

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»
Кафедра химии

**Е.О. Данченко, А.А. Чиркин,
О.М. Балаева-Тихомирова, Т.А. Толкачева**

**МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ,
ОСНОВАННЫЕ НА ПРИМЕНЕНИИ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ОБОРУДОВАНИЯ**

*Методические рекомендации
для выполнения лабораторных работ*

*Витебск
ВГУ имени П.М. Машерова
2018*

УДК 577.1:001.891.53(076.5)
ББК 28.072я73
М54

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 6 от 27.06.2018 г.

Авторы: профессор кафедры химии ВГУ имени П.М. Машерова, доктор медицинских наук **Е.О. Данченко**; профессор кафедры химии ВГУ имени П.М. Машерова, доктор биологических наук **А.А. Чиркин**; заведующий кафедрой химии ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук, доцент **О.М. Балаева-Тихомирова**; доцент кафедры химии ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук **Т.А. Толкачева**

Рецензент:

доцент кафедры химии ВГУ имени П.М. Машерова,
кандидат биологических наук *Н.А. Степанова*

М54 Методы биохимических исследований, основанные на применении специализированного оборудования : методические рекомендации для выполнения лабораторных работ / Е.О. Данченко, А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова, Т.А. Толкачева. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2018. – 51 с.

Издание подготовлено в соответствии с учебной программой по дисциплине «Спецпрактикум по биохимии». Приводятся теоретические и практические основы выполнения лабораторных работ по дисциплине.

Предназначается для студентов, обучающихся по специальности 1-31 01 01 Биология (НПД), специализация 1-31 01 01-02 Биохимия.

УДК 577.1:001.891.53(076.5)
ББК 28.072я73

© Данченко Е.О., Чиркин А.А., Балаева-Тихомирова О.М., Толкачева Т.А., 2018
© ВГУ имени П.М. Машерова, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Лабораторная работа № 1 Количественное определение пировиноградной кислоты в тканях ферментативным методом	4
Лабораторная работа № 2 Количественное определение молочной кислоты в тканях животных ферментативным методом	8
Лабораторная работа № 3 Определение активности гексокиназы в тканях животных	10
Лабораторная работа № 4 Определение активности лактатдегидрогеназы	13
Лабораторная работа № 5 Исследование активности альдолазы в тканях ..	15
Лабораторная работа № 6 Определение активности пируватдегидрогеназы ..	18
Лабораторная работа № 7 Исследование ионного состава воды методом капиллярного электрофореза	21
Лабораторная работа № 8 Измерение спектра поглощения рибофлавина. Проверка закона Бугера–Ламберта–Бера	27
Лабораторная работа № 9 Количественное определение диеновых конъюгатов в животных тканях	28
Лабораторная работа № 10 Определение содержания вторичных продуктов перекисного окисления липидов в животных тканях	30
Лабораторная работа № 11 Количественное определение содержания восстановленного глутатиона в тканях	31
Лабораторная работа № 12 Оценка степени окислительной модификации белков	35
Лабораторная работа № 13 Определение общей активности глутатионредуктазы в тканях животных	37
Лабораторная работа № 14 Определение активности глутатионпероксидазы в тканях животных	39
Лабораторная работа № 15 Определение общей активности каталазы	41
Лабораторная работа № 16 Определение активности супероксиддисмутазы	44
Лабораторная работа № 17 Исследование протеолитической активности сыворотки крови спектрофотометрическим и флуориметрическим методами	46

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Количественное определение пировиноградной кислоты в тканях ферментативным методом

Цель работы: определить количественное содержание пирувата в тканях животных.

Задачи работы:

1. Приготовить растворы субстратов и ферментов.
2. Определить содержание пирувата в тканях животных.
3. Определить количество пировиноградной кислоты, привести расчеты.

Методические подходы, используемые для определения субстратов гликолитического пути распада глюкозы.

Пировиноградная кислота (ПВК) является продуктом аэробного и анаэробного окисления глюкозы. Определение субстратов и промежуточных продуктов гликолиза проводят химическими методами, преимущественно колориметрическими и ферментативными. Последние, как правило, более специфичны и чувствительны, но требуют использования высокоочищенных препаратов ферментов, исключающих побочные реакции. Для определения промежуточных продуктов или субстратов гликолиза, необходимо экстрагировать их из исследуемой ткани хлорной кислотой (HClO_4). Обычно при экстракции соотношение веса ткани к объему составляет 1:5 или 1:10. Гомогенат центрифугируют для удаления белка, а экстракт нейтрализуют КОН или лучше KHCO_3 . Гидрокарбонат калия наиболее удобен, так как обеспечивает мягкую нейтрализацию и не вызывает перещелачивания экстракта.

При спектрофотометрическом (ферментативном) определении интермедиатов углеводного обмена необходимо соблюдать ряд условий:

1. Все компоненты ферментативной реакции должны быть в большом избытке, за исключением определяемого соединения. Активность вспомогательных ферментов должна, по меньшей мере, составлять не менее 0,25-0,3 Е на кювету.

2. Основным условием определения субстратов является чистота ферментного препарата. Фермент не должен содержать примесей других ферментов, способных катализировать побочные реакции в данных конкретных условиях определения.

3. Количество исследуемого экстракта в спектрофотометрической кювете определяют путем кратного увеличения (уменьшения) объема экстракта, вносимого в кювету. Изменения оптической плотности должны быть пропорциональны количеству вносимого экстракта. Реакция, с помощью которой определяется данное вещество, не должна длиться более 20 мин.

4. Реакцию не следует начинать добавлением вещества, сильно изменяющего оптическую плотность раствора в кювете, например НАДН. Кроме того, объем вещества, которым начинают реакцию, должен быть минимальным, чтобы практически не изменять объема раствора в кювете. Лучше всего

для этой цели использовать вспомогательные ферменты, вносимый объем которых не превышает сотых долей миллилитра.

5. Во всех случаях необходимо: а) вносить поправку на изменения оптической плотности, обусловленные добавлением фермента или вещества, которым начинают реакцию; б) проверить пропорциональность определения путем добавления к исследуемому экстракту (в кювете) точно известного количества определяемого вещества; одновременно такое же определение проводят без добавления исследуемого экстракта.

6. После окончания энзиматического определения целесообразно проверить правильность работы ферментативной системы в кювете путем добавления в нее 0,02-0,03 мкмоль определяемого вещества.

При количественном определении промежуточных продуктов чаще всего используют стандартные кюветы с длиной хода луча 1 см и объемом 3 см³. В этом случае с учетом коэффициента молярной экстинкции для НАДН и НАДФН изменение оптической плотности при 340 нм на 0,207 соответствует содержанию в образце 0,1 мкмоль (100 нмоль) определяемого вещества. При определении количества пирувата, изоцитрата, фосфотриоз, НАДФ и других соединений, содержание которых в ткани очень низкое, определение необходимо проводить в специальных кюветах с длиной хода луча более 1,0 см и объемом более 3 см³ (например, кюветы с длиной хода луча 2,5 см и объемом 4 см³). Изменение оптической плотности в указанной кювете на 0,39 будет соответствовать содержанию 0,1 мкмоль определяемого вещества.

В последнее время большинство исследователей пользуются энзиматическими методами определения субстратов и продуктов углеводного обмена, что объясняется доступностью высокоочищенных ферментов, и высокой точностью данных методов. Соблюдение общих подходов и правил позволяет определить в тканях содержание даже низких концентраций исследуемых веществ.

В организме животных ПВК является одним из центральных метаболитов, участвующих в ряде ферментативных реакций. К наиболее важным реакциям обмена пирувата относятся: 1) трансаминирование, 2) реакции карбоксилирования, протекающие под действием пируваткарбоксилазы и НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы, 3) лактатдегидрогеназная реакция и 4) реакция окислительного декарбоксилирования, катализируемая пируватдегидрогеназным комплексом. Другими словами, пировиноградная кислота находится на перекрестке нескольких метаболических путей. Реакцию окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты катализирует пируватдегидрогеназа (пируват-липоатоксидоредуктаза, КФ·1.2.4.1), которая относится к числу наиболее сложных по своей структуре мультиферментных комплексов.

Скорость окисления пировиноградной кислоты контролируется одновременно несколькими регуляторными факторами – концентрацией ионов магния и кальция, неорганического фосфата, отношением окисленных и восстановленных форм пиридиновых нуклеотидов и т.д. В физиологических условиях наиболее важна регуляция активности пируватдегидрогеназного компонента комплекса, который катализирует первый, наиболее медленный этап

превращения пирувата. Изменение активности фермента происходит за счет циклов фосфорилирования–дефосфорилирования. Химическая модификация осуществляется специфической киназой, фосфорилирующей ферментативный белок, и фосфатазой. Эти «регуляторные» ферменты вместе с функциональными компонентами составляют пируватдегидрогеназный комплекс.

Пируватдегидрогеназа одна из многих ферментативных систем, участвующих в метаболизме пировиноградной кислоты. Роль ее в различных тканях животных неодинакова. Например, в головном мозге окислительное декарбоксилирование пирувата является основным путем ввода окисляемых метаболитов (ацетил–КоА) в ЦТК и заметно преобладает над другими путями метаболизма субстрата в митохондриях. Это доминирование сохраняется при различных функциональных состояниях, вплоть до экстремальных воздействий. Напротив, в митохондриях печени, сердца, почек активность пируватдегидрогеназы одного порядка с активностью аланинаминотрансферазы, пируваткарбоксилазы, НАДФ–малатдегидрогеназы, а при некоторых воздействиях значительно уступает им.

Принцип метода. Пируват восстанавливается до лактата в присутствии лактатдегидрогеназы:



Количество использованного в реакции пирувата эквивалентно количеству НАДН, убыль которого регистрируют спектрофотометрически при длине волны 340нм.

Средства измерений, оборудование:

Весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр

Реактивы:

1. 0,6 М хлорная кислота (м.м. 100,46 г/моль; $\rho=1,67$ г/см³): 3,6 см³ хлорной кислоты добавляют в колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

2. 5 М карбонат калия (м.м. 138,2 г/моль): 6,9 г карбоната калия, переносят в мерную пробирку объемом 10 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают (растворяется плохо, раствор мутный).

3. 0,5 М трис-буфер, содержащий ЭДТА 0,005 М, рН=7,6 (м.м. трис 121,14 г/моль, м.м. ЭДТА 292,24 г/моль): 6,05 г триса и 0,146 г ЭДТА растворяют в 25 см³ воды. Доводят рН до 7,6 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты. Раствор количественно переносят в колбу вместимостью 100 см³ и доводят водой дистиллированной до метки.

4. 0,006 М НАДН (м.м. 709,45 г/моль): 0,021 г НАДН растворяют в 5 см³ трис-буфера (готовят непосредственно перед использованием)*.

5. Лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27): хранящийся в холодильнике препарат фермента перед использованием разводят дистиллированной водой так, чтобы в 0,05 см³ содержалось 0,3-0,4 Ед фермента.

Порядок выполнения работы

1. Навеску ткани (200 мг) гомогенизируют при 4°C с 1,8 см³ 0,6 М HClO₄ (гомогенат 1:9).

2. Гомогенат переливают в центрифужные пробирки и оставляют во льду на 15 мин для более полной экстракции.

3. Осажденные белки ткани отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 4500 об/мин.

4. Безбелковую надосадочную жидкость переносят в центрифужную пробирку и удаляют избыток хлорной кислоты, добавляя 0,2 см³ 5 М раствора K₂CO₃.

5. Пробу перемешивают и оставляют на 10 мин во льду для более полного осаждения перхлората калия, после чего осадок отделяют фильтрованием или центрифугированием в течение 10 мин при 3000 g.

6. Нейтрализованный таким образом безбелковый экстракт нагревают до комнатной температуры и используют для проведения ферментативной реакции.

7. В кювету спектрофотометра (1 см) наливают 1,2 см³ трис-буфера и 0,8 см³ тканевого экстракта.

8. Пробу перемешивают и устанавливают «ноль» спектрофотометра.

9. Затем в кювету вносят 0,05 см³ раствора НАДН, снова перемешивают и измеряют исходное значение оптической плотности (A₁).

10. После этого к пробе добавляют 0,05 см³ препарата лактатдегидрогеназы, перемешивают и через 5-10 мин после прекращения ферментативной реакции, о котором судят по установившейся величине оптической плотности, измеряют величину A₂.

11. Содержание пировиноградной кислоты (мкмоль/г) рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{\Delta A \times V \times k}{6,22} \left(\frac{\text{мкмоль}}{\text{г ткани}} \right),$$

где ΔA – изменение оптической плотности пробы в ходе ферментативной реакции восстановления пирувата, ΔA=(A₁-A₂), V – конечный объем пробы в кювете; 6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции восстановленной формы пиридина нуклеотидов при длине волны 340 нм и кювете шириной 1 см; k – коэффициент разведения по отношению к 1 г ткани.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Гликолиз, последовательность реакций, биологическое значение.
2. Нарисуйте схему метаболических путей превращения пировиноградной кислоты.
3. Опишите принципы определения метаболитов гликолиза.
4. Объясните понятие коэффициента молярной экстинкции.
5. Каково диагностическое значение определения пировиноградной кислоты в тканях?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Количественное определение молочной кислоты в тканях животных ферментативным методом

Цель работы: определить количество молочной кислоты в тканях животных.

Задачи работы:

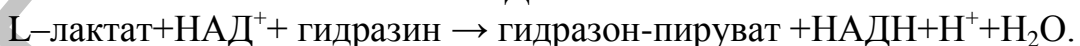
1. Приготовить растворы субстратов и ферментов.
2. Получить экстракт ткани и определить количество молочной кислоты в тканях животных.

Анаэробный распад углеводов (гликолиз) в тканях животных завершается образованием молочной кислоты (лактата), по количеству которой судят об интенсивности гликолитических процессов. В тканях животных молочная кислота играет особую роль в связи с тем, что этот субстрат представляет собой своеобразный метаболический тупик: действительно, основным путем обмена лактата является легко обратимая лактатдегидрогеназная реакция. Скорость других реакций образования или использования молочной кислоты несравненно ниже, чем скорость взаимопревращения лактата и пирувата. Таким образом, лактат можно рассматривать как определенный тканевый резерв активно метаболизирующего пирувата. Обратимость лактатдегидрогеназной реакции и высокая активность фермента позволяют паре субстратов лактат–пируват играть важную роль в контроле над отношением окисленных и восстановленных форм НАД⁺/НАДН. Рядом авторов предложены способы расчета отношения НАД⁺/НАДН в цитоплазматическом компартменте клетки с использованием результатов по содержанию лактата и пирувата в ткани.

Для определения количества молочной кислоты в тканях животных и биологических жидкостях существует несколько методов. В лабораторной практике широко применяется колориметрический метод Баркера и Саммерсона, однако более простыми, чувствительными и быстрыми являются ферментативные методы, например метод Хохорста [1970].

