении проницаемости мембраны для гемоглобина и роли гликопротеидов. Надосадочную жидкость перелейте снова в пробирки и проведите определение в ней активности лактатдегидрогеназы. Для этого можно использовать всю надосадочную жидкость, добавив в нее равный объем фосфатного буфера 0,1 м, рН 7,4. Рассчитайте в зависимости от объема количество добавляемого кофермента (НАДН) и субстрата (пируват натрия). Выявив наличие лактатдегидрогеназной активности, сделайте выводы об изменении мембранной проницаемости при нарушении гликокаликса эритроцита под действием гиалуронидазы и лизоцима.

Определение степени гликолизированнойности белков эритроцитарных мембран

Принцип основан на способности гликолизированных остатков белков восстанавливать нитросиний тетразолий в щелочной среде.

Реактивы: 1) нитросиний тетразолий 0,75 мм/л в 0,1 М карбонатном буфере рН 10,35; 2) 0,09%-ый раствор хлористого натрия; 3) 0,9%-ый раствор хлористого натрия.

Ход определения. 100 мкл суспензии эритроцитов из каждой пробы после инкубации гемолизируют в 20 мл холодной дист. воды. Отцентри-

футируйте при 6000 об/мин. Надосадочную жидкость отбросьте и осадок мембран эритроцитов промойте 20 мл 0,09%-го раствора NaCl. Снова отцентрифугируйте 10 минут при 6000 об/мин. Осадок ресуспендируйте в 0,2 мл раствора 0,9%-го хлористого натрия.

В 0,1 мл суспензии мембран добавьте 2 мл раствора нитросинего тетразолия (НТС) - реактив N 1. Инкубируйте при 37°C. Измерьте ОП через 10 минут (длина волны 530 нм, кювета 0,5 см) и через 25 минут инкубации. Контроль - 0,1 мл дист. воды и 2 мл НТС.

Выразите степень гликолизированнойности мембранных белков в ус.ед. ОП по ее простоте за 15 минут.

Определение мембранной проницаемости эритроцитов для гемоглобина

(Кадыкина З.М. и соавт., 1987)

Приготовьте ряд пробирок с 10 мл смеси в объемных соотношениях 45:55 физиологического раствора и раствора мочевины 0,154 М (4,5 мл и 5,5 мл) и добавьте в них по 10 мкл суспензии эритроцитов (из трех проб сделайте по 2-3 повтора). Осторожно перемешайте переворачиванием пробирок и отцентрифугируйте на 2000 об/мин 15 минут. Измерьте ОП₁ при длине волны 540 нм, кювета 1 см. Внесите на палочке в каждую пробирку микроколичество концентрированного тритона-X100 и добейтесь полного гемолиза проб. Снова промерьте пробы при 540 нм, кювета 1 см, ОП₂. Определите мембранную проницаемость в % по отношению к пробам с полным гемолизом

$$\frac{E_1}{\text{---} \times 100\%}$$

$$E_2$$

Определение осмотической резистентности эритроцитов

Реактивы: фосфатный буфер, 5мМ, рН 7.2, содержащий 68,5 мМ хлористого натрия.

Разлейте в пробирки по 5 мл буфера и добавьте по 10 мкл суспензии эритроцитов. Осторожно перемешайте и измерьте ОП на длине волны 540 нм, кювета 1 см. Затем проведите полный гемолиз проб добавлением тритона и снова измерьте ОП. Определите осмотическую резистентность эритроцитов в % по отношению к пробам с полным гемолизом.

Определив осмотическую резистентность в суспензиях эритроцитов, инкубированных с гиалуронидазой и лизоцимом и инкубированных только

с физиологическим раствором, сделайте выводы о роли гликокаликса в поддержании осмотической стойкости эритроцитов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Минск: Беларусь, 1976. С.114-117.
2. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1982. С.217-241.
3. Кадывкина З.М., Колмаков В.Н., Радченко В.Г. Проницаемость эритроцитарных мембран у больных с хроническими заболеваниями печени // Клиническая медицина. 1987. N 8. С. 15.
4. Петров В.К. Взаимодействие некоторых вазоактивных веществ с фосфолипидными и эритроцитарными мембранами // Фармакология и токсикология. 1985. N 2. С.72-77.

РАЗДЕЛ 6. ЛИПИДЫ

Липиды – разнообразная по химическому строению и функциям в организме группа веществ, практически нерастворимых в воде и легко растворимых в органических, неполярных растворителях. Разнообразие химического строения затрудняет классификацию липидов. Их можно разделить на липидные мономеры (жирные кислоты, высшие алифатические и аминокислоты), простые липиды (ацилглицерины, воска, диольные липиды), сложные липиды (фосфолипиды и гликолипиды) и стероиды (холестерин и его эфиры). Биологические функции также разнообразны: от структурной (входят в состав мембран) до защитной и источника энергии.