Принцип метода. В присутствии лактатдегидрогеназы (ЛДГ) молочная кислота переходит в пировиноградную кислоту, причем связывание образующегося и ходе реакции пирувата гидразин-глициновым буфером способствует полному окислению лактата:

ЛДГ



Образование восстановленной формы НАД, эквимолярное количеству окисленного лактата, регистрируют спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Средства измерений, оборудование:

Весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр

Реактивы:

1. **0,6 М хлорная кислота** (м.м. 100,46 г/моль; $\rho=1,67$ г/моль): 3,6 см³ хлорной кислоты добавляют в колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

2. **5 М карбонат калия** (м.м. 138,2 г/моль): 6,9 г карбоната калия, переносят в мерную пробирку объемом 10 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

3. **0,2 М гидроксид натрия** (м.м. 40 г/моль): 0,4 г гидроксида натрия растворяют в дистиллированной воде, переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и доводят дистиллированной водой до метки.

4. **Гидразин-глициновый буфер, рН= 9,5**(0,4 М раствор гидразина, 1 М раствор глицина; м.м. гидразина 32,01 г/моль, м.м. глицина 75,05 г/моль): растворяют 0,32 г гидразина и 1,88 г глицина в небольшом количестве воды (≈ 10 см³), доводят рН смеси 0,2 М раствором NaOH до 9,5, раствор переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³ и доливают дистиллированной водой до метки.

5. **0,5 М трис-буфер, содержащий ЭДТА 0,005 М, рН=7,6** (м.м. трис 121,14 г/моль, м.м. ЭДТА 292,24 г/моль): 6,05 г триса и 0,146 г ЭДТА растворяют в 25 см³ воды. Доводят рН до 7,6 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты. Раствор количественно переносят в колбу вместимостью 100 см³ и доводят водой дистиллированной до метки.

6. **0,005 М НАД** (м.м. 685,4 г/моль): 0,031 г НАД растворяют в 10 см³ трис-буфера (готовят непосредственно перед использованием).

7. **Лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27)**: хранящийся в холодильнике препарат фермента перед использованием разводят дистиллированной водой так, чтобы в 0,05 см³ содержалось 0,3-0,4 Ед фермента.

Порядок выполнения работы

1. Навеску ткани (200 мг) гомогенизируют при 4°C с 0,8 см³ 0,6 М HClO₄ (гомогенат 1:4).

2. Полученный гомогенат переливают в центрифужные пробирки и оставляют во льду на 15 мин для более полной экстракции.

3. Осажденные белки ткани отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 4500 об/мин.

4. Безбелковую надосадочную жидкость переносят в центрифужную пробирку и удаляют избыток хлорной кислоты, добавляя 0,1 см³ 5 М раствора K₂CO₃ (из расчета 0,05 см³ на 1 см³ пробы).

5. Пробу перемешивают и помещают на 10 мин на лед до прекращения выделения углекислого газа и полного осаждения перхлората калия.

6. Осадок перхлората калия отделяют фильтрованием или центрифугированием в течение 5 мин при 3000 g.

7. Для проведения ферментативной реакции используют 0,2 см³ нейтрализованного тканевого экстракта, предварительно нагретого до комнатной температуры.

8. В кювету спектрофотометра (1 см) наливают 2,2 см³ инкубационной среды (2,0 см³ гидразин–глициновый буфер и 0,2 см³ раствора НАД⁺), добавляют 0,2 см³ нейтрализованного тканевого экстракта и измеряют исходную величину оптической плотности (A₁) при длине волны 340 нм.

9. Затем в кювету вносят 0,05 см³ лактатдегидрогеназы, перемешивают и после окончания ферментативной реакции измеряют конечное значение оптической плотности (A₂). Об окончании реакции судят по прекращению нарастания оптической плотности пробы. Обычно время протекания реакции составляет 20-30 минут и зависит от активности использованного препарата лактатдегидрогеназы.

10. Для внесения поправки на изменение оптической плотности, связанное с добавлением ферментативного препарата, в контрольную пробу вместо 0,2 см³ тканевого экстракта вносят 0,2 см³ воды и проводят аналогичные измерения (A_к).

11. Содержание лактата (мкмоль/г) рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{\Delta A \times V \times k}{6,22} \left(\frac{\text{мкмоль}}{\text{г ткани}} \right),$$

где ΔA – изменение оптической плотности пробы в ходе ферментативной реакции восстановления пирувата, которое рассчитывается по формуле ΔA=(A₂-A₁) – A_к; V – конечный объем пробы и кювете; 6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции восстановленной формы пиридиннуклеотидов при длине волны 340 нм и кювете шириной 1 см; k – коэффициент разведения.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Анаэробный распад глюкозы, последовательность реакций, ферменты, биологическое значение.
2. Цикл Кори. Диагностическое значение определения мочевой кислоты в сыворотке крови. При каких ситуациях в крови изменяется концентрация мочевой кислоты?
3. Опишите другие методы определения мочевой кислоты в тканях и биологических жидкостях.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Определение активности гексокиназы в тканях животных

Цель работы: определить активность гексокиназы в тканях животных.

Задачи работы:

1. Приготовить гомогенат ткани, растворы субстратов и ферментов.
2. Определить активность гексокиназы в тканях животных.

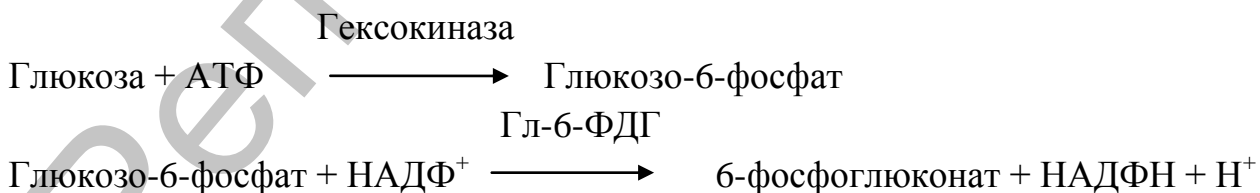
Активность фермента, как правило, выражают через количество субстрата, превращаемого этим ферментом в единицу времени. За единицу активности (Е) любого фермента принимают его количество, которое катализирует

превращение 1 мкмоль субстрата в минуту при оптимальных условиях определения: обычно при температуре 25° и оптимальных рН среды, концентрации субстрата и других составных частей реакционной смеси. Активность фермента в тканях выражают в Е/мг белка или на 1 мг (г) сырого или сухого веса ткани, или же на число клеток.

Большинство методов определения активности ферментов гликолиза основаны на спектрофотометрическом определении продуктов ферментативной реакции. Нужно отметить, что спектрофотометрические методы используют не только тогда, когда продукт реакции имеет поглощение в УФ - спектре. В этом случае определение продукта проводят путем использования его как субстрата других ферментативных реакций путем добавления вспомогательных ферментов и никотинамидных нуклеотидов (НАДН или НАДФН). Изменение оптической плотности при 340 нм, обусловленное переходом этих нуклеотидов в окисленную или восстановленную форму, отражает изменение количества определяемого вещества.

Гексокиназная реакция обеспечивает фосфорилирование глюкозы. Для протекания реакции необходимо наличие в среде ионов Mg^{2+} , с которым комплексно связывается молекула АТФ. Эта реакция необратима и является первой ключевой реакцией гликолиза. Фосфорилирование глюкозы преследует две цели: во-первых, из-за того что плазматическая мембрана, проницаемая для нейтральной молекулы глюкозы, не пропускает отрицательно заряженные молекулы глюкозо-6-фосфата, фосфорилированная глюкоза оказывается локализованной внутри клетки. Во-вторых, при фосфорилировании глюкоза переводится в активную форму, способную участвовать в биохимических реакциях и включаться в метаболические циклы.

Активность фермента определяют по скорости образования глюкозо-6-фосфата, который при помощи вспомогательного фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Гл-6-ФДГ) окисляется в 6-фосфоглюконат с одновременным восстановлением НАДФ, что сопровождается увеличением оптической плотности при 340 нм.



Средства измерений, оборудование:

Весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр

Реактивы:

1. 0,25 М раствор сахарозы, содержащий Трис-НСl 0,005 М (рН = 7,5) (м.м. сахарозы 342,5 г/моль, м.м. триса 121,14 г/моль).

1.1. 0,061 г триса переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют ≈ 25 см³ дистиллированной воды, доводят рН до 7,5 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объем до метки дистиллированной водой.

1.2. 8,56 г сахарозы переносят в колбу вместимостью 100 см³, добавляют 0,005 М Трис-НСl до метки.

2. 0,2 М трис-НСl буфер, рН = 7,6 (м.м. триса 121,14 г/моль): 2,43 г триса растворяют в дистиллированной воде, доводят рН до 7,6 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объем в колбе вместимостью 100 см³ до метки дистиллированной водой.

3. 0,06 М раствор АТФ (м.м. АТФ 551,15 г/моль): 0,33 г АТФ растворяют в 10 см³ 0,2 М трис-НСl. Нейтрализуют 30% раствором гидроксида натрия.

4. 0,1 М раствор MgCl₂·6H₂O (м.м. 303,3 г/моль): 0,5 г хлорида магния гидрата переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³ и доводят дистиллированной водой до метки.

5. 0,005 М раствор глюкозы (м.м. 180 г/моль): 0,010 г глюкозы растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

6. 0,005 М раствор НАДФ (м.м. 859,47 г/моль): 0,043 г НАДФ растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

7. Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (Г-6-Ф-ДГ): хранящийся в холодильнике препарат фермента перед использованием разводят дистиллированной водой так, чтобы в 0,1 см³ содержалось 0,3-0,4 Е фермента.

Порядок выполнения работы

1. Навеску ткани (200 мг) гомогенизируют при 4°С с 1,8 см³ среды для гомогенизации (гомогенат 1:9).

2. Гомогенат центрифугируют при 10 000 об/мин 10 мин (температура 4°С).

3. В химические пробирки добавляют реактивы, указанные в таблице.

Реактивы, см ³	Опыт	Контроль
Трис-НСl, 0,2 М, рН 7,6	1,2	1,2
H ₂ O	0,4	1,0
MgCl ₂ , 0,1 М	0,3	0,3
НАДФ, 0,005 М	0,3	0,3
АТФ, 0,06 М	0,3	-
Глюкоза, 0,005 М	0,3	-
Г-6-Ф-ДГ	0,1	0,1

4. Пробы перемешивают и устанавливают «нуль» спектрофотометра против контрольной пробы.

5. Реакцию в опытной пробе начинают добавлением 0,1 см³ тканевого экстракта. Скорость реакции должна составлять 0,03-0,08 ед. опт. плотности в минуту. Отсчеты рекомендуется делать через 1 мин. Длительность определе-

ния зависит от активности фермента и пропорциональности скорости реакции во времени.

6. Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{\Delta A \times V \times k \times 60}{6,22} \text{ (мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}\text{)},$$

где: ΔA – среднее значение изменения оптической плотности за 1 минуту; V – конечный объем пробы и кювете; 6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции НАДН при длине волны 340 нм и кювете шириной 1 см; k – коэффициент разведения ткани.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Назовите единицы измерения активности ферментов.
2. Напишите реакцию, катализируемую гексокиназой.
3. Сравните активность гексокиназы в исследуемых тканях.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

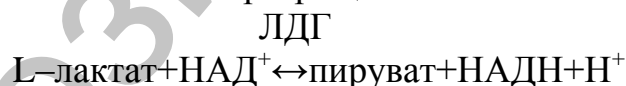
Определение активности лактатдегидрогеназы

Цель работы: определить активность лактатдегидрогеназы в тканях животных.

Задачи работы:

1. Приготовить гомогенат ткани, растворы субстратов и ферментов.
2. Определить активность лактатдегидрогеназы.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (L-лактат НАД оксидоредуктаза, КФ1.1.1.27) относится к числу наиболее активных ферментов, осуществляющих окислительно-восстановительные превращения. Она катализирует реакцию:



При значениях рН, близких к нейтральным, равновесие реакции сдвинуто в сторону образования молочной кислоты и НАД^+ . ЛДГ – тетрамер, состоящий из 2 типов неидентичных субъединиц (Н– и М–типа). Разные сочетания субъединиц объясняют существование 5 изоферментов, отличающихся по свойствам и по величине K_m для субстратов. Изоферментный спектр ЛДГ в разных тканях различен, соотношение отдельных изоферментов может изменяться при экспериментальных воздействиях и патологии. ЛДГ локализована преимущественно в цитоплазматической фракции, однако, в ряде тканей фермент обнаружен и на внешней мембране митохондрий.

Существует несколько методов определения активности лактатдегидрогеназы, основанных как на использовании естественных, так и искусственных акцепторов водорода. Основу данного определения составляет метод Бергмейера и соавт. (1965).

Принцип метода. Активность лактатдегидрогеназы оценивается по скорости окисления НАДН (уравнение приведено выше), которая регистрируется спектрофотометрически по убыли величины оптической плотности при длине волны 340 нм.

Средства измерений, оборудование:

Весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр.

Реактивы:

1. **0,25 М раствор сахарозы, содержащий 1 мМ ЭДТА (рН 7,4)** (м.м. сахарозы 342,5 г/моль, м.м. ЭДТА 292,24 г/моль): 8,6 г сахарозы, 0,029 г ЭДТА растворяют в 50 см³ дистиллированной воды. Доводят рН до 7,4. Раствор переносят в мерную колбу объемом 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

2. **0,02 М Трис-НСI буфер** (м.м. триса 121,14 г/моль): 0,24 г триса растворяют в 25 см³ дистиллированной воды. Доводят рН до 7,6 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты. Раствор переносят в мерную колбу объемом 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

*0,02 М трис-НСI буфер можно приготовить из 0,2 М трис-НСIбуфера путем его разведения в 10 раз.

3. **0,06 М раствор пирувата натрия** (м.м. пирувата натрия 110,04 г/моль): 0,066 г пирувата натрия растворяют в 10 см³ 0,02 М трис-буфера.

4. **0,005 М раствор НАДН**, (м.м. 663,46 г/моль): 0,033 г НАДН растворяют в 10 см³ трис-буфера (готовят непосредственно перед использованием).

Порядок выполнения работы

1. Навеску ткани печени (200 мг) гомогенизируют при температуре 4 °С с 1,8 см³ охлажденной средой выделения: 0,25 М раствор сахарозы, содержащий 1 мМ ЭДТА рН 7,4.

2. Полученный гомогенат центрифугируют 15 минут при 10000 об/мин, в супернатанте определяют активность фермента. Центрифугат разводят в 5 раз.

3. В кювету спектрофотометра вносят все реактивы, указанные в таблице.

Реактивы, см ³	Опыт	Контроль
Трис-НСI, 0,02 М, рН 7,5	2,85	2,85
Пируват натрия, 0,06 М	0,05	0,05
H ₂ O	-	0,10
НАДН, 0,005М	0,05	0,05

4. Измерение проводят при температуре 37°С против контрольной пробы.

5. В опытную пробирку добавляют 0,1 см³ центрифугата, быстро перемешивают и измеряют исходную величину оптической плотности (A₁). Измерение повторяют через 1 и 2 мин и рассчитывают ΔA/мин.

Лактатдегидрогеназа – очень активный фермент, поэтому предварительно необходимо подобрать соответствующее разведение анализируемых

образцов (30–50 раз). Оптимальное разведение препарата такое, при котором ΔA /мин при длине волны 340 нм составляет 0,040 – 0,080.

6. Активность лактатдегидрогеназы рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{\Delta A \times V \times k \times 60}{6,22 \times a} \text{ (мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}\text{)},$$

где ΔA – среднее значение изменения оптической плотности за 1 минуту; V – конечный объем пробы и кюветы; 6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции НАДН при длине волны 340 нм и кювете шириной 1 см; k – коэффициент разведения ткани, a – содержание белка в пробе, определенное в параллельном образце методом Лоури или другим, мг (принять равным 220 мг/г ткани).

Описанный метод определения активности лактатдегидрогеназы высокоспецифичен, прост, дает хорошо воспроизводимые результаты и может быть использован при анализе активности фермента в различных тканевых препаратах и биологических жидкостях.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Напишите реакцию, катализируемую лактатдегидрогеназой и назовите его кофермент.
2. В каких условиях происходит образование молочной кислоты и какое это имеет значение?
3. Какое значение имеет определение изоферментных форм лактатдегидрогеназы в сыворотке крови? В каких тканях локализуются различные изоферменты лактатдегидрогеназы?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

Исследование активности альдолазы в тканях

Цель работы: определить активность альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата.

Задачи работы:

1. Приготовить гомогенат ткани и растворы субстратов.
2. Определить активность альдолазы.
3. Ознакомиться с принципом определения активности ферментов по увеличению количества образующегося продукта.

Фермент, альдолаза фруктозо-1,6-бисфосфат катализирует расщепление фруктозо-1,6-бисфосфата в дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат в процессе гликолиза. Фермент играет важнейшую роль в энергетическом обмене.

Альдолаза

Фруктозо-1,6-бисфосфат \leftrightarrow диоксиацетонфосфат + глицеральдегид-3-фосфат

Принцип метода. В качестве унифицированного метода определения альдозазы принят метод Товарницкого-Валуйской, основанный на том, что продукты расщепления фруктозо-1,6-бисфосфата альдозазой при реакции с 2,4-фенилгидразином образуют гидразоны, окрашенные в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.

Средства измерений, оборудование:

Весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр

Реактивы:

1. 0,25 М раствор сахарозы, содержащий 0,005 М Трис-НСl (рН = 7,5) (м.м. сахарозы 342,5 г/моль).

1.1. 0,061 г триса растворяют в 50 см³ дистиллированной воды. Доводят рН до 7,5 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и объем доводят до метки дистиллированной водой.

1.2. 8,56 г сахарозы переносят в колбу вместимостью 100 см³, добавляют 0,005 М Трис-НСl до метки.

2. 0,5% раствор бикарбоната натрия: 0,5 г бикарбоната натрия растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

3. 10% раствор ТХУ: 10 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

4. 3% раствор гидроксида натрия: 3 г гидроксида натрия растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

5. 0,56 М раствор гидразинсульфата (м.м. 130 г/моль): 1,82 г гидразинсульфата растворяют в 20 см³ раствора гидроксида натрия, доводят рН до 7,4; количественно переносят в мерную колбу объемом 25 см³ и доливают дистиллированной водой до метки.

6. 0,5 М раствор фторида натрия (м.м. 41,98 г/моль): 0,2 г фторида натрия, переносят в мерную пробирку и растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

7. 0,005 М раствор НАДФ (м.м. 744,4 г/моль): 0,037 г НАДФ, переносят в мерную пробирку и растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

8. 0,56 М раствор динитрофенилгидразина: 0,03 г 2,4-ДНФГ растворяют в 20 см³ 2 М НСl.

9. 1 М раствор сульфата натрия (м.м. 142 г/моль): 0,71 г сульфата натрия растворить в 5 см³ дистиллированной воды.

10. 0,1 М раствор фруктозо-1,6-бисфосфата (м.м. 378 г/моль): к 0,189 г Ф-1,6-БФ и добавляют 1,5 см³ 1 М раствора НСl до получения почти прозрачного раствора. Приливают 0,5 см³ 1 М раствора сульфата натрия. Центрифугируют 10 мин при 1,5-2 об/мин, к центрифугату добавляют еще несколько капель раствора сульфата натрия. Доводят рН до 7,2 с помощью 1 М раствора NaOH. Центрифугируют и доводят объем до 5 см³.

Порядок выполнения работы

1. Навеску ткани (200 мг) гомогенизируют при 4°C с 1,8 см³ среды для гомогенизации (гомогенат 1:9).

2. Готовят инкубационную смесь, рассчитав объем необходимых реактивов, учитывая количество проб. Объем реактивов для 1 пробы указан в таблице.

Таблица 1 – Объем реактивов, необходимых для приготовления инкубационной среды для 1 пробы

Реактивы	см ³
Бикарбонат натрия, 0,5%	0,5
Гидразинсульфат, 0,56 М	0,1
Натрия фторид, 0,5 М	0,1
H ₂ O	0,1
Ф-1,6-бисфосфат, 0,1М	0,1
Общий объем смеси	0,9

3. В пробирки добавляют реактивы, указанные в таблице.

Таблица – Схема проведения опыта

	Опыт	Контроль
Инкубационная смесь	0,9	0,9
Гомогенат	0,1 (или 0,5 см ³ сыворотки)	-
ТХУ, 10%	-	1,5
Гомогенат	-	0,1 (или 0,5 см ³ сыворотки)
Инкубация 1 час 37-38°C		
ТХУ, 10%	1,5	-
Центрифугирование 10 мин 1500-2000 об/мин		
Центрифугат	0,5	0,5
NaOH, 3%	0,5	0,5
Инкубация 10 мин при комнатной температуре		
2,4-ДНФГ, 0,56 М	0,5	0,5
Инкубация 10 мин при 37°C		
NaOH, 3%	3,0	3,0
Измерение оптической плотности через 15 мин при 540 нм против воды		

4. Активность альдолазы можно выражать в условных единицах оптической плотности (A_1-A_2), умноженных на 100 (при модификации В.И. Товарницкого и Е. Н. Валуйской), или в количестве микромолей субстрата, расщепленного 1 г ткани при t° 37° за единицу времени – 1 час или 1 мин (метод Брунса).

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. В каких метаболических путях участвует фермент альдолаза фруктозо-1,6-бисфосфата?
2. Какой принцип лежит в основе определения альдолазы?
3. Какую роль играет фторид натрия в данном методе определения?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

Определение активности пируватдегидрогеназы

Цель работы: определить активность пируватдегидрогеназы в тканях животных.

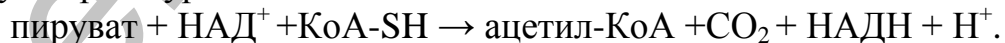
Задачи работы:

1. Приготовить гомогенат ткани и растворы субстратов.
2. Определить активность пируватдегидрогеназы.

Окончательная судьба пирувата и НАДН, образованных в процессе гликолиза, зависит от вида организма и условий внутри клетки, в особенности от наличия или отсутствия кислорода или других акцепторов электронов. У анаэробных организмов пируват и НАДН далее подвергаются брожению. При молочнокислом брожении, например, у бактерий, пируват под действием фермента лактатдегидрогеназы восстанавливается в молочную кислоту. У дрожжей сходным процессом является спиртовое брожение, где конечными продуктами будут этанол и углекислый газ. Известно также маслянокислое и лимоннокислое брожение. У аэробов пируват, как правило, подвергается окислительному декарбосилированию и образовавшийся ацетил-КоА попадает в цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса), а НАДН в итоге окисляется кислородом в дыхательной цепи митохондрий в процессе окислительного фосфорилирования. Несмотря на то, что метаболизм человека преимущественно аэробный, в интенсивно работающих скелетных мышцах наблюдается анаэробное окисление. В условиях ограниченного доступа кислорода пирувиноградная кислота (ПВК) превращается в молочную кислоту (лактат), как происходит при молочнокислом брожении у многих микроорганизмов. Пируватдегидрогеназный комплекс катализирует окислительное декарбосилирование пирувата, который образуется из глюкозы при гликолизе, с образованием ацетил-КоА. Эта реакция является этапом общего пути катаболизма.

Принцип метода. Реакции окислительного превращения пирувата с образованием ацетил-КоА, CO_2 , НАДН катализирует полиферментный комплекс, имеющий 5 коферментов – ТПФ, КоА, липоевая кислота, НАД^+ , ФАД.

Суммарное уравнение имеет вид:



Активность пируватдегидрогеназы определяется с использованием искусственного акцептора электронов – феррицианида калия. В процессе окисления субстрата происходит восстановление феррицианида, который обесцвечивается. Метод может быть использован для определения скорости окисления не только пирувата, но и 2-оксоглутарата.

Средства измерений, оборудование:

Весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр

Реактивы:

1. 0,25 М раствор сахарозы, содержащий 0,005 М Трис-НСl (рН = 7,5) (м.м. сахарозы 342,5 г/моль).

1.1. 0,061 г триса растворяют в 50 см³ дистиллированной воды. Доводят рН до 7,5 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и объем доводят до метки дистиллированной водой.

1.2. 8,56 г сахарозы переносят в колбу вместимостью 100 см³, добавляют 0,005 М Трис-НСl до метки.

2. 0,15 М калий-фосфатный буфер, рН=7,4.

2.1. 1,18 г гидрофосфата натрия (Na₂HPO₄, 0,0667 М) переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют и доводят объем до метки дистиллированной водой.

2.2. 0,91 г дигидрофосфата калия (KH₂PO₄, 0,0667 М) переносят в колбу вместимостью 100 см³, растворяют и доводят объем до метки дистиллированной водой.

2.3. В мерную колбу вместимостью 100 см³ добавляют 81,0 см³ гидрофосфата натрия и доводят до метки дигидрофосфатом калия.

3. 0,2 М раствор сульфата магния, (м.м. 120,36 г/моль): 0,24 г сульфата магния растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

4. 0,02 М раствор ЭДТА (м.м. 292,24 г/моль): 0,058 г ЭДТА растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

5. 0,06 М раствор АТФ (м.м. 507 г/моль): 0,152 г АТФ и растворяют в 5 см³ дистиллированной воды (готовят перед выполнением исследования).

6. 0,4 М раствор пирувата натрия, (м.м. 88,06 г/моль): 0,352 г пирувата натрия растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

7. 0,0067 М раствор феррицианида калия (K₃[Fe(CN)₆] м.м. 329,25 г/моль) (готовят перед выполнением исследования): 0,02 г феррицианида калия растворяют в 9,2 см³ дистиллированной воды.

8. 10% раствор ТХУ: 1 г ТХУ растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

9. 50% раствор ТХУ: 5 г ТХУ растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

Порядок выполнения работы

1. 200 мг ткани гомогенизируют на холоду в 0,25 М растворе сахарозы (разведение 1:10).

2. Приготовление инкубационной смеси:

Реактивы	Инкубационная смесь (объем, см ³)	
	Опыт	Контроль
Калий-фосфатный буфер, 0,15М	0,5 мл	0,5 мл
Сахароза, 0,25М	1,7 мл	1,7 мл
ЭДТА, 0,02 М	0,1 мл	0,1 мл
MgSO ₄ , 0,2 М	0,1 мл	0,1 мл

АТФ, 0,06М	0,1 мл	0,1 мл
Пируват натрия, 0,4М	0,1 мл	-
Сахароза, 0,25М	-	0,1
Феррицианид калия, 0,0067 М	0,7 мл	0,7 мл
Объем смеси	3,3 мл	3,3 мл

3. Добавление гомогената

Инкубационная смесь	3,3 мл	3,3 мл
Гомогенат	0,4 мл	0,4 мл
Инкубировать $t = 37^{\circ}\text{C}$ 30 мин		
50% ТХУ	0,3 мл	0,3 мл
Центрифугирование 15 мин при 1500 об/мин		
Измерение оптической плотности при длине волны 417 нм		

Разница между экстинкцией контроля (без субстрата) и опыта соответствует количеству восстановленного феррицианида калия, что эквивалентно количеству окисленного пирувата в пробе. Количество восстановленного феррицианида определяют по градуировочному графику.

4. Построение градуировочного графика.

Для получения основного раствора 0,02 г феррицианида калия растворяют в 9,2 см³ дистиллированной воды. В основном растворе содержится 4,66 мкмоль $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Для построения градуировочного графика готовят серию стандартных растворов.

№ градуировочного раствора	Маточный раствор, см ³	Дистиллированная вода, см ³	Содержание феррицианида, мкмоль
1	1	1	2,33
2	1	2	1,553
3	1	3	1,165
4	1	4	0,932
5	1	5	0,776
6	1	6	0,665
7	1	7	0,582

Строят график зависимости оптической плотности от содержания феррицианида калия. Используя уравнение градуировочной зависимости, определяют содержание феррицианида калия в пробе.

В 7 химических пробирок добавляют: по 3,3 см³ инкубационной среды, 0,7 см³ соответствующего градуировочного раствора, 0,4 см³ раствора сахарозы (вместо гомогената) и 0,3 см³ 50% ТХУ. Пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность длине волны 417 нм против воды.

5. Активность пируватдегидрогеназы (нмоль $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ /мг белка/мин) рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(C1 - C2) \times k \times 1000}{a \times 15},$$

где C1 – содержание феррицианида (мкмоль) в контрольной пробе; C2 – содержание феррицианида (мкмоль) в опытной пробе; 1000 – коэффициент перевода мкмоль в нмоль; k – коэффициент разведения; a – содержание белка в пробе; 15 – время инкубации пробы (мин).

*Для расчета условно считаем содержание белка 200 мг/г ткани.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Напишите химизм окислительного декарбоксилирования пирувата.
2. Какой принцип лежит в основе определения активности пируватдегидрогеназы ?
3. Объясните, почему для построения градуировочного графика добавляется указанное количество реактивов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

Исследование ионного состава воды

методом капиллярного электрофореза

Цель работы: определить содержание ионов в воде методом капиллярного электрофореза.

Задачи работы:

1. Изучить метод капиллярного электрофореза.
2. Приготовить растворы для капиллярного электрофореза.
3. Определить содержание катионов в воде методом капиллярного электрофореза.

Характеристика метода капиллярного электрофореза

Метод капиллярного электрофореза основан на **разделении заряженных компонентов** сложной смеси в **кварцевом капилляре** под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора (~2 нл) вводят в кварцевый капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером – электролитом. После подачи высокого напряжения (до 30 кВ) к концам капилляра компоненты смеси начинают двигаться с разной скоростью, зависящей, в первую очередь, от заряда и массы (точнее, величины ионного радиуса) и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования. Полученная последовательность пиков называется электрофореграммой; качественной характеристикой вещества является время миграции, а количественной – высота или площадь пика, пропорциональная концентрации вещества.

Метод капиллярного электрофореза характеризуется высочайшей эффективностью.