Тема 1. Выделение и количественное определение липидов и их компонентов

Работа 1. Извлечение липидов из сыворотки крови

20 мл смеси метанол-хлороформ (1:2) поместите в колбочку с притертой пробкой (на 50 мл), затем добавьте туда 1 мл сыворотки крови. Содержимое осторожно встряхивают в течение 3 минут. После этого

фильтруют экстракт через смоченный смесью метанол-хлороформ фильтр в мерный цилиндр с притертой пробкой на 50 или 100 мл. После фильтрования осадок промывают на фильтре еще 5 мл смеси метанол-хлороформ. Объем экстракта доводят смесью до 25 мл. К этому экстракту добавляют 5 мл дистиллированной воды, плотно закрывают пробкой и встряхивают. Оставляют на экстрагирование до следующего занятия.

Содержимое расслаивается на две фазы: нижняя содержит липиды, а верхняя – нелипидные компоненты. Верхнюю удаляют пипеткой, которую можно соединить с водоструйным насосом.

Оставшийся в цилиндре экстракт переносят в пробирки на 10 мл, упаривают в водяной бане при 80°C (под тягой). Осадок липидов можно растворить в хлороформе или получить эмульсию и использовать в качестве субстратов для изучения действия липаз и фосфолипаз.

Работа 2. Выделение лецитина

К 20 мл желтка куриного яйца (2 желтка) добавьте 30 мл горячего 96%-го спирта, отцентрифугируйте. Надосадочную жидкость перелейте в чистую сухую посуду. Осадок суспендируйте в 20 мл горячего этилового спирта 96%-го и снова центрифугируют. Процедуру повторяют еще раз.

Все три вытяжки (всего 70 мл) спирта собирают вместе и оставляют на холоде (+4°C) на ночь. Фильтруют, фильтрат осаждают водным раствором хлористого кадмия (50%), добавляя малыми порциями 1,2 мл, центрифугируют. Осадок промывают 4 мл спирта.

К осадку добавляют 8 мл эфира и 1 мл воды до растворения. Раствор обрабатывают 8 мл спирта. Центрифугируют. Снова прибавляют 8 мл эфира и 1 мл воды. К этому раствору добавляют 4 мл этилового спирта и 8 мл 2%-го хлористого натрия, охлажденного до 0°C. Центрифугируют. Нижнюю водно-спиртовую фазу удаляют путем отсасывания. Эфирную фазу обрабатывают метанольносолянокислой смесью и 2%-ым хлористым натрием как описано выше. Затем добавьте только 2 мл метанола и 4 мл хлористого натрия. Эфирную фазу обрабатывают 6 мл ацетона для осаждения лецитина. Осадок промывают ацетоном. Собирают в чистый сухой бюксик и высушивают.

Тема 2. Методы количественного определения липидов

Работа 1. Определение общих липидов турбидиметрическим методом

Принцип метода. После экстрагирования липидов смесью спирта с эфиром и при взаимодействии экстракта с серной кислотой образуется мутная эмульсия, оптическую плотность которой измеряют.

Реактивы: 1) смесь Блора (этиловый спирт и диэтиловый эфир 3:1);
2) серная кислота, 1%-ый раствор.

Ход определения. 0,2 мл биологической жидкости, содержащей липиды (например, сыворотки крови) смешивают с 3,8 мл смеси Блора, встряхивают и помещают в водяную баню 50-60°C, доведя содержимое до кипения (не выше 80°C!). После охлаждения под струей холодной воды содержимое фильтруют через бумажный фильтр в мерную пробирку. Объем доводят смесью Блора до 4 мл.

Отмеряют 2 мл экстракта и добавляют 10 мл 1%-ой серной кислоты. Пробу ставят в кипящую водяную баню на 1 минуту, охлаждают и через час определяют ОП против контроля при длине волны 630 нм, в кювете 0,1-0,3 см. Контроль: 2 мл раствора Блора + 10 мл серной кислоты.

Стандартный раствор липидов: 1 г/л смеси холестерина с свиным жиром в отношении 1:3 в смеси Блора.

Расчет:

$$X \text{ г/л} = \frac{E_{\text{оп}} \times C_{\text{ст}}}{E_{\text{ст}}} .$$

Работа 2. Определение содержания липопротеидов низкой плотности (вета-липопротеидов) сыворотки крови турбидиметрическим методом (по Бурштейну и Самой)

Принцип метода. В присутствии CaCl_2 и гепарина нарушается коллоидная устойчивость белков сыворотки крови, в связи с чем осаждаются почти чистые вета-липопротеиды. Считают, что гепарин образует с вета-липопротеидами комплекс, который под действием хлористого кальция выпадает в осадок.

Реактивы: 0,274%-ый раствор хлористого кальция; гепарин активностью 1000 ед/мл (1%-ый раствор).

Ход определения. К 2 мл раствора хлористого кальция добавляют 0,2 мл сыворотки крови и 0,04 мл раствора гепарина. Точно через 4 минуты измеряют ОП на длине волны 630 нм, в кювете 0,5 см.

Расчет: $E_{x11,65} = X_{г\%}$.

Задача 1. Определите содержание общих липидов и бета-липопротеидов в одной и той же сыворотке крови. рассчитайте долю бета-липопротеидов по отношению к общему содержанию липидов.

Задача 2. Исследуйте несколько разных сывороток на содержание общих липидов и долю в их составе бета-липопротеидов.