В приборах для капиллярного электрофореза капилляр, заполненный раствором электролита, своими концами опущен в два содержащих тот же

электролит сосуда, в которые введены электроды. Электролит должен обладать буферными свойствами, чтобы, с одной стороны, воспрепятствовать изменению состава раствора в приэлектродных пространствах, а с другой – стабилизировать состояние компонентов пробы в процессе анализа. При подаче на электроды высокого напряжения в капилляре быстро устанавливается стационарное состояние: через капилляр протекает постоянный электроосмотический поток, на который накладывается взаимно противоположная электромиграция катионов и анионов.

Если в капилляр со стороны анода ввести небольшой объем раствора пробы, то электроосмотический поток (ЭОП) будет переносить эту зону к катоду (в область детектирования), и зона некоторое время сможет находиться в капилляре под воздействием электрического поля высокого напряжения. В течение этого времени заряженные компоненты пробы будут перемещаться в соответствии с их электрофоретическими подвижностями.

Катионные компоненты пробы, двигаясь к катоду, будут обгонять электроосмотический поток (рисунок 1). Скорость их движения складывается из скорости ЭОП и скорости электромиграции, поэтому на выходе капилляра катионы появляются первыми и тем раньше, чем больше их электрофоретическая подвижность.

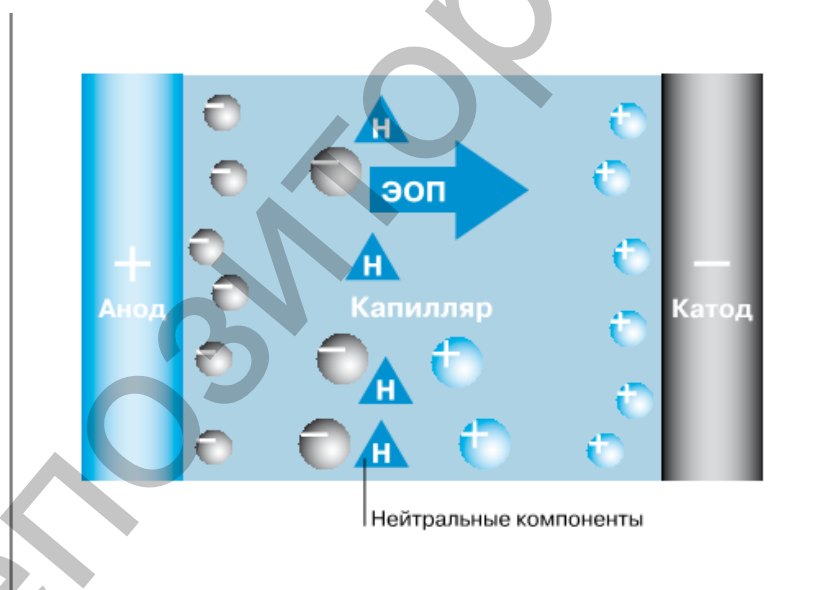


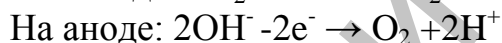
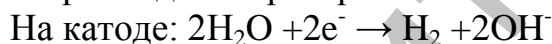
Рисунок 1– Влияние профиля потока на ширину зоны вещества

Нейтральные компоненты пробы способны перемещаться только под действием электроосмотического потока, тогда как анионные будут перемещаться к аноду со скоростями меньшими, чем скорость ЭОП. Медленно мигрирующие анионы появятся на выходе после ЭОП, а те, чья скорость электромиграции по абсолютной величине превышает скорость ЭОП, будут выходить из капилляра в прианодное пространство.

Если время нахождения пробы в капилляре (которое можно регулировать изменением напряжения, величины рН и концентрации ведущего электролита) достаточно, чтобы проявились различия в подвижности ионов, то на выходе капилляра вблизи катода можно наблюдать зоны раствора, в которых находятся индивидуальные компоненты пробы.

Ведущий электролит (его называют также рабочим буферным раствором) должен иметь такую концентрацию, при которой **электрическое сопротивление раствора в капилляре будет достаточно велико**. Это требование связано с тем, что при прохождении электрического тока в проводнике выделяется тепло. Если ток достаточно велик, то жидкость в капилляре может даже закипеть. **Традиционно считается, что электрический ток в капилляре подчиняется закону Ома, хотя известно, что линейная связь тока и напряжения существует в растворе только в ограниченном диапазоне напряжений.**

В методе капиллярного электрофореза применяются **открытые системы** в том смысле, что раствор электролита, в котором происходит разделение, не отделен от электродов, на которые подается напряжение. В капиллярном электрофорезе стараются использовать такие составы буферных ведущих электролитов, в которых на электродах происходит разложение воды (одним из самых распространенных буферов для КЭ является раствор бора). На катоде происходит восстановление ионов водорода, выделение на поверхности катода молекулярного водорода и образование в прикатодном пространстве гидроксильных ионов. На аноде – окисление гидроксильных ионов, выделение на поверхности анода молекулярного кислорода и образование в прианодном пространстве ионов водорода.



При высоких разностях потенциалов, которые применяются в КЭ, на электродах могут протекать и другие параллельные электрохимические реакции, но приведённые выше являются основными.

Образующиеся и гидроксильные и водородные ионы нейтрализуются буферными компонентами ведущего электролита: при использовании боратного буфера в прикатодном слое борной кислотой, в прианодном – борат-ионом. Таким образом, в приэлектродных пространствах происходит лишь изменение мольного соотношения компонентов буферной смеси, приводящее лишь к незначительному изменению рН раствора.

На рисунке 2 показано типичное расположение капилляра и электрода в пробирке с раствором электролита, принятое в системах «Капель».

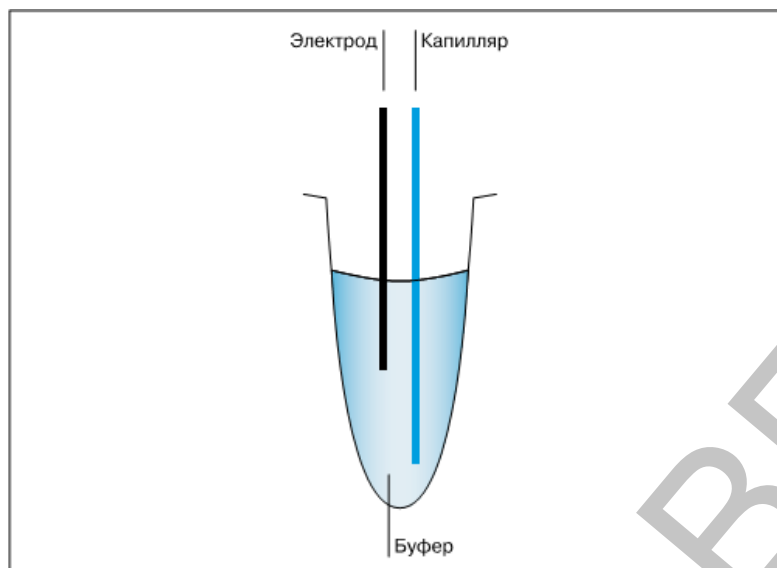


Рисунок 2 – Типичное расположение капилляра и электрода в пробирке

Устье капилляра располагается в нижней трети объёма пробирки; нижний срез электрода находится приблизительно на нижнем уровне верхней трети раствора. При таком расположении продукты электрохимических реакций, в частности, пузырьки газов, не могут проникнуть в просвет капилляра, также как и раствор ведущего электролита, содержащий продукты нейтрализации и отличающийся по составу от первоначального. В то же время расход ведущего электролита вследствие ЭОП происходит за счет неизменённого раствора из средней трети объёма. Сохранению описанного состояния способствует отсутствие перемешивания раствора в процессе анализа.

Для определения катионов ряда щелочных и щелочно-земельных металлов в водных объектах в приборе «Капель» используют источник высокого напряжения положительной полярности. Это так называемая классическая схема, которая подразумевает, что детектор находится вблизи катода и ЭОП движется от анода к катоду (рисунок 3).

В этом случае катионы будут двигаться к катоду в том же направлении, что и ЭОП, но быстрее него.

Чтобы зарегистрировать пики катионов, применяют косвенное детектирование: в состав ведущего электролита вводят поглощающий катион бензимидазола (БИА) в концентрации 0,01 М, которая обеспечивает необходимую оптическую плотность исходного раствора. При разделении катионы пробы эквивалентно замещают в растворе катион бензимидазолия, что приводит к снижению оптической плотности в зоне каждого катионного компонента.

В косвенном варианте детектирования электрофореграмма представляет собой базовую линию с отрицательными пиками. Для удобства визуализации и разметки электрофореграммы современные программы сбора и обработки данных имеют опцию «Перевернуть», что позволяет представить электрофореграмму в привычном виде (с «положительными» пиками).

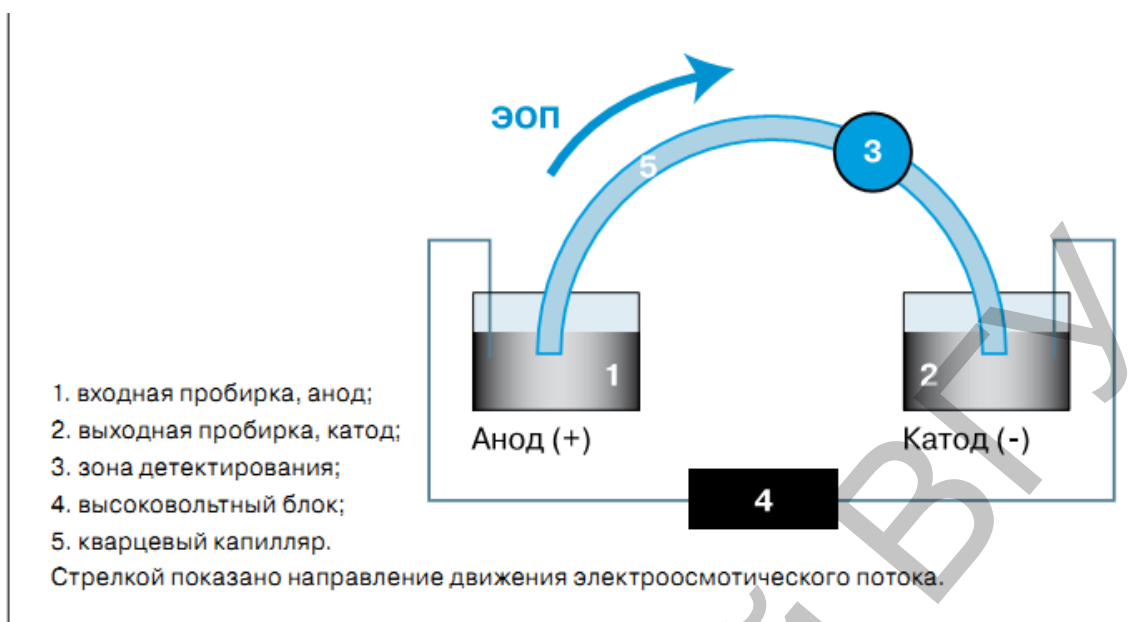


Рисунок 3 – Схема прибора для анализа неорганических катионов (с положительным высоковольтным блоком)

Бензимидазол в водном растворе является слабым основанием, pK_a которого равен 5,8. Это означает, что при pH 5,8 в растворе в равных концентрациях находятся молекулярная и катионная формы бензимидазола, а при pH 4,8 концентрация катионной формы в 10 раз превышает концентрацию формы молекулярной. Так как для эквивалентного обмена катионов необходимо, чтобы концентрация катионной формы БИА в электролите была как можно больше, электролит должен быть слабокислым. Однако в таком случае резко уменьшается скорость ЭОП, а также возрастает общая концентрация электролита, что приводит к возрастанию тока в капилляре. На практике ведущий электролит готовят на основе винной кислоты, анионы которой обладают малой подвижностью и, следовательно, увеличивают сопротивление электролита, а соотношение кислоты и основания подбирают так, чтобы достичь необходимого компромисса между временем анализа и величиной тока.

При электрофорезе катионы регистрируются в последовательности, которая определяется их электрофоретической подвижностью. **Первыми мигрируют пики аммония и калия.** Их электрофоретические подвижности одинаковы, поэтому они выходят одним общим пиком. Для разделения аммония и калия в состав ведущего электролита вводят специальную **добавку 18-краун-6**, являющегося макроциклом с гидрофильной внутренней полостью, размер которой очень близок размеру ионного радиуса иона калия.

После калия один за другим с хорошим разрешением мигрируют пики **натрия, лития, магния, стронция, бария и кальция.**

При анализе природных вод на электрофореграмме могут наблюдаться дополнительные пики, принадлежащие другим катионам, в частности, катио-

нам двухвалентных марганца и железа. Пик марганца выходит вслед за пиком стронция, а пик железа — после пика кальция.

Следует обратить внимание на частую необходимость разбавлять пробы перед анализом. Для разбавления используют ту воду – дистиллированную, бидистиллированную, деионизованную, на которой были приготовлены градуировочные растворы, рабочие буферы и промывочные растворы. Важно при этом знать катионный состав такой воды, так как от этого будет зависеть возможность и достоверность определения низких концентраций анализируемых катионов. Особенно это относится к иону аммония.

Средства измерений, оборудование:

Прибор для капиллярного электрофореза «Капель», центрифуга, весы

Реактивы:

1. 25 мМ раствор винной кислоты: 0,375 г винной кислоты переносят в мерную колбу объемом 50 см³, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки водой дистиллированной.

2. 10 мМ раствор 18-краун-6: 0,132 г 18-крауна-6 переносят в мерную колбу объемом 50 см³, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки водой дистиллированной.

3. 1 мМ раствор хлористоводородной кислоты: 8,3 см³ хлористоводородной кислоты помещают в мерную колбу емкостью 100 см³, доводят объем до метки дистиллированной и перемешивают.

4. 0,5 моль раствор гидроксида натрия: 2 г гидроксида натрия растворяют в 50-60 см³ воды дистиллированной, переносят в мерную колбу емкостью 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой.

5. 0,56 М раствор гидразинсульфата (м.м. 130 г/моль): 1,88 г гидразинсульфата растворяют в 20 см³ раствора гидроксида натрия, доводят рН до 7,4, количественно переносят в мерную колбу и доливают дистиллированной водой до метки.

6. Рабочий буферный раствор (ведущий электролит): в сухом сосуде смешивают 3 см³ раствора бензимидазола, 1 см³ раствора винной кислоты, 2 см³ раствора 18-крауна-6 и 4 см³ воды дистиллированной. Сразу после смешивания, раствор фильтруют через целлюлозно-ацетатный фильтр в сухой сосуд с завинчивающейся крышкой (виалку).

Порядок выполнения работы

Выполнение работы проводится с преподавателем в соответствии с инструкцией к прибору.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. На чем основан метод капиллярного электрофореза?
2. Опишите способы детектирования катионов.
3. Укажите последовательность выхода пиков катионов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

Измерение спектра поглощения рибофлавина. Проверка закона Бугера–Ламберта–Бера

Цель работы: изучение спектра поглощения рибофлавина и определение коэффициента молярной экстинкции.

Задачи работы:

1. Зарегистрировать спектр поглощения рибофлавина и определить максимумы поглощения.
2. Определить коэффициент молярной экстинкции ϵ при длине волны 445 нм.

Коэффициент молярной экстинкции – характеристика, которая показывает, насколько сильно химическое вещество поглощает свет на заданной длине волны. Коэффициент является неотъемлемым свойством данного вещества. В Международной системе единиц (СИ) единицей коэффициента молярной экстинкции является квадратный метр на моль ($\text{м}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$), но обычно используют размерность $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ или $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Для некоторых веществ значения коэффициента экстинкции хорошо известны, и при измерениях нужно только точно воспроизвести условия, в которых они были получены. Для других веществ необходимо рассчитывать молярный коэффициент экстинкции. Это можно сделать, взяв точную навеску и приготовив раствор вещества с известной концентрацией C_m . Рекомендуется снять спектр водного раствора с известной концентрацией вещества, а затем приступить к измерениям на длине волны, соответствующей одному из максимумов поглощения. Расчет коэффициента молярной экстинкции ведется по формуле Бугера–Ламберта–Бера.

Рибофлавин (витамин B_2) широко распространен в природе, содержится в бобовых, дрожжах, молоке, яичном желтке. Животные не способны синтезировать рибофлавин, и получают его с пищей, суточная потребность – 2–2,5 мг в сутки. Рибофлавин обладает характерным спектром поглощения с $\lambda = 450, 372, 268$ и 223 нм с $\epsilon = 12,3 \cdot 10^3, 10,8 \cdot 10^3, 31,4 \cdot 10^3$ и $30,1 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, соответственно (0,05 М NaOH).

Средства измерений, оборудование:

1. Спектрофотометр, дозаторы, весы.

Реактивы: 0,004 М маточный раствор рибофлавина в 0,05 М гидроксиде натрия (м.м. рибофлавина – 376,36 моль/л): 0,0075 г рибофлавина растворить в 5 см^3 0,05 М NaOH.

Порядок выполнения работы

1. Приготовление серии растворов рибофлавина различной концентрации из маточного раствора рибофлавина.

№ пробы	Концентрация рибофлавина, моль/л	Дистиллированная вода, см ³	Раствор рибофлавина, мкл	A ₄₅₀
1	0	2	0	
2	2·10 ⁻⁵	2	10	
3	4·10 ⁻⁵	2	20	
4	6·10 ⁻⁵	2	30	
5	8·10 ⁻⁵	2	40	
6	10 ⁻⁴	2	50	

2. Регистрируют спектр поглощения 0,004 М раствора рибофлавина в видимом диапазоне 300–500 нм, определяя оптическую плотность через каждые 10 нм. Строят график зависимости A (λ) – спектр поглощения.

3. Регистрируют оптическую плотность растворов рибофлавина различной концентрации в максимуме поглощения – при длине волны 450 нм. Данные вносят в таблицу.

4. Отображают график зависимости A = f(c) – график Бугера–Ламберта–Бера.

5. Определяют коэффициент молярной экстинкции ε при длине волны 445 нм.

$$A(\lambda) = \varepsilon \cdot l \cdot C_M,$$

где A (λ) – оптическая плотность (поглощение), нм; l – оптический путь, см; C_M – молярная концентрация вещества, выраженная в моль/л; ε – молярный коэффициент экстинкции, М⁻¹·см⁻¹;

отсюда

$$\varepsilon = A(\lambda) / l \cdot C_M$$

или

$$\varepsilon = A(\lambda) \cdot V_{p-ра} / l \cdot M_r \cdot m_{в-ва},$$

где A (λ) – оптическая плотность (поглощение), нм; l – оптический путь, см; M_r – молекулярная масса вещества, моль; m_{в-ва} – масса навески сухого вещества, г; V_{p-ра} – объем раствора, дм³.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Как определяется коэффициент молярной экстинкции?
2. Какое значение имеет знание коэффициента молярной экстинкции?
3. Как найти спектр поглощения вещества?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9

Количественное определение диеновых конъюгатов в животных тканях

Цель работы: определить концентрацию диеновых конъюгатов в печени и сыворотке крови животных.

Задачи работы:

1. Приготовить гомогенат исследуемой ткани.
2. Определить количественное содержание диеновых конъюгатов в ткани и сыворотки крови животных, используя коэффициент молярной экстинкции.

Принцип метода: образование сопряженных двойных связей в молекулах полиненасыщенных жирных кислот в ходе ПОЛ сопровождается появлением нового максимума в спектре поглощения в области 232–234 нм с плечом в области 260–280 нм.

Средства измерений, оборудование:

1. Весы, центрифуга, дозаторы, спектрофотометр.

Реактивы: 1) сыворотка крови; 2) н-гептан; 3) н-изопропиловый спирт; 4) этанол

Порядок выполнения работы

1. 300 мг печени гомогенизируют с 2,7 см³ смеси гептан: изопропанол (1:1) (гомогенат 1:9). Гомогенат переносят в стеклянные центрифужные пробирки и закрывают пробками. При определении диеновых конъюгатов в сыворотке крови к 0,3 см³ сыворотки крови добавляют 3 см³ смеси гептан: изопропанол.

2. Для экстракции диеновых конъюгатов пробирки встряхивают в течение 5 минут.

3. Центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин.

4. К 2,5 см³ супернатанта добавляют 0,25 см³ дистиллированной воды.

5. Пробирки встряхивают 2 раза.

6. К 0,5 см³ гептановой фазы добавляют 2,5 см³ этилового спирта.

7. Измеряют оптическую плотность при длине волны 233 нм в кювете 1 см против контроля, который готовят смешиванием 0,5 см³ гептана и 2,5 см³ этилового спирта.

8. Содержание диеновых конъюгатов в пробе рассчитывают, используя молярный коэффициент поглощения для сопряженных диенов полиненасыщенных жирных кислот при 233 нм.

$$C = \frac{A}{\varepsilon \times l} \times k \times 1000 \left(\frac{\text{мкмоль}}{\text{г}} \text{ткани} \right),$$

где A – оптическая плотность пробы; k – коэффициент разведения ткани; ε – коэффициент молярной экстинкции, равный $2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; l – длина кюветы, 1 см; 1000 – коэффициент для пересчета в мкмоль.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. В каком процессе образуются диеновые конъюгаты?
2. Почему для экстракции диеновых конъюгатов используются органические растворители?
3. Возможно ли использование данного коэффициента молярной экстинкции, если проводить измерение при другой длине волны?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10

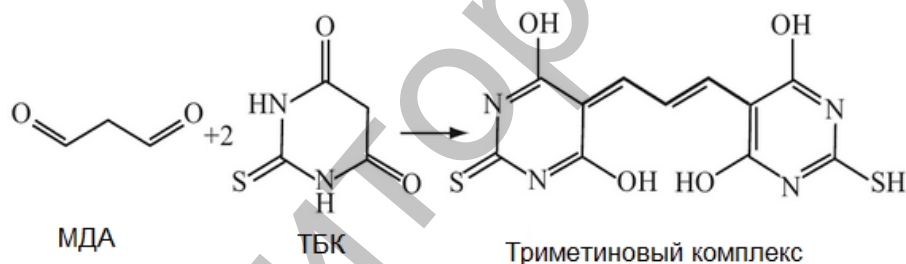
Определение содержания вторичных продуктов перекисного окисления липидов в животных тканях

Цель работы: определить концентрацию малонового диальдегида в животных тканях.

Задачи работы:

1. Приготовить гомогенат исследуемой ткани и необходимые реактивы.
2. Определить количественное содержание малонового диальдегида в ткани животных, используя коэффициент молярной экстинкции.

Принцип метода: в основе метода лежит реакция между малоновым диальдегидом (МДА) и другими низкомолекулярными диальдегидами, образующимися в результате разрушения эндопероксидов полиненасыщенных жирных кислот, и тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Реакция протекает при высокой температуре и кислом значении pH с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу диальдегида и две молекулы ТБК, с максимумом поглощения при 532 нм (соединения, реагирующие с ТБК – ТБКРС):



Метод применяется для определения скорости процессов ПОЛ.

Средства измерений, оборудование:

Весы, центрифуга, дозаторы, спектрофотометр

Реактивы:

1. 0,15 М раствор хлорида калия (м.м. = 74,55 г/моль): 0,28 г хлорида калия переносят в колбу вместимостью 25 см³, растворяют и доводят объем до метки дистиллированной водой.

2. 30% раствор ТХУ (м.м. = 163,4 г/моль): 3 г ТХУ растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

2. 0,8% раствор тиобарбитуровой кислоты (м.м. = 144,15 г/моль): 0,075 мг ТБК растворяют в 10 см³ дистиллированной воды. Раствор готовят непосредственно перед использованием и растворяют при нагревании в течение 2–3 мин в кипящей водяной бане.

Порядок выполнения работы

1. Навеску ткани (300 мг) измельчают в холодном 0,15М растворе КСl (соотношение масса ткани: объем раствора 1:9).

2. В химические пробирки добавляют реактивы в количествах, указанных в таблице:

Реактивы	Опыт	Контроль
Гомогенат, см ³	0,5	-
KCl, 0,15 М	0,5	1,0
ТХУ, 30%	1,0	1,0
ТБК, 0,8%	1,0	1,0

3. Пробы нагревают 20 мин в кипящей водяной бане.

4. После охлаждения пробы центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин

5. Интенсивность развившейся окраски измеряют на спектрофотометре при длине волны 532 нм в кювете 1 см против контрольной пробы.

6. Содержание с тиобарбитуровой кислотой реагирующих субстанций (ТБКРС) в ткани рассчитывают по формуле с использованием молярного коэффициента экстинкции $\epsilon_{532} = 1,56 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и выражают в нмоль/г ткани (г белка).

$$C = \frac{A \times V}{\epsilon \times l \times m_{\text{ткани}}} \times 1000 \text{ (нмоль/г)},$$

$$C = \frac{A \times V}{\epsilon \times l \times m_{\text{ткани}} \times C_{\text{белка}}} \times 1000 \text{ (нмоль/г белка)},$$

где A – оптическая плотность образца; V – конечный объем реакционной смеси, см³; l – длина кюветы, см; ϵ_{532} – коэффициент экстинкции $1,56 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; $m_{\text{ткани}}$ в реакционной смеси, г; $C_{\text{белка}}$ – концентрация белка, мг/г ткани; 1000 – коэффициент для пересчета на 1 г белка или 1 г ткани.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Опишите принцип определения малонового диальдегида в тканях.
2. Почему правильнее говорить «продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой», а не «малоновый диальдегид»?
3. При каких условиях увеличивается образование малонового диальдегида в организме? Какие факторы этому способствуют?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11

Количественное определение содержания восстановленного глутатиона в тканях

Цель работы: определить содержание восстановленного глутатиона в тканях.

Задачи работы:

1. Приготовить растворы, необходимые для количественного определения восстановленного глутатиона.
2. Построить градуировочный график для определения концентрации восстановленного глутатиона.

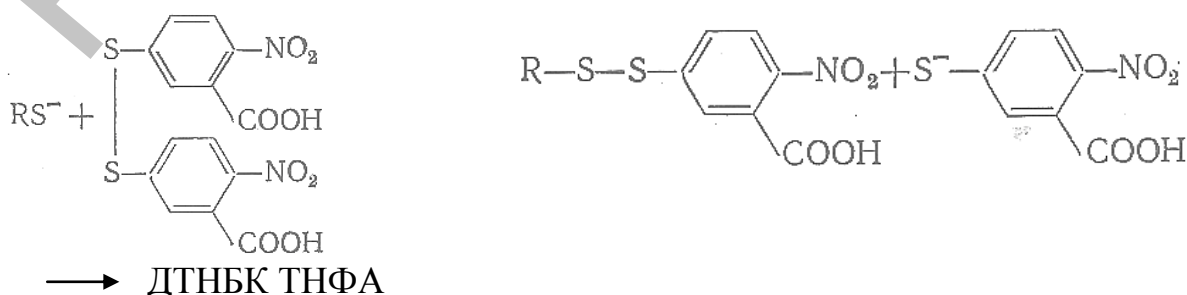
3. Рассчитать концентрацию восстановленного глутатиона в печени с использованием градуировочного графика.

Глутатион (L-γ-глутамил-L-цистеинилглицин) (GSH) – трипептид, образованный аминокислотами цистеином, глутаминовой кислотой и глицином. В организме GSH присутствует как в окисленной (~ 3% общего количества), так и в восстановленной форме. В норме стационарный уровень его восстановленной формы внутри клеток достигает достаточно высоких значений – 5–10 мМ.

Главный орган синтеза GSH у млекопитающих – печень. Она обеспечивает около 90% всего циркулирующего глутатиона при физиологических условиях. Большая часть GSH печени – цитозольный, обновляющийся очень быстро. Образование GSH в печени тесно связано с питанием, особенно с содержанием в диете цистеина.

Глутатион – компонент неферментативной антиоксидантной системы клеток. GSH обычно отсутствует у анаэробных микроорганизмов – прокариот и некоторых эукариот, но есть почти у всех аэробов. Антиоксидантные свойства GSH определяются непосредственным взаимодействием с АФК и обменными реакциями с дисульфидными связями, и функционированием ряда глутатион-зависимых ферментов. GSH, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза, глутатионредуктаза и НАДФН образуют глутатионовую антиоксидантную систему, в которой глутатионредуктаза и НАДФН необходимы для восстановления GSSH и, следовательно, его рециклирования. Наличие в молекуле свободной сульфгидрильной группы обуславливает большинство из перечисленных выше функций GSH. Глутатионовый статус ткани играет важную роль при гипероксических состояниях, а нарушение его гомеостаза может оказать губительное влияние на клеточные процессы. Снижение таких показателей как суммарное содержание восстановленной и окисленной форм глутатиона (GSSG) и отношение концентрации GSH к GSSG положительно коррелируют с интенсификацией ПОЛ. Накопление GSSG в печени рассматривается как индикатор окислительного стресса. Напротив, повышение содержания восстановленной формы свидетельствует о развитии адаптивного ответа ткани на окислительный стресс.

Принцип метода. В основе метода лежит реакция взаимодействия SH-групп глутатиона с 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБК), в ходе которой при pH 8,0 происходит высвобождение тионитрофенильного аниона (ТНФА), поглощающего при длине волны 412 нм:



Количество образовавшегося ТНФА прямо пропорционально количеству свободных SH-групп, прореагировавших с ДТНБК. Этот метод позволяет определять суммарную концентрацию низкомолекулярных тиолов, однако, поскольку GSH является доминирующим, по результатам реакции с ДТНБК чаще всего судят о концентрации восстановленного глутатиона.

Средства измерений, вспомогательное оборудование:

Весы, центрифуга, дозаторы, спектрофотометр.

Реактивы:

1. 0,2 М калий-натрий-фосфатный буфер, pH=8,0 (м.м. K_2HPO_4 136,1 г/моль, м.м. NaOH 40 г/моль): 2,72 г дигидрофосфата калия (K_2HPO_4) и 0,73 г гидроксида натрия переносят в мерную колбу объемом 100 cm^3 , растворяют в дистиллированной воде и доводят дистиллированной водой объем до метки.