Работа 3. Определение общих фосфолипидов

1. Определение фосфолипидов в плазме 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. Фосфолипиды осаждаются трихлоруксусной кислотой вместе с белками крови.

Реактивы: 1) ТХУ-кислота, 10%-ый раствор; 2) хлорная кислота, 42%-ый раствор; 3) молибдат аммония, 2,5%-ый раствор; 4) аскорбиновая кислота, 1%-ый раствор; 5) стандартный раствор KH_2PO_4 (высушенный до постоянного веса) - 439 мг на 100 мл дист. воды; 6) рабочий стандартный раствор (разводится в 100 раз): 1 мл раствора содержит 0,01 мг PO_4 .

Ход работы. В пробирку вносят по 3 мл воды и 0,2 мл плазмы крови и другой исследуемой жидкости. Добавляют 3 мл 10%-ой ТХУ кислоты: первые 1,5 мл 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 1 мл 42%-ой хлорной кислоты и 1-2 стеклянные бусинки для равномерного кипения. Пробирку нагревают 20-30 минут на песчаной бане, пока смесь не станет бесцветной. Рекомендуется наблюдать за процессом, пока не пройдет образование пены (5 минут). Сразу же после сжигания и охлаждения раствора прибавляют 5 мл воды. Готовят контроль на реактивы и три стандарта: наливают в 4 пробирки по 0,8 мл 42%-ой хлорной кислоты; в три пробирки приливают по 2 мл рабочего раствора фосфатного стандарта. Контрольную и стандартные пробы доводят водой до объема 6 мл.

В каждую пробирку добавляют по 1 мл 2,5%-го молибдата аммония и 0,5 мл 1%-го раствора аскорбиновой кислоты, доводят объем до 10 мл водой, перемешивают и оставляют на 5 минут. Фотометрируют против контроля при длине волны 670 нм.

$$\text{Расчет фосфата липидов мг/мл} = \frac{\text{Еоп} \times 0,02 \times 100}{\text{Ест} \times 0,2} = \frac{\text{Еоп} \times 10}{\text{Ест}},$$

0,02 мг фосфора в 2 мл раствора;

0,2 мл – сыворотка или плазма (или другая исследуемая жидкость).

Для нахождения ФЛ в мм/л полученные данные умножают на 0,3229 и на 25.

$$\text{ФЛ мм/л} = \frac{\text{Еоп} \times 10}{\text{Ест}} \times 0,3229 \times 25.$$

2. Простой метод определения фосфолипидов в биологических объектах

Реактивы: 1) 2%-ый раствор дезоксихолата натрия; 2) смесь хлороформ-метанол 2:1; 3) молибденовый реактив: 5 г молибденовокислого аммония размешайте в 60 мл воды, 15 мл конц.серной кислоты разбавьте 25 мл воды. Оба раствора смешайте и профильтруйте.

Ход определения. 10 мкл исследуемой жидкости (мембраны, митохондрии) прибавьте к 0,3 мл раствора ДОХ натрия. Встряхните. Добавьте 0,4 мл смеси хлороформ-метанол, еще раз встряхните. Затем добавьте 0,6 мл молибденового реактива, перемешайте, добавьте от 1 до 3 мл хлороформа (в зависимости от необходимого для СФ-метрирования объема). Центрифугируют 5 минут, 3000 об/мин и измеряют разность ОП-ей при 710 и 500 нм против холостой пробы. Одновременно ставится стандартная проба с известным содержанием фосфора, которая обрабатывается также как опытная. Расчет производится как в предыдущем методе.

Работа 4. Холестерин

Холестерин входит в состав липидного слоя мембран, обеспечивая ее прочность благодаря своей химической структуре жесткого циклопентанового ядра. Холестерин не растворим в полярных растворителях и переносится к клеткам, главным образом, в составе липопротеидов низкой плотности (вета-липопротеиды). Клеточные мембраны осуществляют рецепторный захват липопротеидных частиц, и холестерин поступает в ЭЛР, где превращается в эфиры с жирными кислотами. По мере обновле-

ния мембраны клетка использует холестерин, предварительно превращая его снова в свободную форму. В виде эфиров холестерин не способен встраиваться в мембраны, таким образом осуществляется регуляция количества необходимого клетке холестерина. Холестерин также используется клетками надпочечников в качестве предшественника кортикостероидов.

Экстракция холестерина. В пробирку вносят 0,1 мл гомогената печени или сыворотки крови и добавляют 2 мл смеси Блора (3 части этанола и 1 часть эфира), пробирку встряхивают и помещают в кипящую водяную баню. Когда жидкость в пробирке закипит, пробирку вынимают из бани и содержимое фильтруют через бумажный фильтр, смоченный смесью Блора, в стаканчик диаметром 4-5 см. В пробирку 3 раза добавляют по 2 мл смеси Блора, которую сливают в тот же фильтрат. Фильтрат упаривают досуха на кипящей водяной бане под тягой.