2. 0,25 М трис-HCl буфер, pH 7,4 (м.м. триса 121,14 г/моль): 3,02 г триса растворяют в 50 cm^3 дистиллированной воды. Доводят pH до 7,4 добавлением 12 М (37%, масс.) HCl. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

3. 0,001 М раствор реактива Элмана (м.м. ДТНБК = 212,1 г/моль): 4 мг ДТНБК и растворяют в 10 cm^3 0,2 М калий-натрий-фосфатного буфера.

4. 10% раствор ТХУ (м.м. = 163,4 г/моль): 5 г ТХУ и растворяют в 50 cm^3 дистиллированной воды.

5. 0,0001 М раствор GSH (м.м. 307,32 г/моль): 30,72 мг GSH и растворяют в 100 cm^3 дистиллированной воды.

Порядок выполнения работы

1. Навеску ткани гомогенизируют в холодной 0,25 М Tris-HCl-буфере, pH 7,4 в соотношении 1:10 (например, 200 мг ткани и 1,8 cm^3 буфера).
2. Для осаждения белка в приготовленный гомогенат ткани добавляют 0,3 cm^3 10% раствора ТХУ.
3. Пробы тщательно перемешивают и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин.
4. К 0,3 cm^3 супернатанта добавляют 3 cm^3 0,2 М калий-натрий-фосфатного буфера (КНФБ), pH 8,0 и 0,1 cm^3 0,001 М ДТНБК.
5. Полученную смесь перемешивают, инкубируют 10 мин при комнатной температуре и измеряют оптическую плотность при 412 нм в кювете ($l=1\text{cm}$) против контрольной пробы, обработанной так же, но не содержащей биологического материала (таблица 1).

Таблица 1 – Схема определения концентрации GSH

Опытная проба	Контрольная проба
1. 0,3 cm^3 супернатанта	1. –
2. 3 cm^3 0,2 М КНФБ (pH 8,0)	2. 3,3 cm^3 0,2 М КНФБ (pH 8,0)
3. 0,1 cm^3 0,001 М ДТНБК	3. 0,1 cm^3 0,001 М ДТНБК
4. Инкубация в течение 10 мин при комнатной температуре	
5. Измерение оптической плотности при 412 нм	

6. Содержание GSH рассчитывают по формуле, используя градуировочный график, и выражают в мкмоль/г ткани или мкмоль/г белка.

$$C = \frac{A}{k \times m_{\text{ткани}}} \times 1000 \text{ (мкмоль/г ткани),}$$

$$C = \frac{A}{k \times m_{\text{ткани}} \times C_{\text{белка}}} \times 1000 \text{ (мкмоль/г белка),}$$

где A – оптическая плотность образца; $m_{\text{ткани}}$ – масса ткани в реакционной смеси, мг; k – коэффициент, рассчитанный по градуировочному графику; $C_{\text{белка}}$ – концентрация белка, мг/г ткани; 1000 – коэффициент для пересчета на 1 г белка или 1 г ткани.

7. Построение градуировочного графика.

7.1. В мерной колбе на 100 см³ 30,72 мг GSH растворяют в дистиллированной воде (маточный 0,0001 М раствор GSH). Серию градуировочных растворов готовят, добавляя к маточному раствору восстановленного глутатиона 0,25 М трис-НСl буфер в количествах, указанных в таблице 2.

Таблица 2 – Приготовление градуировочных растворов

№ пробирки	Содержание GSH, мкмоль	Объем стандартного 0,0001 М р-ра GSH, см ³	Объем (рН 7,4)
1	0	0	1,0
2	0,1	0,1	0,9
3	0,2	0,2	0,8
4	0,4	0,4	0,6
5	0,6	0,6	0,4
6	0,8	0,8	0,2
7	1,0	1,0	0

7.2. В каждую пробирку с градуировочной пробой добавляют по 1 см³ 10% раствора ТХУ.

7.3. В химические пробирки отбирают по 0,3 см³ градуировочного раствора, добавляют 3 см³ 0,2 М КНФБ (рН 8,0) и 0,1 см³ 0,001 М ДТНБК, перемешивают.

7.4. Через 10 мин измеряют оптическую плотность при $\lambda=412$ нм против контрольной пробы (3,3 см³ 0,2 М КНФБ и 0,1 см³ 0,01 М ДТНБК).

7.5. Строят график зависимости оптической плотности (A) от содержания GSH в реакционной смеси (мкмоль).

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Опишите биологическую роль глутатиона. В каких реакциях в организме участвует восстановленный глутатион?
2. Как происходит метаболизм глутатиона?
3. Какие ферменты участвуют в метаболизме глутатиона?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12

Оценка степени окислительной модификации белков

Цель работы: определить степень окислительной модификации белков.

Задачи работы:

1. Приготовить растворы, необходимые для оценки окислительной модификации белков.
2. Рассчитать степень окислительной модификации белков.

При окислительном стрессе атаке АФК подвергаются белки плазматических мембран (полипептидная цепь и боковые аминокислотные остатки), что может сопровождаться разрывом пептидной цепи и образованием стабильных метаболитов аминокислот. Ароматические аминокислоты наиболее чувствительны к окислению АФК. Фенилаланин превращается в моно- и дигидроксипроизводные, тирозин – в 3,4-дигидроксипроизводное. Эти соединения могут подвергаться обратимому окислению/восстановлению и генерировать радикалы, которые способны взаимодействовать между собой с образованием дитирозинов, что может приводить к внутри- и межмолекулярным сшивкам пептидов. Окисление остатков лизина, аргинина, гистидина, пролина, треонина, глутаминовой и аспарагиновой кислот приводит к образованию карбонильных групп. Карбонильные группы могут быть введены в белки при их взаимодействия с продуктами окисления углеводов (реакции гликозилирования и гликооксидации) и продуктами окисления липидов (малоновый диальдегид, 2- и 3-ненасыщенные альдегиды). Образование 2,2'-бифенильных производных является маркером индуцированных АФК повреждений белков. Внутриклеточный уровень окисленных белков определяется балансом между скоростью окисления белков и скоростью деградации окисленных белков. Этот баланс является функцией множества факторов генерации АФК и факторов, определяющих концентрацию и активность протеаз, разрушающих поврежденные молекулы. Окисленные формы некоторых белков (модифицированные при гликозилировании или продуктами ПОЛ, агрегаты белков) стабильны для протеолиза, они могут ингибировать протеолиз окисленных форм других белков.

Принцип метода. Метод оценки окислительной модификации белков основан на взаимодействии окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенил-гидразонов.

Средства измерений, оборудование:

Весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр

Реактивы:

1. 0,01 М раствор 2,4-динитрофенилгидразина (м.м. = 198,15 г/моль): 6,3 см³ хлористоводородной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 см³ и доводят водой дистиллированной до метки (2,5 М раствор). 49,54 мг 2,4-ДНФГ растворяют в 25 см³ 2,5 М раствора HCl.

2. 0,1 М раствор натрий-фосфатного буфера, рН=7,4: 2,9 г гидрофосфата натрия и 0,296 г дигидрофосфата натрия переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

3. 20% раствор ТХУ (м.м. = 163,4 г/моль): 10 г ТХУ и растворяют в 50 см³ дистиллированной воды.

4. 10% раствор ТХУ (м.м. = 163,4 г/моль): 5 г ТХУ и растворяют в 50 см³ дистиллированной воды (можно приготовить разведением 20% раствора ТХУ в 2 раза).

5. Смесь этанол:этилацетат (1:1): смешивают 25 см³ этанола и 25 см³ этилацетата.

6. 8 М раствор мочевины (м.м. = 60,06 г/моль): 12,0 г мочевины, переносят в мерную колбу объемом 25 см³, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до метки.

Порядок выполнения работы

1. К 0,1 см³ сыворотки или 0,3 см³ гомогената ткани, приготовленного с использованием натрий-фосфатного буфера в разведении 1:10, добавляют 100 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 7,4) до конечного объема пробы 1 см³ (таблица).

2. Пробы инкубируют в течение 15 минут при 37°C, в опытную пробу вносят 4 см³ 0,01 М 2,4-ДНФГ, в контрольную – 4 см³ 2,5 М HCl.

3. Пробы инкубируют при комнатной температуре 30-40 (в темноте, перемешивая каждые 15 минут).

4. В пробы добавляют по 5 см³ холодной 20% ТХУ.

5. Пробы инкубируют в ледяной бане 15 минут и центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин для осаждения белка.

6. Супернатант удаляют, осадок белка промывают 4 см³ 10% ТХУ.

7. Для экстракции липидов и удаления 2,4-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами белков, осадки промывают 3 раза, добавляя каждый раз по 4 см³ смеси этанол:этилацетат (1:1).

8. После этого осадок белка растворяют в 2 см³ 8 М мочевины и оставляют на 1 час при 37°C с постоянным перемешиванием.

9. Оптическую плотность опытной и контрольной проб измеряют при 370 нм.

Таблица – Схема добавления реагентов при определении окислительной модификации белка

Опытная проба	Контрольная проба
1. 0,1 см ³ сыворотки или 0,3 см ³ гомогената ткани	1. —
2. 0,1М НФБ, рН 7,4 до 1 см ³ (0,9 см ³ для сыворотки и 0,7 см ³ для гомогената)	2. 1 см ³ 0,1 М НФБ, рН 7,4
3. Инкубация в течение 15 мин при 37°C	
4. 4 см ³ 0,01 М 2,4-ДНФГ	4. 4 см ³ 2,5 М HCl
5. Инкубация в течение 30-40 минут в темноте при комнатной температуре	

6. Добавляют 5 см ³ холодной 20% ТХУ
7. Инкубация в течение 15 минут на ледяной бане
8. Центрифугирование 10 минут при 3000 об/мин
9. Осадок промывают 4 см ³ 10% ТХУ
10. Трехкратное промывание осадка 4 см ³ смеси этанол:этилацетат (1:1).
11. Осадок белка растворяют в 2 см ³ 8 М мочевины
12. Инкубация в течение 30 мин при 37°C при постоянным перемешивании
13. Измерение оптической плотности при 370 нм

Содержание карбонильных групп (нмоль) в 1 г белка рассчитывают с использованием коэффициента молярной экстинкции $\varepsilon = 22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$$C = \frac{(A_1 - A_2) \times V}{\varepsilon \times l \times m_{\text{ткани}} \times C_{\text{белка}}} \times 1000 \text{ (нмоль/г белка)},$$

где A_1 - оптическая плотность образца; A_2 - оптическая плотность контрольной пробы; V - конечный объем реакционной смеси, см³; l - длина кюветы, см; ε - коэффициент экстинкции $22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $C_{\text{белка}}$ - концентрация белка, мг/г ткани; 1000 - коэффициент для пересчета на 1 г белка.

Степень окислительной модификации белков можно выражать в единицах оптической плотности, отнесенных к 1 г белка или 1 см³ сыворотки крови (с учетом ее разведения).

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Чем вызывается окислительная модификация белков?
2. Опишите принцип определения степени окислительной модификации белков.
3. Какие еще вещества также можно определить реакцией с 2,4-динитрофенилгидразином?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13

Определение общей активности глутатионредуктазы в тканях животных

Цель работы: определить активность глутатионредуктазы в тканях животных.

Задачи работы:

1. Приготовить растворы, необходимые для выполнения работы.
2. Определить активность глутатионредуктазы в печени.
3. Рассчитать активность глутатионредуктазы.

Глутатионредуктаза (ГР) (КФ 1.6.4.2) – флавопротеин, восстанавливающий GSH из его дисульфидной формы при участии НАДФН, образующегося в пентозофосфатном пути распада глюкозы:



ГР обладает высокой специфичностью к GSH, однако с низкой скоростью может катализировать восстановление ряда других соединений, содер-

жащих дисульфидную связь, и помимо основной, глутатион-восстанавливающей активности, способна проявлять трансгидрогеназную, электронтрансферазную и диафоразную активности, хотя и в значительно меньшей степени. Этот фермент широко распространён в тканях животных, где локализован в цитозоле и митохондриях.

Принцип метода. Определение активности глутатионредуктазы основано на изменении скорости окисления НАДФН, измеренной на спектрофотометре при длине волны 340 нм.

Средства измерений, оборудование:

Весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр

Реактивы:

1. 0,25 М трис-НСl буфер(м.м. 121,14 г/моль), рН 7,4: 3,94 г Трис-НСl растворяют в 80 см³ дистиллированной воды, доводят рН до 7,4 добавлением 12 МНСl. Раствор переносят мерную колбу объемом 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Хранить в холодильнике при температуре +4-8 °С.

2. 8 мМ раствор ЭДТА(м.м. 292,24 г/моль): 0,161 г ЭДТА растворяют в 50 см³ дистиллированной воды.

3. 5,3 мМ раствор окисленного глутатиона (м.м. 307,2 г/моль): 32,3 мг окисленного глутатиона растворяют в 10 см³ буферного раствора.

4. 5 мМ раствор НАДФН: 4,125 мг НАДФН растворяют в 1 см³ буферного раствора. Раствор хранят на ледяной бане, используют в течение суток

Порядок выполнения работы

1. Готовят гомогенат 1:10. Для этого навеску ткани 200 мг гомогенизируют в 1,8 см³ холодного 0,25 М трис-НСl буфера (рН 7,4).

2. Гомогенат переливают в центрифужные пробирки и оставляют во льду на 15 мин для более полной экстракции.

3. Осажденные белки ткани отделяют центрифугированием в течение 30 мин при 3000 об/мин при охлаждении. Для определения активности глутатионредуктазы используют цитозольную фракцию.

4. В кювету спектрофотометра вносят реактивы, указанные в таблице.

Реактивы, см ³	
1. 0,25 М трис-НСl, рН 7,4	2,4
2. 8 мМ ЭДТА	0,1
3. Цитозольная фракция	0,1
4. 5,3 мМ раствор глутатиона	0,5
Инкубация при 37°С в течение 5 мин	
5. 5 мМ раствор НАДФН	0,1
Регистрация изменения оптической плотности при 340 нм в течение 2 мин	

5. Реакционную смесь инкубируют при 37°С в течение 5 мин.

6. Реакцию запускают добавлением при перемешивании 0,1 мл 5 мМ НАДФН, и регистрируют изменение оптической плотности (ΔD) в течение 2 мин против воды.

7. Активность ГР рассчитывают, исходя из величины молярного коэффициента экстинкции НАДФН, равного при 340 нм $6220 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ и выражают в мкмоль/мин/г белка или (г ткани).

$$A = \frac{\Delta D \times V}{\varepsilon \times t \times m_{\text{ткани}}} \times 1000 \text{ (мкмоль/г ткани)},$$

$$A = \frac{\Delta D \times V}{\varepsilon \times t \times m_{\text{ткани}} \times C_{\text{белка}}} \times 1000 \text{ (мкмоль/г белка)},$$

где ΔD – изменение оптической плотности пробы в ходе реакции; V – конечный объем среды, см^3 ; ε – коэффициент молярной экстинкции $6220 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$; t – время инкубации пробы, мин; l – длина кюветы, см; $m_{\text{ткани}}$ – масса ткани в реакционной смеси, г; $C_{\text{белка}}$ – концентрация белка, мг/г ткани; 1000 – коэффициент для пересчета на 1 г белка или 1 г ткани.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Какой принцип определения активности глутатионредуктазы?
2. В каких тканях наиболее активен этот фермент и почему?
3. Почему активность этого фермента возрастает при окислительном стрессе?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14

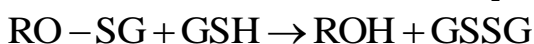
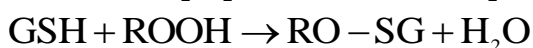
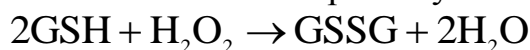
Определение общей активности глутатионпероксидазы в тканях животных

Цель работы: определить активность глутатионпероксидазы в тканях животных.

Задачи работы:

1. Приготовить растворы, необходимые для выполнения работы.
2. Определить активность глутатионпероксидазы в печени.
3. Рассчитать активность глутатионпероксидазы.

Глутатионпероксидазы (GPx) – ферменты, обладающие способностью восстанавливать неорганические (H_2O_2) и органические (ROOH) пероксиды [10] с образованием селеновой кислоты как промежуточного продукта:



GPx обладают широкой субстратной специфичностью по отношению к гидроперекисям, но абсолютно специфичны к восстановленному глутатиону (GSH), который в ходе реакции переходит в окисленную форму (GSSG). Глутатионпероксидазы (селенопероксидазы) состоят из четырех субъединиц и содержат в активном центре четыре ковалентно связанных атома Se в форме селеноцистеина. Группу селенопероксидаз составляют пять изоформ, к которым относятся: цитозольная, желудочно-кишечная, плазматическая, ядерная,

глутатионпероксидаза гидроперекисей липидов. В большинстве клеток млекопитающих около 70% GPx локализовано в цитоплазме и около 30% – в митохондриях. GPx рассматривают в качестве фермента, имеющего первостепенное значение в защите клетки от образуемого H_2O_2 . Наряду с этим, GPx способны восстанавливать гидроперекиси жирных кислот, перекиси белкового и нуклеиново-кислотного происхождения. Активность GPx наиболее высока в печени, надпочечниках, хрусталике, эритроцитах, поджелудочной железе, средние значения показаны для сердца, легких, селезенки, жировой ткани, головного мозга, низкие – для семенников, желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы, мышц, соединительной ткани.

Принцип метода. Метод определения общей активности GPx основан на измерении количества H_2O_2 , не прореагировавшей с GSH, который определяется реакцией с ДТНБК.

Средства измерений, оборудование:

Весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр

Реактивы:

1. 0,25 М трис-НСl буфер(м.м. 121,14 г/моль), рН 7,4: 3,94 г Трис-НСl растворяют в 80 см^3 дистиллированной воды, доводят рН до 7,4 добавлением 12 МНСl. Доводят объем до 100 см^3 дистиллированной водой. Хранить в холодильнике при температуре $+4-8\text{ }^\circ\text{C}$.

2. 0,2 М калий-натрий фосфатный буфер (КНФБ), рН 8,0: 2,72 г KH_2PO_4 и 0,74 г NaOH растворяют в дистиллированной воде и доводят объем в мерной колбе до 100 см^3 .

3. 0,001 М реактив Элмана: 4 мг ДТНБК растворяют в 10 см^3 КНФБ, рН 8,0. Срок использования раствора – в течение суток.

4. 5 мМ раствор восстановленного глутатиона (GSH): 7,5 мг GSH растворяют в 5 см^3 0,25 М трис-НСl буфера, рН 7,4. Срок использования раствора – в течение суток.

5. 25 мМ раствор ЭДТА (м.м. 292,24 г/моль): 1,01 г ЭДТА растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды.

6. 0,4 М раствор азиды натрия (NaN_3): 1,3 г NaN_3 растворяют в 50 см^3 дистиллированной воды.

7. 5 мМ раствор H_2O_2 : к $0,056\text{ см}^3$ 3% H_2O_2 добавляют 10 см^3 .

8. 10% раствор ТХУ: 1 г ТХУ растворяют в 10 см^3 дистиллированной воды.

Порядок выполнения работы

1. Навеску ткани гомогенизируют в холодном 0,25 М трис-НСl буфере (рН 7,4) в соотношении 1:4.

2. Приготовленный гомогенат ткани до завершения процедуры гомогенизации других образцов хранят на ледяной бане в холодильнике при $t=4\text{ }^\circ\text{C}$.

3. В стеклянные центрифужные пробирки вносят реактивы, указанные в таблице.

Реактивы, см ³	Опытная проба	Контрольная проба
1. Гомогенат ткани	0,15	0,15
2. 0,25 М трис-НСl буфер, (рН 7,4)	1,5	1,5
3. 25 мМ ЭДТА	0,05	0,05
4. 0,4 М NaN ₃	0,05	0,05
Инкубация 5 мин при 37°C		
5. 5 мМ GSH	0,15	0,15
Инкубация 1 мин при 37°C		
6. 5 мМ H ₂ O ₂	0,05	–
Инкубация 5 мин при 37°C		
7. 10% ТХУ	1,0	1,0
8. 5 мМ H ₂ O ₂	–	0,05
Центрифугирование 15 мин при 3000 об/мин		
9. Супернатант	0,3	0,3
10. 0,2 М КНФБ	3,0	3,0
11. ДТНБК	0,1	0,1
Инкубация 10 мин при комнатной температуре		
Измерить оптическую плотность при длине волны 412 нм против воды		

Активность GPx рассчитывают по формулам и выражают в мкмоль GSH/мин×г белка или мкмоль GSH/мин×г ткани.

$$A = \frac{(D_k - D_{оп})}{k \times t \times l \times \frac{m}{\rho}_{ткани}} \times 1000, \frac{\text{мкмоль}}{\text{мин}} \times \text{г ткани},$$

$$A = \frac{(D_k - D_{оп})}{k \times t \times l \times m_{ткани} \times C_{белка}} \times 1000, \frac{\text{мкмоль}}{\text{мин}} \times \text{г белка},$$

где D_к, D_{оп} – оптическая плотность контрольной и опытной пробы; k – коэффициент, рассчитанный по калибровочному графику (см. лабораторную работу №10); t – время инкубации пробы, мин; l – длина кюветы, см; m_{ткани} – масса ткани в реакционной смеси, мг; C_{белка} – концентрация белка, мг/г ткани; 1000 – коэффициент для пересчета на 1 г белка или 1 г ткани.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Какой принцип определения активности глутатиопероксидазы?
2. Напишите расчет количества ткани в реакционной среде.
3. Как связана активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 15

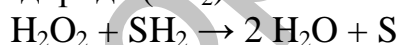
Определение общей активности каталазы

Цель работы: определить активность каталазы в тканях животных.

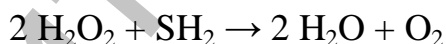
Задачи работы:

1. Приготовить растворы, необходимые для определения активности каталазы.
2. Определить активность каталазы в животных тканях.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – фермент с молекулярной массой 220–350 кДа, состоящий из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых в активном центре содержит гем, связанный с полипептидной белковой цепью, и молекулу НАДФН. НАДФН в каталитическом процессе принадлежит особая роль, которая, однако, до конца не выяснена. Согласно одной из гипотез, НАДФН стабилизирует структуру фермента и, тем самым, снижает его чувствительность к инактивации, обусловленной токсическим действием H_2O_2 . Согласно другой гипотезе, в условиях окислительного стресса каталаза выполняет функции донора НАДФН для глутатионзависимых ферментов (глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы). Еще одна гипотеза основана на предположении, что НАДФН является субстратом либо кофактором ферментативной активности каталазы, что может быть связано с другим механизмом действия, чем был описан ранее. В клетках млекопитающих каталаза локализована преимущественно в цитоплазме и пероксисомах, небольшое количество фермента обнаружено в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме. Каталаза обладает одновременно каталазной и пероксидазной активностью. Когда концентрация H_2O_2 становится незначительной, каталаза проявляет пероксидазную активность, т.е. начинает катализировать реакцию окисления H_2O_2 спиртов, формальдегидов и нитратов. В этих реакциях H_2O_2 является субстратом, который восстанавливается до воды за счет соединений, выступающих в качестве доноров водорода (SH_2):



Основная функция каталазы в клетках – участие в реакции диспропорционирования H_2O_2 :



Наибольшее содержание каталазы обнаружено в эритроцитах, печени и почках, жировой ткани; концентрация её в мозге, щитовидной железе и гонадах мала. Важным условием эффективности ферментативного звена АОС является сбалансированность активности СОД, каталазы, глутатионпероксидазы. Снижение активности одного из ферментов АОС может привести к избыточному накоплению АФК.

Принцип метода. Метод основан на измерении концентрации не разложившегося H_2O_2 после инкубации его с каталазой, спектрофотометрической регистрации окрашенного продукта реакции H_2O_2 с молибдатом аммония $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}_2)$ при длине волны 410 нм.

Средства измерений, оборудование:

Весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр

Реактивы:

1. 0,1 МТрис-НСl, рН = 7,4 (м.м. триса 121,14 г/моль): 1,21 г триса растворяют в 50 см^3 дистиллированной воды, доводят рН до 7,4 с помощью концентрированной НСl, переносят в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

2. 0,03% раствор перекиси водорода: 3% раствор перекиси водорода разводят в 10 раз и хранят в течение суток.

3. 4% раствор молибдата аммония (м.м. = 1235,85 г/моль): 4 г молибденовокислого аммония растворяют в 100 см³ дистиллированной воды (для лучшего растворения добавить несколько капель HCl).

Порядок выполнения работы

- 300 мг ткани гомогенизируют в 2,7 см³ трис- HCl (разведение 1:9).
- Для получения частично очищенной цитозольной фракции пробы центрифугируют 20 мин при 4500 об/мин при температуре 4° С.
- Супернатант разводят в 50 раз (конечное разведение 1:500).
- В опытной пробе к 1 см³ 0,03% H₂O₂ добавляют 0,1 см³ цитозольной фракции исследуемой ткани. В контрольной пробе вместо H₂O₂ используют такое же количество дистиллированной воды. В «холостой» пробе к H₂O₂ вместо биологического материала добавляют 0,1 см³ H₂O.
- Реакционную смесь инкубируют 10 мин при комнатной температуре.
- Реакцию останавливают добавлением 0,5 см³ 4% раствора молибдата аммония (таблица).

Таблица – Схема определения активности каталазы в тканях

Опытная проба	Контрольная проба	Холостая проба
1. 1 см ³ 0,03% H ₂ O ₂	1. 1 см ³ H ₂ O	1. 1 см ³ 0,03% H ₂ O ₂
2. 0,1 см ³ цитозоля	2. 0,1 см ³ цитозоля	2. 0,1 см ³ H ₂ O
3. Инкубация 10 мин при комнатной температуре		
4. Добавление 0,5 см ³ 4% раствора (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4H ₂ O		
5. Измерение оптической плотности на СФ при длине волны 410 нм против контрольной пробы		

Активность каталазы определяют по разнице изменения оптической плотности «холостой» и опытной пробы в единицу времени с использованием миллимолярного коэффициента экстинкции для образующегося продукта $\epsilon = 22,2 \cdot 10^3 \text{ мм}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, и выражают в мкмоль/мин × г белка (или × г ткани).

$$A = \frac{(D_{\text{хол}} - D_{\text{оп}}) \times V}{\epsilon \times t \times l \times m_{\text{ткани}}} \times 10^6 \text{ (мкмоль / мин} \cdot \text{г ткани)}$$

$$A = \frac{(D_{\text{хол}} - D_{\text{оп}}) \times V}{\epsilon \times t \times l \times m_{\text{ткани}} \times C_{\text{белка}}} \times 10^6 \text{ (мкмоль / мин} \cdot \text{г белка)}$$

где $D_{\text{хол}}$, $D_{\text{оп}}$ – оптическая плотность «холостой» и опытной пробы; V – конечный объем смеси, см³; ϵ – коэффициент миллимолярной экстинкции $22,2 \cdot 10^3 \text{ мм}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; t – время инкубации пробы, мин; l – длина кюветы, см; $m_{\text{ткани}}$ – масса ткани в реакционной смеси, мг; $C_{\text{белка}}$ – концентрация белка, мг/г ткани (принять равной 220 мг/г); 1000 – коэффициент для пересчета на 1 г белка или 1 г ткани.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

- Какую реакцию катализирует каталаза?
- Опишите принцип определения активности каталазы?
- Назовите ферменты, относящиеся к системе антиоксидантной защиты.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 16

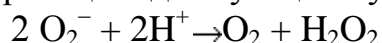
Определение активности супероксиддисмутазы

Цель работы: определить активность супероксиддисмутазы в животных тканях.

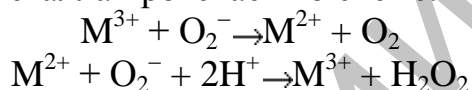
Задачи работы:

1. Приготовить растворы, необходимые для определения активности СОД.
2. Определить активность СОД в печени животных.

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) представлена семейством металлоферментов, катализирующих реакцию дисмутации супероксидных радикалов:

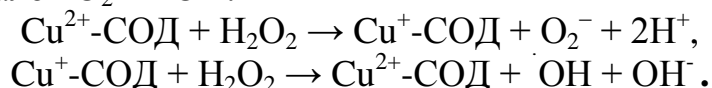


Реакция осуществляется в активном центре фермента с участием остатков лизина и связанных с гистидином ионов металла (М). Реакция дисмутации в присутствии ионов металла протекает по схеме:



Известно четыре класса СОД, различающихся по первичной структуре и природе металлов, входящих в активный центр. Cu, Zn-СОД (СОД 1) – конститутивно синтезирующийся фермент, содержится в цитозоле и межмембранном пространстве митохондрий. Mn-СОД (СОД 2) локализована в митохондриях. Для микроорганизмов и некоторых растений характерен железосодержащий изофермент Fe-СОД (СОД 3). Внеклеточный тетрамерный медьсодержащий белок (ЕС-СОД, СОД 4) выполняет свою антиоксидантную функцию на клеточной поверхности. По эффективности дисмутации супероксидного радикала Mn-СОД в 1,5–2 раза менее активна, чем Cu, Zn-СОД, что обусловлено, по-видимому, преимуществом меди перед марганцем в качестве редокс-катализатора. По активности СОД органы млекопитающих различаются в десятки раз. Наивысшая активность Cu, Zn- и Mn-СОД обнаружена в печени. Высокой активностью Cu, Zn-СОД отличаются эритроциты. Анаэробы или анаэробно растущие факультативные бактерии обычно содержат Fe-СОД; при переходе к аэробному росту происходит индукция Mn-СОД.