Определение холестерина. Полученный осадок растворяют в 2 мл хлороформа, добавляют 0,5 мл уксусного ангидрида и 0,4 мл конц. серной кислоты. Одновременно ставят стандартную пробу: 0,1 мл 1г/л раствора холестерина в хлороформе доводят до 2 мл хлороформом, добавляют 0,5 мл уксусного ангидрида и 0,4 мл конц. серной кислоты. Пробы помещают на 20 минут в темное место для развития окраски, после чего колориметрируют с красным светофильтром в кювете 0,5 см против контроля на реактивы: 2 мл хлороформа, 0,5 мл уксусного ангидрида и 0,4 мл конц. серной кислоты.

Еспр

$$X \text{ г/л} = \frac{\text{---}}{\text{---}} \times 1 \text{ г/л}$$

Ест

Работа 5. 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 (или другой жирной кислоты) 1 мкг. экв./мл в хлороформе; 2) медный реактив: готовят из 10 объемов 6,45%-го раствора $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 9 объемов 1М раствора триэтаноламина (М. вес 149) и 1 объема 1 Н уксусной кислоты; 3) 0,1%-ый раствор диэтилдитиокарбамата в бутаноле.

Ход определения. В пробирку с притертой пробкой вносят 0,5 мл сыворотки крови. Одновременно готовят стандарт; для этого в другую пробирку вносят 1 мл раствора пальмитиновой кислоты в хлороформе. В опытную пробу добавляют 5 мл, в стандарт 4,5 мл хлороформа и по 2,5 мл медного реактива. Контрольная проба 5 мл хлороформа + 2,5 мл медного реактива. Пробирки закрывают и встряхивают 2-3 минуты. Содержимое пробирки переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин. Смесь в пробирках разделяется на три слоя: хлороформ, белок и вода.

Верхнюю водную фазу, содержащую избыток медного реактива, удаляют, белковую пленку сдвигают на стенку пробирки. Хлороформный слой с жирными кислотами переносят в другие пробирки, куда добавляют по 0,5 мл 0,1%-го раствора диэтилдитиокарбамата натрия в бутаноле и перемешивают содержимое пробирок.

Опыт и стандартные пробы колориметрируют с синим СФ в кювете 0,5 см против контрольной пробы.

Епр х 2

X мкг-экв/мл = -----

Ест

Тема 3. Перекисное окисление липидов

Стационарный уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) характерен для метаболизма всех тканей, являясь, в частности, одним из инструментов быстрой модификации свойств биологических мембран и мембранозависимых процессов.

Hochstein P. в 1963 году открыл два пути перекисного окисления липидов - ферментативное и неферментативное. Оба пути окисления липидов имеют много общего, хотя и различаются способом инициирования, набором промежуточных и конечных продуктов окисления. В обоих случаях окисление идет через образование свободных радикалов. Пути окисления на разных стадиях могут переходить один в другой. Инициирование происходит активными формами кислорода O_2^- (супероксидный радикал); OH-гидроксильный радикал; R-O-O- (перекисный радикал), которые образуются в различных процессах метаболизма.

Доказательством о существенной роли ПОЛ для нормального метаболизма является обнаружение перекисей во многих тканях, существование

ферментативных систем, регулирующих как скорость образования, так и скорость утилизации перекисей липидов. Токсичными являются не сами перекиси липидов, а продукты их более глубокого окисления: альдегиды, кетоны, кислоты. Сами же перекиси липидов используются в качестве интермедиантов для синтеза биологически активных веществ: простагландинов, тромбоксанов, стероидных гормонов. Интенсификация процессов ПОЛ приводит к ускорению обмена фосфолипидов, изменению их относительного состава, липид-белковых отношений, структуры мембраны.

Интенсивность ПОЛ в клетке определяется деятельностью систем, генерирующих свободные радикалы, с одной стороны, и ферментативной и неферментативной системами защиты – с другой.

Системы регуляции ПОЛ:

1) обеспечивают поддержание строго определенной структурной организации липидов, регламентируют скорость инициации, продолжения и обрыва цепи;

2) включают ферменты, ответственные за образование и превращение активных форм кислорода, и ферменты, участвующие в разложении перекисей без образования из них свободных радикалов;

3) включают систему регуляции обмена фосфолипидов мембран, которая влияет на скорость окисления путем изменения состава ненасыщенных жирных кислот, фосфолипидов, отношения липид/белок, фосфолипиды/холестерин;

4) объединяют низкомолекулярные вещества, выполняющие роль инициаторов, катализаторов, ингибиторов ПОЛ.

Сбой согласованности работы этих систем может привести к патологическому возрастанию интенсивности процессов ПОЛ, накоплению продуктов, токсичных для клетки и тканей.

Ферменты – доноры супероксидного радикала кислорода: ксантиноксидаза; альдегидоксидаза; дегидрооротатоксидаза.

В митохондриях источник супероксида – убисемикинон и убихинол; НАДФН-цитохром-С-редуктазная система. В микросомах – цитохром P450.

Неферментативные источники: автоокисление гидрохинонов, лейкофлавинов, катехоламинов, тиолов, тетрагидроптеринсов, ферридоксина.

Супероксидный радикал кислорода способен иницировать СРО по реакции:

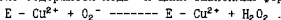


В органической гидрофобной среде агрессивность супероксидного радикала значительно выше, чем в водной. Помимо участия в генерации СР биомолекул, супероксидный радикал может вступать в реакции с другими СР с образованием молекулярных продуктов (обрыв CPO), в том числе и дисмутации со вторым супероксидным радикалом с образованием перекиси водорода.

Основным местом генерации перекиси водорода в клетке являются пероксисомы, содержащие весь набор ферментов, ее производящих. Взаимодействие супероксидного радикала и перекиси водорода приводит к образованию высокореакционноспособного радикала $\text{HO}\cdot$, который атакует соединение любой природы с образованием воды и соответствующего свободного радикала (липиды, белки, нуклеиновой кислоты, углеводы). Активируется образование этого радикала Fe^{2+} и аскорбиновой кислотой (аскорбатзависимое перекисное окисление).

Антиокислительные системы клеток:

1. Энзимное обезвреживание образовавшегося в клетке супероксидного радикала осуществляет фермент супероксиддисмутаза (СОД). В цитозоле содержится медь- и цинк-зависимый фермент:



Атом цинка не участвует в катализе, он стабилизирует молекулу фермента. В митохондриях содержится Mn-зависимая форма фермента.

Образовавшаяся перекись водорода разрушается каталазой и глутатионпероксидазой.

Ферментативное перекисное окисление (оксигеназное) активируется НАДФН и АДФ в присутствии аскорбиновой кислоты.

Работа 1. Перекисное окисление липидов в гомогенатах печени

А. Приготовление гомогената печени

Реактивы: 1) 0,9%-ый раствор хлористого натрия, охлажденный; 2) 0,025М Трис-буфер, содержащий 0,175М KCL, pH 7,4.

Ткань печени крысы или другого животного тщательно отмойте от крови физиологическим раствором и просушите на фильтровальной бумаге. Сделайте навеску 1 г и гомогенизируйте в охлажденном буфере в отношении 1:9. Полученный гомогенат отцентрифугируйте для отделения ядер и неразрушенных клеток при 3000 об/мин 10 минут. Надосадочную жидкость используйте для дальнейших исследований.

Б. Инициирование ПОЛ

Гомогенат разделите на три части (по 3 мл) и добавьте в первые 3 мл:

1. 8×10^{-4} М аскорбиновой кислоты;
2. 2×10^{-4} М АДФ;
3. 12×10^{-6} М FeSO_4 (концентрации конечные).

Это приведет к инициированию аскорбатзависимого неферментативного ПОЛ.

Во вторые 3 мл добавьтe:

1. 5×10^{-4} М НАДФН;
2. 2×10^{-4} М АДФ;
3. 12×10^{-4} FeSO_4 .

Это приведет к инициированию ферментативного ПОЛ.

В третьи 3 мл гомогената добавьтe буфера (среды гомогенизации) для сравнения объемов всех трех проб (спонтанное, неактивированное ПОЛ). Сразу же отберите по 0,5 мл из всех трех проб в 5 мл экстрагирующей смеси гептан-изопропиловый спирт в отношении 1:1 в пробирки с притертыми пробками. Еще по 0,5 мл из каждой пробы отберите в 1мл 15%-ой ТХУ-кислоты. Оставшиеся пробы по 2 мл поставьтe на 30 минут в термостат при 37°C для развития процесса ПОЛ.

В. Определение первичных продуктов ПОЛ: полиненасыщенных жирных кислот с сопряженными двойными связями - диеновые конъюгаты (Стальная И.Д., 1977; модификация Костюк В.А., 1991)

Реактивы: 1) смесь гептан-изопропиловый спирт; 2) этиловый спирт.

Ход определения. 0,5 мл исследуемой жидкости (гомогената) и 5 мл смеси гептан-изопропиловый спирт закрывають пробками и встряхивають в течение 5-10 минут. Затем пробам дають возможность хорошо отстояться. Жидкость без остатков гомогената переносят в градуированные пробирки или просто измеряют его количество и добавляют 1/10 объема дист. воды. После двухкратного встряхивания и расслоения фаз, отбирают по 0,5мл и гептановой и изопропиловой фазы (нижняя), добавляют по 2,5мл этилового спирта и измеряют ОП при 232 нм (диеновые конъюгаты) и 273 нм (диеновые кетоны) против этилового спирта. Если основным субстратом ПО являются фосфолипиды, то продукты обнаруживаются в изопропиловой фазе, если эфиры холестерина и триацилглицерина - в гептановой.

Проведите определение первичных продуктов ПОЛ как в пробах до инкубации в термостате, так и в пробах после инкубации в термостате. Рассчитайте содержание первичных продуктов ПОЛ, используя молярный коэффициент экстинкции: $28\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$.

Вытя исходное содержание в пробах первичных продуктов ПОЛ (до инкубации), определите скорость образования первичных продуктов ПОЛ в трех пробах и сравните их между собой.

Определение конечного продукта ПОЛ: малонового диальдегида

(Стальная И.Д., Гаришвили 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-кислота, 15%-ый раствор; 2) 0,8%-ый раствор тиобарбитуровой кислоты (готовится при нагревании).