СОД характеризуется необычайной структурной стабильностью и является одним из наиболее термостабильных глобулярных белков. Несмотря на высокую специфичность фермента, в определённых условиях Cu-СОД может взаимодействовать с H_2O_2 и выступать в качестве прооксиданта, инициируя образование радикалов O_2^- и $\text{OH}\cdot$:



В организме человека СОД представлена тремя вариантами, которые кодируются отдельными генами, локализованными на разных хромосомах. Cu, Zn-СОД кодируется геном *sod1* (хромосома 21), ген Mn-СОД (*sod2*) локализуется в хромосоме 6, белок ЕС-СОД кодируется геном *sod3* (хромосома 4).

Выявлены случаи генетически детерминированного как снижения, так и повышения содержания СОД (у людей с трисомией по хромосоме 21). В обоих случаях изменения концентрации СОД являются причиной развития патологических процессов: в первом – вследствие недостаточной защиты от АФК, во втором – в результате усиления цитотоксического действия H_2O_2 , образующейся при дисмутации O_2^- .

Принцип метода. Метод определения общей активности СОД основан на определении степени торможения ферментом реакции аутоокисления кверцетина (3,5,7,3',4'-пентагидрооксифлавонол). Интенсивное окисление кверцетина происходит в щелочной среде и сопровождается разрушением хромофора с максимумом поглощения при 406 нм и увеличением поглощения при 355 нм. При этом между количеством окисленного кверцетина, определяемым по величине оптической плотности при 406 нм, и длительностью реакции в течение первых 20 мин сохраняется линейная зависимость.

Средства измерений, оборудование:

Весы, ледяная баня, центрифуга, спектрофотометр

Реактивы:

1. 0,025 М трис-НСl буфер: 0,493 г Трис-НСl растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

2. 0,0005 М раствор ЭДТА (м.м. ЭДТА 292,24 г/моль): 0,0015 г ЭДТА растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

3. $5 \cdot 10^{-5}$ М раствор кверцетина (м.м. кверцетина 302,24 г/моль): 0,0015 г кверцетина растворяют в 10 см³ диметилсульфоксида (ДМСО).

4. 0,02 М калий-натрий фосфатный буфер (КНФБ), рН 8,0: 0,272 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4) и 0,074 г гидроксида натрия переносят в колбу емкостью 100 см³ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до метки.

5. Раствор 1: ЭДТА + ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин): к 10 см³ раствора ЭДТА добавляют 70 мкл ТЕМЕДа.

Порядок выполнения работы

1. Навеску ткани гомогенизируют в холодном 0,025 М трис-НСl буфере (рН 7,4) на льду с разведением 1:150 (0,05 г ткани и 7,45 см³ 0,025М трис-НСl);

2. Гомогенат центрифугируют 30 минут 3000 об/мин при 4°C. Супернатант используют для определения активности СОД.

3. В химические пробирки добавляют реактивы в объемах, указанных в таблице.

Реагенты, см ³	Опытная проба	Контрольная проба
1. Раствор 1: ЭДТА + ТЕМЕД	0,5	0,5
2. КНФБ, рН 7,8	2,5	2,5
3. Вода дистиллированная	–	0,1
4. Супернатант	0,1	–
5. Раствор кверцетина, см ³	0,1	0,1

4. Измеряют оптическую плотность при 406 нм против воды.
5. Пробы инкубируют 20 мин при комнатной температуре.
6. Повторно измеряют оптическую плотность при 406 нм против воды.
7. Расчет активности СОД проводят по следующим формулам:

$$\begin{aligned}\Delta D_k &= D_{k0} - D_{k20} \\ \Delta D_o &= D_{o0} - D_{o20} \\ A &= \frac{\Delta D_k - D_o}{\Delta D_k} \times 100,\end{aligned}$$

где D_{k0} – значение оптической плотности после внесения кверцетина в контрольной пробе; D_{k20} – значение оптической плотности после инкубации в 20 мин в контрольной пробе; D_{o0} – значение оптической плотности после внесения кверцетина в опытной пробе; D_{o20} – значение оптической плотности после инкубации в 20 мин в опытной пробе; A – активность СОД в процентах.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Напишите реакцию, катализируемую супероксиддисмутазой.
2. Опишите принцип определения активности супероксиддисмутазы.
3. Почему центрифугирование проводят при низкой температуре?
4. Какие используются другие методы определения активности супероксиддисмутазы? Опишите их принцип.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 17

Исследование протеолитической активности сыворотки крови спектрофотометрическим и флуориметрическим методами

Цель работы: исследовать протеолитическую активность сыворотки крови флуориметрическим методом.

Задачи работы:

1. Освоить флуориметрический метод определения веществ.
2. Определить протеолитическую активность сыворотки крови с использованием в качестве субстрата сывороточный альбумин.
3. Измерить интенсивность флуоресценции компонентов реакции и зарегистрировать спектр.

Флуориметрия – метод фотометрического анализа, основанный на измерении интенсивности вторичного излучения, возникающего в результате взаимодействия лучистой энергии с определяемым веществом.

Физический эффект флуоресценции заключается в том, что молекула исследуемого вещества поглощает квант света возбуждения и при этом переходит в новое, энергетически более богатое состояние, через некоторый микропромежуток времени она излучает избыточную энергию в виде кванта света флуоресценции (эмиссии) (рисунок 1).

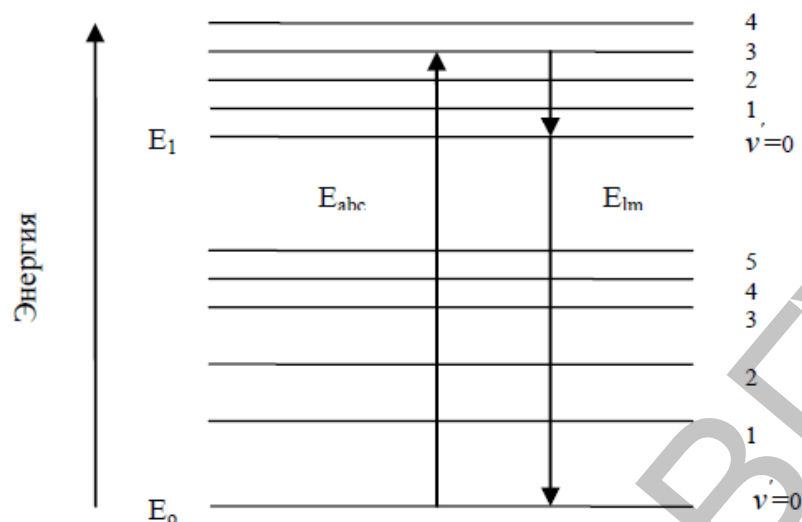


Рисунок 1 – Схема механизма спонтанной флуоресценции

Время жизни возбужденного состояния очень мало (для органических веществ – около 10^{-9} - 10^{-8} с), возбужденная частица очень быстро теряет поглощенную энергию. Эта потеря может происходить по-разному.

Причины потери поглощенной энергии:

1. Возбужденная частица может одновременно излучить всю поглощенную энергию в виде светового кванта и снова вернуться в основное состояние.
2. Может произойти безизлучательная потеря части поглощенной энергии (например, за счет теплового обмена при столкновении с другими частицами).

Характеристики флуоресценции

1. Спектр флуоресценции – распределение интенсивности I_{lm} излучения флуоресценции по длинам волн или частотам.

$$I_{lm} = f(\nu) ; I_{lm} = \varphi(\lambda)$$

2. Энергетический выход φ_e флуоресценции – это отношение энергии E_{lm} , излучаемой флуоресцирующим веществом, к энергии E_{abc} поглощенного света:

$$\varphi_e = \frac{E_{lm}}{E_{abc}}$$

Энергетический выход флуоресценции характеризует эффективность преобразования поглощенной световой энергии в энергию флуоресцентного излучения.

3. Квантовый выход φ флуоресценции – это отношение числа излученных квантов люминесценции (флуоресценции) N_{lm} к числу квантов N_{abs} поглощенного возбуждающего излучения:

$$\varphi_e = \frac{N_{lm}}{N_{abs}}$$

Чем больше квантовый выход, тем эффективнее преобразование возбуждающего света в излучение флуоресценции.

Квантовый выход флуоресценции зависит от:

- длины волны возбуждающего света;
- природы растворимого флуоресцирующего вещества и растворителя;
- концентрации раствора;
- температуры;
- присутствия примесей в растворе.

Принципиальная схема работы флуориметра

Луч света от источника 1 проходит через отверстие в диафрагме 2 и первичный светофильтр 3, пропускающий свет с длиной волны возбуждающего излучения, затем через кварцевый конденсатор (линзу) (4) и попадает в пробирку 5 с анализируемым раствором. Излучение флуоресценции собирается конденсаторами (линзами) 6 в направлении перпендикулярном направлению падающего возбуждающего светового потока, проходит через вторичные светофильтры 7, пропускающие свет с длиной волны излучения флуоресценции и попадает на фотоэлементы 8, которые преобразовывают световую энергию в фототок. Он усиливается (9) и регистрируется микроамперметром (10). Показания пропорциональны интенсивности флуоресценции.

Измерения необходимо проводить быстро во избежание разогревания испытуемого раствора, что может привести к снижению и тушению люминесценции.

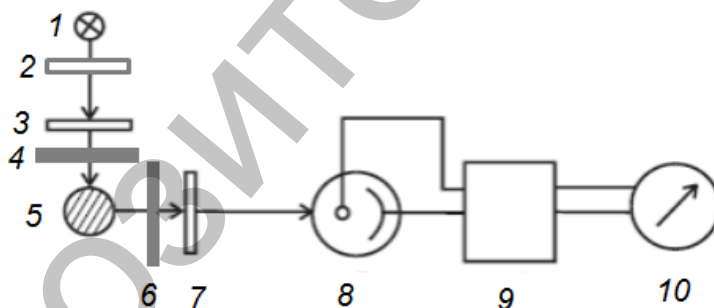


Рисунок 2 – Схема простого флуориметра

1 – источник УФ-излучения; 2 – диафрагма; 3 – первичный светофильтр; 4 – конденсатор (кварцевая линза); 5 – пробирка; 6 – конденсаторы (кварцевые линзы); 7 – вторичный светофильтр; 8 – фотоэлемент; 9 – усилитель; 10 – регистратор

При проведении флуоресцентной реакции в качестве растворителей используют воду, этанол, эфир, хлороформ. Этанол усиливает флуоресценцию. При нагревании интенсивность свечения падает, поэтому при проведении реакций с нагреванием или при разогревании реакционной смеси, содержащей концентрированные кислоты в результате добавления воды, флуоресценцию наблюдают после охлаждения. Для проведения испытаний используют сухие

пробирки. Необходимо параллельно ставить контрольный опыт с применением аналогичных растворителей, реактивов и посуды.

Флуоресценцию определяют обычно в растворах с концентрацией вещества, не превышающей 10^{-4} – 10^{-6} г/мл. Увеличение концентрации флуоресцирующего вещества приводит к уменьшению или полному исчезновению флуоресценции (так называемое концентрационное гашение флуоресценции). При повышении температуры также обычно уменьшается интенсивность флуоресценции.

Присутствие в растворе посторонних веществ может вызвать усиление флуоресценции (например, добавка сульфатов к хинину) или её гашение. Гашение флуоресценции связано чаще всего с химическим взаимодействием, в результате которого образуются нефлуоресцирующие продукты реакции.

Флуоресценция нашла применение в аналитической практике для идентификации веществ по цвету люминесцирующего излучения и для количественного анализа по определению интенсивности флуоресценции. В таблице 1 приведены величины длин волн максимумов возбуждающего света и флуоресценции для некоторых фармацевтических препаратов.

На практике флуоресценцию многих веществ вызывают облучением коротковолновым ультрафиолетовым светом. Вещества, поглощающие УФ-свет, могут флуоресцировать любым светом.

Средства измерений, оборудование:

Весы, центрифуга, спектрофотометр, термостат

Принцип метода. Сывороточный альбумин является единственным субстратом для протеиназ и обладает характерным спектром собственной флуоресценции при возбуждении световым потоком в ультрафиолетовой области.

Для определения протеолитической активности с использованием альбумина в качестве субстрата, реакцию осуществляют:

- 1) спектрофотометрическим способом – по содержанию ТХУ-растворимых продуктов реакции (A_{280} средне- и низкомолекулярные пептиды, свободный тирозин);
- 2) флуориметрическим способом – по изменению интенсивности флуоресценции компонентов реакции взаимодействия сыворотки крови с альбумином ($I_{кр.}$)

Реактивы:

1. 0,2 М трис-НСl-буфер, pH = 8,0 (м.м. трис 121,14 г/моль): 2,43 г трис-НСl переносят в колбу вместимостью 100 см³ и растворяют в дистиллированной воде. К 25 см³ раствора трис-НСl добавляют 25 см³ 0,1 М раствора НСl и 50 см³ дистиллированной воды.

2. 30% сывороточный альбумин человека: 3 г сывороточного альбумина растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

3. 0,9% раствор хлорида натрия: 0,9 г хлорида натрия растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

4. **20% раствор ТХУ:** 2 г ТХУ растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

Порядок выполнения работы

6. В пробирку добавить реактивы в объемах, указанных в таблице.

Спектро- фотометрический метод	Сыворотка крови, см ³	0,5
	Сывороточный альбумин человека, см ³	0,5
	Трис-НСI-буфер, см ³	0,5
	Раствор хлорида натрия, 0,9%, см ³	1,6
	Перемешать, инкубировать 90 минут при t=37°C	
	ТХУ, 20%	
Пробы охладить, центрифугировать (1500 об/мин, 10 мин). Измерить оптическую плотность в надосадочной жидкости при 280 нм против дистиллированной воды, кювета 1 см		
Флуориметрический метод	Сыворотка крови, см ³	0,5
	Сывороточный альбумин человека, см ³	0,5
	Трис-НСI-буфер, см ³	0,5
	Раствор хлорида натрия, 0,9%, см ³	1,6
	Пробы тщательно перемешать, инкубировать 90 мин при t=37°C	
	Измерить интенсивность флуоресценции компонентов реакции Iкр. При длине возбуждения 286 нм с регистрацией спектра в диапазоне 300–500 нм, кювета 1 см	

7. Протеолитическую активность сыворотки крови выразить в условных единицах. В рабочей тетради нарисовать спектр флуоресценции альбумина.

Вопросы и задания для подготовки к занятию

1. Опишите принцип флуориметрического определения веществ.
2. Какие факторы влияют на флуоресценцию?
3. Что такое протеиназы? Какие реакции они катализируют в организме?

Учебное издание

ДАНЧЕНКО Елена Олеговна

ЧИРКИН Александр Александрович

БАЛАЕВА-ТИХОМИРОВА Ольга Михайловна

ТОЛКАЧЕВА Татьяна Александровна

**МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ,
ОСНОВАННЫЕ НА ПРИМЕНЕНИИ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ОБОРУДОВАНИЯ**

Методические рекомендации
для выполнения лабораторных работ

Технический редактор

Г.В. Разбоева

Компьютерный дизайн

Л.Р. Жигунова

Подписано в печать2018. Формат 60x84¹/₁₆. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 2,96. Уч.-изд. л. 2,52. Тираж экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/255 от 31.03.2014 г.

Отпечатано на ризографе учреждения образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.