Ход определения. К 0,5 мл гомогената добавьте в 1 мл ТХУ-кислоты, перемешайте и отцентрифугируйте при 3000 об/мин 10 минут.

К 1 мл надосадочной жидкости (центрифугат должен быть прозрачен) добавьте 2 мл раствора тиобарбитуровой кислоты. Пробирки поместите в кипящую водяную баню на 15 минут. После охлаждения пробы колориметрируют при 532 нм против контроля на реактивы: 1 мл ТХУ и 2 мл тиобарбитуровой кислоты. Рассчитайте количество малонового диальдегида в пробах, используя молярный коэффициент экстинкции $1,56 \times 10^5\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$. Определите количество малонового диальдегида в пробах до инкубации (исходный уровень) и в пробах после инкубации. Рассчитайте скорость образования малонового диальдегида во всех трех пробах и сравните их между собой.

Рекомендуется проведение следующих исследований процессов ПОЛ:

1. Выделите митохондрии, проведя второе центрифугирование гомогената при $8\ 500\ \text{g}$ 10 минут. Осадок ресуспендируйте в буфере для гомогенизации. Проведите иницирование ПОЛ в суспензии митохондрий и определите скорость образования первичных и конечных продуктов ПОЛ. Сравните скорости ПОЛ в митохондриях и в гомогенатах печени (в присутствии цитозоля клеток).

2. Проведите иницирование процессов ПОЛ в гемолизатах и мембранах эритроцитов.

Эритроциты дважды отмойте физиологическим раствором, pH 7,2.

Проведите гемолиз эритроцитов добавлением к 1 объему 100 объемов дист. воды. Отцентрифугируйте при 8 500 g 10 минут. Отмойте эритроцитарные мембраны от гемоглобина 0,09%-ым раствором хлористого натрия, повторяя центрифугирование. Отмытые мембраны используйте для иницирования в них ПОЛ и определения скорости образования малонового диальдегида. Сравните скорость образования малонового диальдегида в присутствии гемоглобина и без него, объясните полученные данные. Для сравнения проведите исследование скорости ПОЛ на отмытых и неотмытых от гемоглобина мембранах эритроцитов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Петрович Ю.А., Гуткин Д.В. Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе воспаления, ишемии и стресса // Пат.физиол.и экспериментальная терапия. 1986. N 5. С.85.
2. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии. 1985. Т.54. Вып.9. С.1540-1557.
3. Строев Е.А., Макарова В.Г. Практикум по биологической химии. М.: Высшая школа, 1986. С.60-64.
4. Современные методы в биохимии / Под.ред. В.Н.Ореховича. М.: Медицина, 1977. С.63-66.
5. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Минск: Беларусь, 1976. С.150-171.
6. Лемешко В.В., Бровкович В.М., Листопад А.П. Простой метод определения фосфолипидов в биологических объектах // Укр.биох.журнал. 1991. Т.63. N 1. С.60-66.
7. Костюк В.А. Использование системы гептан-изопропанол для экстракции первичных продуктов перекисного окисления липидов // Укр.биох.журнал. 1991. Т.63. N 1. С.98-101.

РАЗДЕЛ 7. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ. НУКЛЕОТИДЫ

Надмолекулярные комплексы ДНК в клетках различных тканей высших организмов отличаются структурно-функциональной гетерогенностью, включая гистоновые и негистоновые белки. Субъединицы нуклеопротеидов с $M.M. 2 \times 10^6$ Д связаны между собой липидами различного состава (в зависимости от тканей). Хроматин в клетках высших организмов разделяют на "активный" (эухроматин) и "неактивный" (гетерохроматин) в зависимости от скорости включения оснований, добавленных извне.

Тема 1. Получение препаратов ДНК и РНК

Работа 1. Выделение ДНК и РНК по методу Тсубол и Стоуэл

Реактивы: 1) 0,14 М 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 0,14 М хлористого натрия. Гомогенат центрифугируют в течение 4 минут при 6000 об/мин. Полученный осадок содержит все 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.

Работа 2. 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 0,2М хлорной кислоты. Постройте спектральную кривую в области ОП от 230 до 280 нм. 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 260 мкм 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 1М 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 определенные 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. Расчет $E(p)$ производят по формуле:

$$E(p) = \frac{E}{Cp \cdot L}, \text{ где}$$

E - показания поглощения по прибору;

Cp - молярная концентрация фосфора в растворе, рассчитанная на основании процентного содержания фосфора в ДНК;

L - ширина кюветы.

Измерения проводят при 258-260 мкм.

2). Проба на Pb^{2+}

Реактивы: ацетат свинца, 1%-ый раствор.

Ход определения. Другим простым способом для проверки нативности препарата является проба на осаждение с Pb^{2+} . Денатурированная ДНК осаждается, если к ней прилить равный объем 1%-го ацетата свинца. Нативная ДНК в этих условиях не осаждается.

Работа 3. 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 2 мл; водяная баня; спектрофотометр; круглодонная колба с обратным холодильником.

Материалы: 1) гидролизат дезоксирибонуклеопротеидов ткани селезенки или печени; 2) РНК дрожжевая, свежеприготовленный раствор.

Получение гидролизата ДНК. Осадок дезоксирибонуклеопротеидов, полученный из 1 г ткани селезенки или печени, помещают в колбочку для гидролиза, добавляют 30-40 мл 5%-го раствора серной кислоты.

Закрывают колбочку пробкой с обратным холодильником и осторожно кипятят содержимое на медленном огне в течение 30-40 мин. Полученный гидролизат охлаждают.

Метод основан на измерении светопоглощения нуклеиновых кислот при 270 и 290 нм, интенсивность которого пропорциональна их количеству в пробах.

Ход определения. В одну пробирку вносят 1,0 мл гидролизата ДНК, в другую - тот же объем раствора РНК и доводят дистиллированной водой до 1,5 мл.

Добавляют в каждую пробу по 1,5 мл раствора хлорной кислоты, закрывают пробирки капельницами и ставят на гидролиз в кипящую водяную баню на 20 мин. Гидролизаты охлаждают, определяют экстинкцию содержащего каждой пробы на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при 270 и 290 нм.

Расчет: Содержание ДНК рассчитывают по формуле

$$X_1 = \frac{(E_{270} - E_{290}) 10,1}{0,19} ,$$

а РНК по формуле

$$X_2 = \frac{(E_{270} - E_{290}) 10,5}{0,19} , \text{ где}$$

X_1 и X_2 - концентрации ДНК и РНК, мг/л;

E_{270} - экстинкция исследуемого гидролизата при 270 нм;

E_{290} - экстинкция исследуемого гидролизата при 290 нм;

0,19 - удельная экстинкция фосфора нуклеиновых кислот в концентрации 1 мг/л;

10,1 и 10,5 - коэффициенты пересчета содержания фосфора на концентрацию нуклеиновых кислот, исходя из теоретического содержания фосфора в ДНК 9,9% и в РНК 9,5%.

Тема 2. Нуклеотиды

Работа 1. Спектральная характеристика и идентификация свободных нуклеотидов

1. Спектральная характеристика нуклеотидов

Реактивы: 1) 0,1 Н NaOH; 2) 40%-ый NaOH; 3) 20%-ый H_2SO_4 .

2 мг нуклеотида (АТФ, АДФ, АМФ, НАД, НАДФ) растворите в 40 мл воды. Доведите pH слабым раствором щелочи до 7,0. Доведите объем до 50 мл. Измерьте экстинкцию раствора при длине волны 260 нм. В случае необходимости разведите раствор до получения ОП, не превышающей величины 0,8. Проверив pH (он должен быть нейтральным), снимите спектр поглощения в УФ-спектре. Измерения проводят против дист. воды в интервале длин волн 220-310 нм через 5 нм. В области E_{max} и E_{min} изме-

нения проводят через 1 нм. Затем рН раствора нуклеотида доводят до рН 2,0 20%-ым раствором серной кислоты и проводят измерение спектра поглощения в УФ-области как описано выше. После этого рН раствора нуклеотида доводят до 11, добавляя по каплям 40%-ый раствор едкого натра. Снимают спектр поглощения полученного щелочного раствора нуклеотида. Полученные спектры поглощения изображают графически, определяют $E_{\max}$ и $E_{\min}$.

1. Постройте спектры поглощения различных нуклеотидов; сравните спектры поглощения щелочных и кислых растворов нуклеотидов; объясните полученные данные.

2. Сделайте вывод о возможности применения спектров поглощения для идентификации нуклеотидов.

3. Рассчитайте молярные коэффициенты экстинкции АМФ, АДФ, АТФ и др. при длине волны 260 нм и сравните его с средним значением для адениловых нуклеотидов ($15,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2. Определение соотношения форм фосфата в нуклеотидах

Соотношение форм фосфата в препарате определяют для того, чтобы установить, имеют ли дело с нуклеозидомо-, -ди- или -трифосфатом.

В нуклеозидтрифосфатах соотношение лабильно связанного и стабильно связанного фосфата составляет 2:1, в нуклеозиддифосфатах - 1:1. В нуклеозидмонофосфатах лабильный фосфат отсутствует, а количество фосфата стабильного в мкМ должно равняться количеству мкМ азотистого основания (или всего соединения в целом).

Реактивы: 1) 2 Н соляная кислота; 2) раствор 0,1Н для нейтрализации; 3) 57%-ый раствор хлорной кислоты.

Ход определения. В приготовленных нейтральных растворах нуклеотидов определите количество исходного фосфата P_1 (гидролиз в нейтральной среде). Затем проведите мягкий гидролиз части растворов нуклеотидов для определения содержания лабильно связанного фосфата. Для этого 1 мл 2Н соляной кислоты смешивают с 1 мл раствора нуклеотида, пробирку неплотно закрывают пробкой, помещают на 7 минут в кипящую водяную баню. Пробирку охлаждают, осторожно нейтрализуют содержимое, стараясь не изменять объем смеси, и определяют количество фосфора, учитывая разведение (P_2). Количество лабильно связанного фосфата равно разнице $P_2 - P_1$ (P_A).

Для определения содержания стабильного фосфата проводят сжигание проб раствора нуклеотида: 0,2 мл и 0,5 мл 57%-ой хлорной кислоты по-

мешают в термостойкую пробирку и в открытом виде ставят в песчаную баню для сжигания. После получения сухого остатка пробирки нагревают над спиртовкой до образования белого порошка и охлаждают на воздухе. В пробы добавляют по 1 мл дист. воды и, неплотно закрыв пробкой, помещают в кипящую водяную баню на 10 минут (для разрушения пирофосфата). После охлаждения в пробе определяют содержание фосфора (общий). Количество стабильно связанной формы фосфата будет равняться:

$$P_{\text{стаб}} = P_{\text{общ}} - (P_1 + P_2).$$

Методы определения фосфора неорганического

Микрометод определения фосфора (Гончар М.В., Монастырский В.А., 1982).

Реактивы: 1) 0,045%-ный раствор малахитового зеленого (А); 2) 4,2%-ный молибдата аммония в 4Н соляной кислоты (Б); 3) рабочий раствор: смешивают 3 объема раствора А и 1 объем раствора Б. После смешивания раствор фильтруют. К полученному фильтрату добавляют 0,2%-го раствора тритона Х-100 в расчете 1 мл на 50 мл реактива; 4) стандартный раствор KH_2PO_4 : 10 мг высушенного до постоянного веса KH_2PO_4 растворяют в 100 мл дист. воды.

Ход определения. В 0,2 мл исследуемой жидкости добавляют 2 мл рабочего реактива. Одновременно ставят стандартную пробу: 0,2 мл стандартного раствора и 2 мл реактива (если ОП стандартной пробы слишком высока, стандартный раствор предварительно разводят водой в определенное число раз). Через 20 минут измеряют ОП при длине волны 625 нм против контроля на реактивы: 0,2 мл воды и 2 мл рабочего реактива.

Расчет ведут по стандарту:

$$X \text{ мкМ или млМ } \text{PO}_4 = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C$$

Метод одностадийного определения фосфора неорганического

(Путьшев А.Б., 1991).

Реактивы: 1) 2,5%-ный раствор молибдата аммония на 10 Н серной кислоте; 2) 10%-ный раствор ТВИНа-80; 3) красящий реактив: готовят смешиванием 1:1 реактивов 1 и 2; 4) рабочий раствор красящего реактива: реактив 3 перед употреблением разводят водой в 25 раз; 5) стандартный раствор фосфора готовят как в предыдущем методе.

Ход определения. Пробы, содержащие фосфор в количестве 0,2 мл, смешивают с 2 мл рабочего раствора (также обрабатывают и стандартную пробу). Через 15 минут измеряют ОП при длине волны 350 нм против контроля на реактивы: 0,2 мл воды и 2 мл рабочего реактива. Расчет ведут по стандарту.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Практикум по биохимии / Под ред. Н.П.Мешковой и С.Е.Северина. М.: Московский университет, 1979. С.157-159.
2. Малый практикум по биохимии / Под ред. В.В.Юркевича. М.: Московский университет, 1979. С.88-91.
3. Гончар М.В., Монастырский В.А. Микрометод определения содержания неорганического фосфата в крови // Лаб.дело. 1982. № 1. С.29-31.
4. Пупышев А.Б. Стабильный реактив для одностадийного определения неорганического фосфата // Лаб.дело. 1991. № 9. С.12-14.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Раздел 1. Техника постановки биохимических исследований.....	3
1.1. Концентрации растворов. Понятие конечной концентрации. Методы приготовления растворов.....	3
1.2. Расчет составов инкубационных смесей. Основы разработки методов определения концентраций веществ.....	6
1.3. Методы стандартизации. Выводы формул расчета. Единицы измерений.....	7
Раздел 2. Буферные растворы.....	10
2.1. Приготовление и свойства буферных растворов.....	10
Раздел 3. Белки.....	12
3.1. Методы осаждения белков.....	12
3.2. Методы выделения и очистки белков.....	14
3.3. Количественный анализ белков.....	17
3.4. Изучение свойств отдельных белков. Гемоглобины. Свойства. Окисляемость. Сродство к кислороду.....	32
Раздел 4. Ферменты.....	36
4.1. Приготовление ферментных препаратов. Определение удельной активности ферментов.....	36
4.2. Составление формул расчета активностей ферментов.....	42
4.3. Кинетика ферментативных реакций.....	45
Раздел 5. Углеводы.....	52
5.1. Моносахариды.....	52
5.2. Обмен углеводов.....	55
5.3. Полисахариды.....	57
5.4. Углеводсодержащие белки.....	63
Раздел 6. Липиды.....	69
6.1. Выделение и количественное определение липидов и их компонентов.....	69
6.2. Методы количественного определения липидов.....	71
6.3. Перекисное окисление липидов.....	75
Раздел 7. Нуклеиновые кислоты. Нуклеотиды.....	81
7.1. Получение препаратов ДНК и РНК.....	81
7.2. Нуклеотиды.....	84